



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO  
Dipartimento di Farmacia

Dottorato di ricerca  
in [Scienze Farmaceutiche e Biomediche](#)  
Ciclo XIII — Anno di discussione 2015

Coordinatore: Chiar.mo Prof. [Gianluca Sbardella](#)

***Design, synthesis and biological evaluation  
of new small molecules with anti-inflammatory activity***

settore scientifico disciplinare di afferenza: [CHIM/08](#)

**Dottorando**

**Dott.** [Ferdinando Bruno](#)

**Tutore**

**Chiar.mo Prof.** [Paolo DeCaprariis](#)

" L'unica gioia al mondo è cominciare. E' bello vivere perché  
vivere è cominciare, sempre ad ogni istante."

C.Pavese

A chi mi aiuta a cominciare e a ricominciare  
A Rosanna, Claudio e Lorenza

## **INDICE**

|                                                                            |                |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------|
| <b>ABSTRACT</b>                                                            | <b>pag 6</b>   |
| <b>CAPITOLO I: <i>Il processo infiammatorio</i></b>                        |                |
| 1.1 <u>L'infiammazione come meccanismo difensivo</u>                       | <b>pag. 9</b>  |
| 1.2 <u>Classificazione dei processi infiammatori</u>                       | <b>pag. 12</b> |
| 1.3 <u>I mediatori del processo infiammatorio</u>                          | <b>pag. 20</b> |
| <b>CAPITOLO II: <i>L'Arachidonato 5-Lipossigenasi</i></b>                  |                |
| 2.1 <u>Le diverse classi di lipossigenasi</u>                              | <b>pag. 24</b> |
| 2.1.1 <i>Struttura delle Lipossigenasi</i>                                 | <b>pag. 24</b> |
| 2.1.2 <i>Catalisi stereochimica</i>                                        | <b>pag. 26</b> |
| 2.1.3 <i>R o S lipossigenasi</i>                                           | <b>pag. 29</b> |
| 2.1.4 <i>Classificazione</i>                                               | <b>pag. 29</b> |
| 2.1.5 <i>Ruoli biologici delle principali LOXs dei mammiferi</i>           | <b>pag. 30</b> |
| 2.2 <u>L'Arachidonato 5-lipossigenasi: struttura e funzioni</u>            | <b>pag. 31</b> |
| 2.2.1 <i>Il pathway biochimico della 5-LOX: la sintesi dei leucotrieni</i> | <b>pag. 31</b> |
| 2.2.2 <i>La struttura della 5-LOX umana</i>                                | <b>pag.34</b>  |
| 2.2.3 <i>Regolazione dell'attività cellulare della 5-Lipossigenasi</i>     | <b>pag.38</b>  |
| 2.3 <u>Il coinvolgimento della 5-LOX nelle varie patologie</u>             | <b>pag. 40</b> |
| <b>CAPITOLO III: GLI INIBITORI DELLA 5-LIPOSSIGENASI</b>                   |                |
| 3.1 <u>Le diverse classi di inibitori</u>                                  | <b>pag. 48</b> |
| 3.2 <u>Nuovi sviluppi</u>                                                  | <b>pag 52</b>  |

|                                                           |               |
|-----------------------------------------------------------|---------------|
| 3.3 <u>Inibitori duali</u>                                | <b>pag 58</b> |
| 3.4 <u>Scopo ed articolazione del progetto di ricerca</u> | <b>pag 64</b> |

#### **CAPITOLO IV: PROGETTAZIONE,SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI DERIVATI A NUCLEO INDOLICO E BENZO[g]INDOLICO**

|                                                                                                             |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 4.1 <u>SINTESI e VALUTAZIONE BIOLOGICA DI COMPOSTI A NUCLEO Etil 5-Idrossindol-3-Carbossilato</u>           | <b>pag 66</b> |
| 4.1.1. <i>Presupposti Scientifici E Scopo dello Studio</i>                                                  | <b>pag 66</b> |
| 4.1.2 <i>Parte chimica</i>                                                                                  | <b>pag 69</b> |
| 4.1.3 <i>Parte biologica e conclusioni</i>                                                                  | <b>pag 72</b> |
| 4.1.4 <i>Parte sperimentale</i>                                                                             | <b>pag 74</b> |
| 4.2 <u>SINTESI e VALUTAZIONE BIOLOGICA DI COMPOSTI A NUCLEO Etil 5-Idrossi benzo[g]indol-3-Carbossilato</u> | <b>pag 86</b> |
| 4.2.1. <i>Presupposti Scientifici E Scopo dello Studio</i>                                                  | <b>pag 86</b> |
| 4.2.2 <i>Parte chimica</i>                                                                                  | <b>pag 89</b> |
| 4.2.3 <i>Parte biologica e conclusioni</i>                                                                  | <b>pag 93</b> |
| 4.2.4 <i>Parte sperimentale</i>                                                                             | <b>pag 97</b> |

#### **CAPITOLO V :PROGETTAZIONE,SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI DERIVATI A NUCLEO CATECOLICO**

|                                                                                  |                |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 5.1 <u>Presupposti Scientifici E Scopo Dello Studio</u>                          | <b>pag 105</b> |
| 5.1.1. <i>Inibitori della 5-Lipossigenasi di origine vegetale</i>                | <b>pag 105</b> |
| 5.1.2 <i>Scopo dello Studio</i>                                                  | <b>pag 119</b> |
| 5.2 <u>Parte Chimica</u>                                                         | <b>pag 121</b> |
| 5.3 <u>Valutazione dell'attività biologica e studi di attività antiossidante</u> | <b>pag 132</b> |
| 5.4 <u>Parte sperimentale</u>                                                    | <b>pag 144</b> |

**CAPITOLO VI: PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI  
DERIVATI A NUCLEO CHINONICO**

**6.1 Presupposti Scientifici E Scopo Dello Studio pag 152**

*6.1.1 Inibitori della 5-Lipossigenasi di natura chinonica*

**pag 152**

*6.1.2 Scopo Dello Studio*

**pag 154**

**6.2 Parte Chimica pag 161**

**6.3 Parte Biologica e Conclusioni pag 167**

**6.4 Parte sperimentale pag 178**

**CONCLUSIONI pag 192**

**BIBLIOGRAFIA pag 194**

## ABSTRACT

Per *lipossigenasi* (nota più comunemente con l'abbreviazione di **LOX** o **LO**) si intende una famiglia eterogenea di enzimi in grado di perossidare i lipidi e di causare l'ossigenazione di acidi grassi polinsaturi trasformandoli, così, nei corrispondenti derivati idroperossidici. Nello specifico, la 5-LO rappresenta l'enzima chiave nell'ossidazione dell'acido arachidonico (AA) in LTA<sub>4</sub>, intermedio indispensabile per la sintesi dei leucotrieni, potenti mediatori flogistici coinvolti in una serie di differenti processi patologici. Va da sé che l'inibizione, dell'attività di tale enzima, induce la diretta riduzione della formazione di LT, definendo la LOX come un valido *drug-target* per la farmacoterapia di disturbi infiammatori quali asma, rinite allergica, aterosclerosi e alcune forme neoplastiche. Ad oggi, sebbene gli antagonisti dei recettori per i cisteinil-LT (quali *Montelukast* e *Zafirlukast*) sono impiegati con successo nella terapia anti-asmatica, lo sviluppo di inibitori della biosintesi LT è poco avanzato e allo stato attuale lo *Zileuton* costituisce l'unico inibitore della 5-LOX attualmente in uso clinico. Nel tentativo di inibire l'intera cascata della 5- LOX, tre strategie farmacologiche risultano essere le più concrete: l'inibizione della cPLA<sub>2</sub>, enzima che rilascia l'AA dalle membrane biologiche, l'inibizione della FLAP, proteina di membrana presentante l'AA ed infine l'inibizione della 5-LOX. Per quest'ultimo gruppo, vari sono stati gli sviluppi negli ultimi anni, promuovendo nuovi meccanismi molecolari accompagnati da una favorevole farmacodinamica. Sulla base di un attento studio di letteratura e di risultati scientifici conquistati dal gruppo di ricerca a cui afferisco, nel corso del ciclo triennale di Dottorato l'attenzione è stata focalizzata alla *progettazione, sintesi e valutazione biologica di nuovi derivati a nucleo indolico e benzo[g]indolico (inibitori duali 5-LOX, mPGEs-1), a nucleo catecolico e a nucleo chinonico (inibitori di tipo redox).*

Nell'ambito dei composti **a nucleo indolico e benzoindolico** lo studio di SAR ha interessato la valutazione della sostituzione in posizione 2 di gruppi feniltimetilici variamente sostituiti, l'estensione della porzione aromatica e la metilazione dell'azoto indolico. Da un'analisi dei dati ottenuti, secondo la quale la maggior parte dei composti saggiati, presenta valori di IC<sub>50</sub> inferiori al  $\mu\text{M}$ , si è evinto che in riferimento ai *lead* l'introduzione di gruppi feniltimetilici aventi entrambi le posizioni orto-occupate (soprattutto se da alogeni) è vantaggiosa ai fini dell'attività così come l'estensione della porzione aromatica.

La sintesi di composti **a nucleo catecolico** ha permesso di ottenere derivati estremamente potenti nell'inibire l'attività enzimatica, ottenibili mediante processi sintetici MW catalizzati. Tutti i derivati catecolici hanno mostrato valori di IC<sub>50</sub> in un range compreso 200 and 500 nM sia in test cellulari che in sistemi *cell-free*. Dei composti ottenuti è stata valutata anche l'attività antiossidante mediante test FRAP e DPPH.

Infine, la sintesi di derivati a **nucleo chinonico** fonda le sue radici sul completamento di studi SAR effettuati precedentemente dal gruppo di ricerca a cui afferisco. A tal proposito sono stati sintetizzati 48 composti distinti in 4 serie (composti 1,2 *orto*chinonici e 1,4*para*benzochinonici che presentano rispettivamente in posizione 2 e 5 gruppi metossilici ed/o idrossilici) sui quali sono stati condotti test biologici mirati a rilevare la potenza inibitoria di tutti i costituenti delle serie. Tra i composti sintetizzati il più attivo si è dimostrato essere il composto 4,5-dimetossi-3-dodecil-1,2-benzochinone con un valore di IC<sub>50</sub> = 29 nM in test cellulari



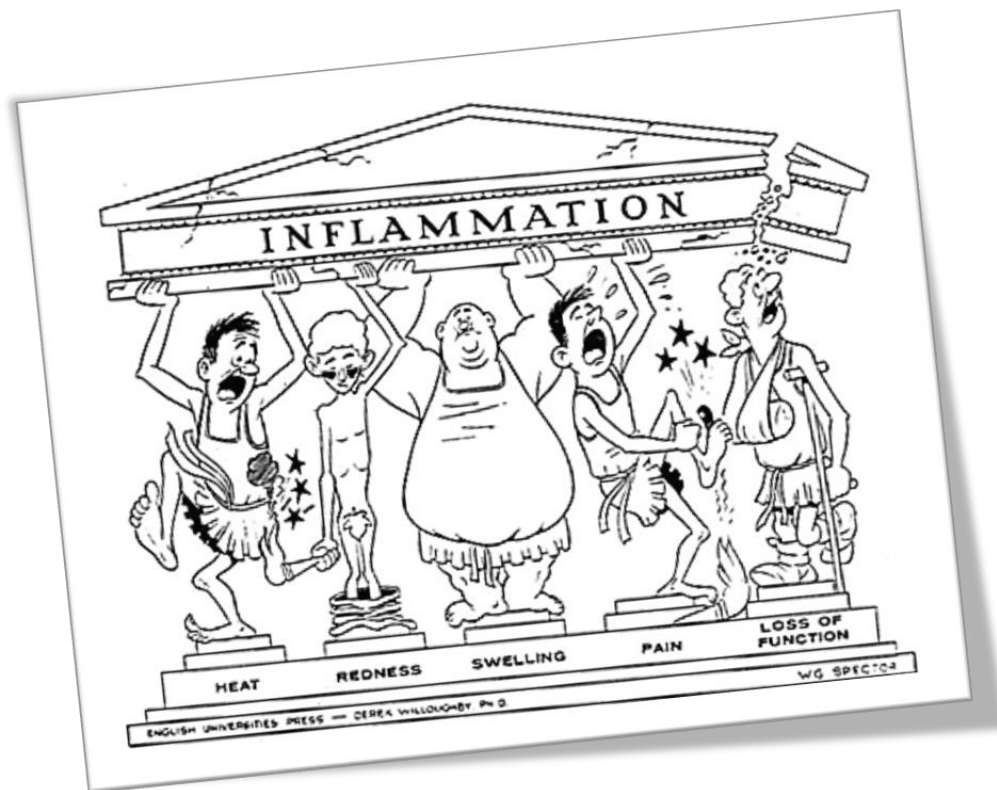
CAPITOLO I  
IL PROCESSO INFIAMMATORIO



### 1.1 L'infiammazione come meccanismo difensivo

L'infiammazione, o flogosi (dal greco *phlogos*, fiamma) può essere definita come un processo dinamico comprendente l'insieme delle modificazioni reattive che compaiono nelle strutture vascolari e connettivali di un distretto organico, per arginare e riparare i danni prodotti da agenti lesivi di diversa natura. Nonostante l'infiammazione sia un processo localizzato, non rimane estraneo l'organismo nel suo insieme. Infatti, anch'esso risponde agli stimoli flogogeni, sia con modificazioni neuro-ormonali, sia con l'attivazione del sistema linforeticolare, che comporta un'esaltazione della fagocitosi ed un aumento della produzione di anticorpi. Sebbene nella maggior parte dei casi l'infiammazione svolga un compito difensivo, tendente a soffocare un'azione lesiva o a circoscriverla ad un territorio limitato, in alcuni casi la reazione difensiva supera largamente le necessità di risposta agli insulti, e produce essa stessa un danno. Già nel I secolo d.C. un noto studioso romano, Cornelio Celso, definiva le caratteristiche fondamentali dell'infiammazione (Fig.1.1), caratteristiche, che ancora oggi, rappresentano i primi segni evidenti della comparsa di una risposta infiammatoria :

- **Rubor**, *rossore*, fenomeno iniziale dipendente dall'aumento della quantità di sangue che giunge al tessuto infiammatorio;
- **Calor**, *calore*, aumento della temperatura dell'area lesa dipendente sia dall'incremento di sangue in loco, che da una lesione metabolica mitocondriale responsabile della degradazione, in energia termica, di una quota di quella chimica proveniente dalle ossidazioni;
- **Tumor**, *tumefazione*, aumento della permeabilità dei vasi capillari determinante per la fuoriuscita di liquidi verso l'interstizio;
- **Dolor**, *dolore*, espressione delle modifiche biochimiche locali, rapidamente avvertite dalle terminazioni nervose;
- **Functio laesa**, *funzione lesa*, incapacità della zona colpita dall'infiammazione, di mantenere inalterate le proprie capacità funzionali che saranno quindi, in varia misura, diminuite.



**Figura 1.1** Segni cardinali del processo infiammatorio

L'origine di un'inflammatione può essere di ordine

- Fisico (caldo, freddo, correnti elettriche, ultrasuoni, radiazioni eccitanti e ionizzanti),
- Chimico (sostanze irritanti, veleni, tossine microbiche, complesso antigene-anticorpo, prodotti anormali del metabolismo),
- Biologico (parassiti, batteri, miceti, protozoi, virus).

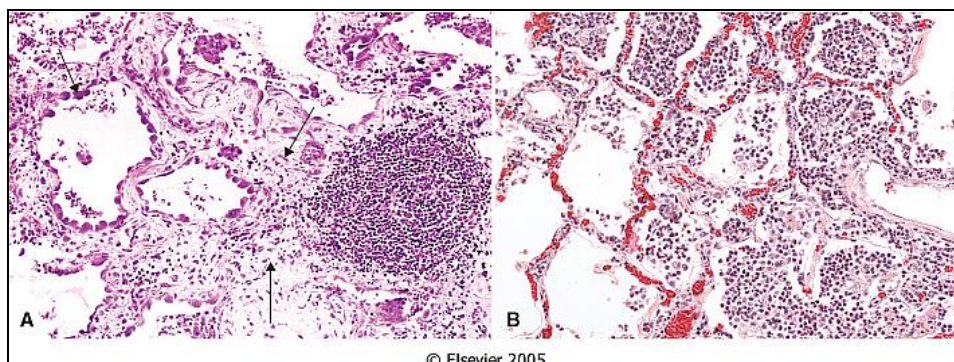
Le *cause fisiche* agiscono soprattutto indirettamente, attraverso la liberazione di sostanze da parte delle cellule e dei tessuti lesi. Sperimentalmente, è, invece, più facile provocare l'*inflammatione chimica* applicando, ad esempio sulla cute sostanze irritanti come l'olio di croton e la trementina; anche l'aumento della concentrazione di certi metaboliti endogeni, in un tessuto, è spesso causa di inflammatione chimica. Tuttavia, le *cause biologiche* sono tra le più frequenti nell'induzione della flogosi. In esse, l'azione dei microrganismi batterici dipende essenzialmente dalla loro capacità moltiplicativa e dall'intervento di prodotti del loro metabolismo (*esotossine*) sui tessuti o di costituenti chimici della parete batterica, che si liberano dopo la morte dei microrganismi (*endotossine*). Per fenomeni di glicolisi aerobica ed

anaerobica essi provocano nel territorio infiammato la formazione di acido lattico e  $\text{CO}_2$ , alterando così l'equilibrio acido-basico dei tessuti.

## 1.2 Classificazione dei processi infiammatori

Sulla base di un criterio temporale è possibile classificare l'infiammazione in due tipi differenti (Fig.1.2):

- **Acuta** (*Angioflogosi*) di breve durata: minuti, ore o al massimo pochi giorni. È caratterizzata da alterazioni vascolari, responsabili di un aumento del flusso sanguigno, da edema e da migrazione leucocitaria (soprattutto dei neutrofili provenienti dalla microcircolazione) e dal loro accumulo nella regione del danno;
- **Cronica** (*Istoflogosi*) di lunga durata, in cui i processi infiammatori, il danno tissutale ed i tentativi di riparo avvengono contemporaneamente e le cui cause possono essere differenti, ad esempio un'infezione batterica persistente, la prolungata esposizione ad un agente tossico, una malattia autoimmune, l'invecchiamento, etc. Può essere altresì determinata dalla persistenza di uno stimolo infiammatorio responsabile di una manifestazione acuta. È caratterizzata dall'infiltrazione di cellule mononucleate (macrofagi, linfociti e plasma-cellule), dalla contemporanea presenza di danno tissutale, angiogenesi e fibrosi.



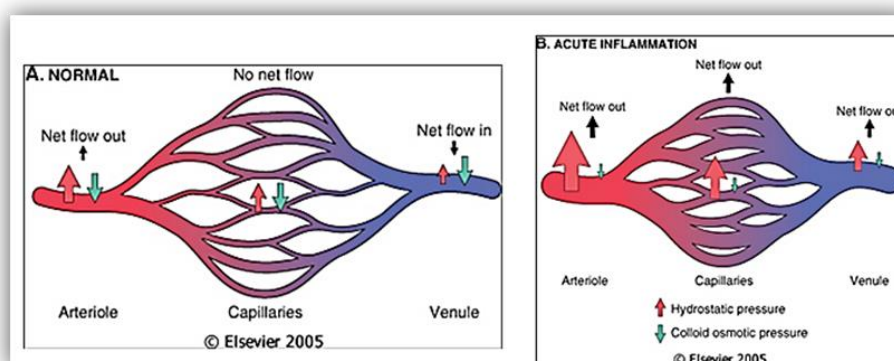
**Figura 1.2** A. *Infiammazione cronica nei polmoni, caratteristiche istologiche: (1) raduno di cellule dell'infiammazione cronica, (2) distruzione del parenchima (gli alveoli normali sono rimpiazzati da spazi costeggiati da epitelio cuboidale, frecce) e (3) sostituzione con tessuto connettivo (fibrosi, frecce)* B. *Nell'infiammazione acuta dei polmoni (broncopolmonite acuta), i neutrofili riempiono lo spazio alveolare e i capillari sanguigni sono congestionati.*

Più nel dettaglio, il processo infiammatorio acuto consta di 5 fasi didatticamente distinguibili:

- I. La fase iniziale:** dopo l'arrivo dell'agente flogogeno, si instaura una vasocostrizione fugace e breve delle arteriole precapillari situate nell'immediata vicinanza della zona colpita. Tale vasocostrizione dipende dalla liberazione in loco di catecolamine;
- II. La vasodilatazione:** segue alla fase iniziale ed inizia in corrispondenza delle arteriole precapillari, inducendo il rilassamento degli sfinteri precapillari e provocando l'apertura di nuove vie collaterali per il sangue, che rapidamente le occupa. La

vasodilatazione si associa immediatamente ad un aumento della permeabilità capillare, dipendente dalla liberazione di istamina o di sostanze istamino-simili (*sostanza H*) e dalla liberazione di proteasi e di prostaglandine;

- III. L'essudazione:** rappresenta la fuoriuscita della fase liquida dai vasi, che si raccoglie negli spazi extracellulari e nella sostanza fondamentale del connettivo, stabilendo il cosiddetto *edema infiammatorio*. L'essudazione è la logica conseguenza di quanto è avvenuto nei vasi nella fase precedente, caratterizzata dalla vasodilatazione, la quale porta ad un aumento della massa del sangue presente e della pressione che esso esercita sulle pareti, oltre che dall'aumento della permeabilità. Le condizioni che determinano il passaggio del liquido attraverso la parete dei capillari (nei due sensi) risultano da un complesso equilibrio fra la pressione idrostatica (cioè il peso del sangue operante sulle pareti) e quella oncotica (che dipende dalla quantità di proteine presenti, a loro volta dipendenti dalla condizione di permeabilità dei vasi);



**Figura 1.3.** Pressione sanguigna e forza osmotica nella microcircolazione normale ed infiammata.

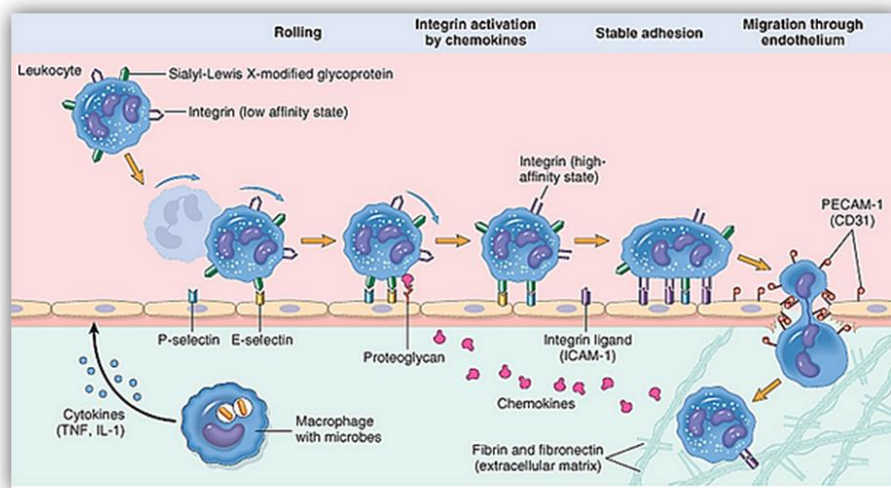
**A** La normale pressione idrostatica (freccia rossa) è di circa 32mmHg al termine arterioso e di 12mmHg al termine venoso. La pressione osmotica media del tessuto è di circa 25mmHg (freccia verde), ed è uguale alla pressione capillare media.

**B** Nell'infiammazione acuta la pressione dell'arteriola sale a 50mmHg, la pressione capillare media è aumentata a causa della dilatazione arteriorale e la pressione venosa aumenta a circa 30mmHg. Nello stesso momento la pressione osmotica si riduce a 20mmHg ca. per la perdita di proteine attraverso le venule. Il risultato netto è un eccesso di extravasazione di fluidi con formazione di edema.

- IV. La diapedesi:** processo secondo il quale si ha la migrazione dei leucociti dai vasi verso il tessuto. I globuli bianchi, che normalmente occupano la porzione centrale del

capillare, cominciano ad aderire alle pareti, su cui rotolano con sempre minore velocità, finché vi restano invischiati e si arrestano. A questo punto cominciano ad emettere pseudopodi, alcuni dei quali si insinuano nella parete, fino ad attraversarla; il passaggio all'esterno è completato dal trasferimento della maggior parte del protoplasma, che segue gli pseudopodi riversandosi in essi. I tempi fondamentali della diapedesi sono:

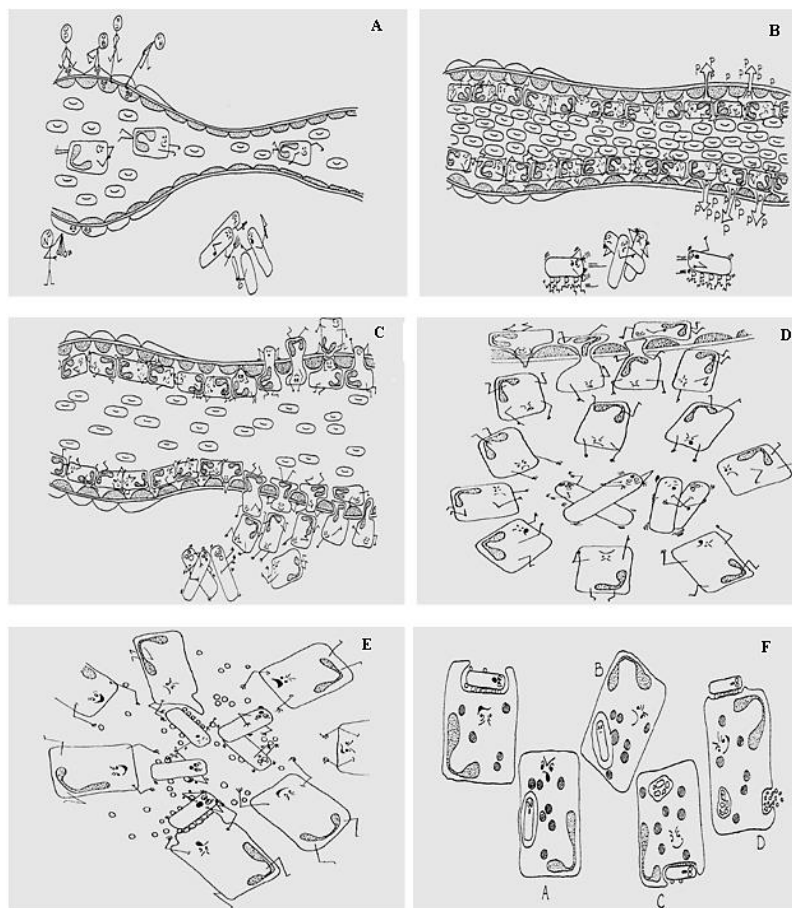
- L'attrazione chemiotattica dei leucociti verso la zona lesa;
- L'adesione dei leucociti alle pareti del vaso;
- L'attraversamento della parete da parte dei leucociti (*esodiapedesi*);
- L'*endiapedesi* dei globuli bianchi. Una volta usciti dai vasi, essi migrano nel tessuto dove esercitano le loro azioni fagocitarie.



**Figura 1.4.** Il processo di migrazione tissutale attraverso i vasi sanguigni. In questo caso sono rappresentati i neutrofili. I leucociti prima ruotano, poi vengono attivati e aderiscono all'endotelio da chemoattraenti emessi nella zona della lesione. Tra le molecole coinvolte nel processo ricordiamo le selectine nella rotazione, le chemochine nell'attivazione, le integrine nell'adesione e le CD31(PECAM-1) nella transmigrazione.

- V. **La stasi:** le prime fasi del processo infiammatorio sono caratterizzate da un aumento della velocità del circolo. In seguito, dopo l'essudazione e la diapedesi, la velocità ematica tende a diminuire fino a giungere a valori nettamente al di sotto del normale

(stasi). L'iperemia ora non dipende più tanto dalla vasodilatazione attiva, quanto dal rallentamento del circolo locale e dal diminuito ritorno venoso. La stasi porta con sé gravi conseguenze per il trofismo dei tessuti e degli endoteli, già gravemente compromessi

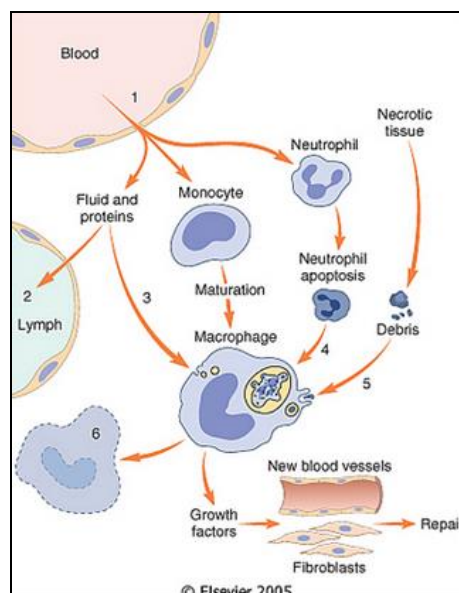


**Figura 1.5** *A. Dopo uno stimolo infiammatorio alcuni mediatori e riflessi neurogeni provocano dilatazione arteriolare B. Gli elementi cellulari si ridistribuiscono con stasi eritrocitaria C. I leucociti migrano negli spazi extravascolari e iniziano a muoversi verso lo stimolo infiammatorio D. I leucociti, si accumulano nel focus infiammatorio E. Opsonizzazione delle particelle infiammatorie con stimolo degli specifici recettori sui leucociti. F. Le particelle attaccate sono inglobate nel fagosoma(A); uccise dopo fusione del fago-lisosoma (B); digerite(C); ed espulse (D).*

Nella fase acuta dell'evento patologico vengono coinvolte diverse entità cellulari come:

- **Granulociti neutrofili:** Si ritrovano sulla parete dell'endotelio vascolare e sono i primi ad entrare in azione in quanto posseggono un citoplasma ricco di enzimi quali ossidasi, idrolasi ed enzimi lisosomiali che consentono al granulocita di fagocitare la *noxa* patogena e digerirla;
- **Mastociti:** Si ritrovano nel connettivo e nelle mucose e vengono ugualmente coinvolti nelle fasi iniziali dell'infiammazione producendo istamina (rilasciata in caso di traumi fisici, chimici, e termici) nonché PGD<sub>2</sub>, leucotrieni, idrolisi acide e fattori chemiotattici;
- **Monociti macrofagi:** Intervengono nella fase iniziale dell'infiammazione acuta. Hanno capacità fagocitarie e sono in grado di secernere fattori chemiotattici come IL-1, TNF, PAF;
- **Endotelioцитi:** Producono il PAF e le molecole di adesione;
- **Eosinofili:** Sono implicati nelle infiammazioni allergiche ed hanno scarse capacità fagocitarie, ma sono ricchi di granuli e sono in grado di produrre l'anione superossido in grandi quantità

Detto ciò, si identificano svariati esiti di un processo infiammatorio acuto tra i quali si annoverano la restituzione o risoluzione dell'evento, la formazione di un ascesso, la riparazione fibrosa (o *cicatrice*) e il fenomeno della cronicizzazione o infiammazione cronica.



**Figura 1.6** Eventi della terminazione dell'infiammazione. (1) Ritorno alla normale permeabilità vascolare (2) Drenaggio del fluido edematoso e delle proteine nel sistema



linfatico (3) o tramite pinocitosi nei macrofagi (4) Fagocitosi dei neutrofili apoptotici (5) Fagocitosi dei detriti necrotici e (6) disimpegno dei macrofagi.

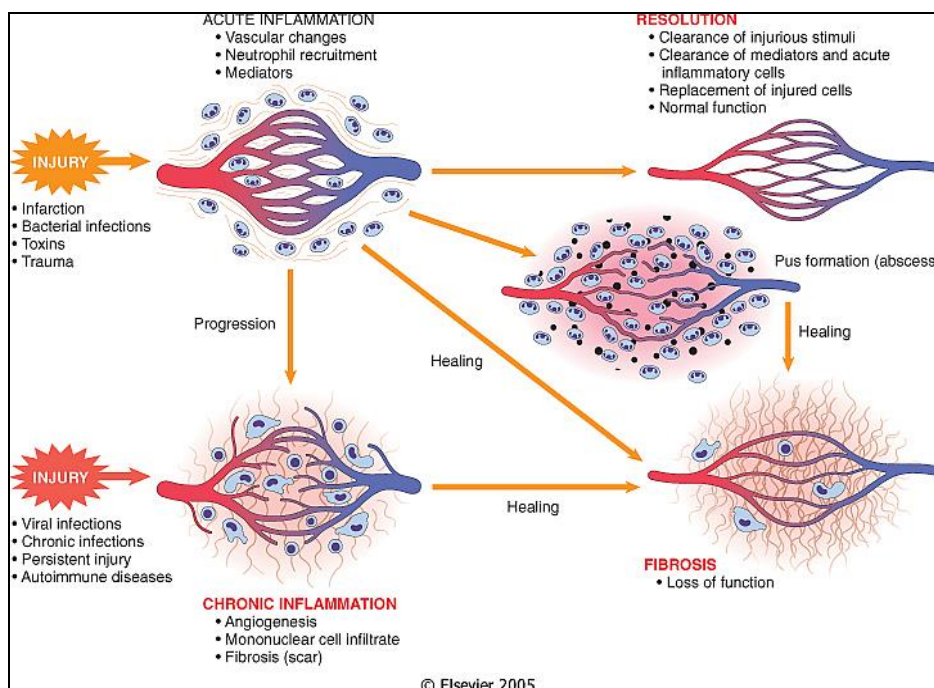
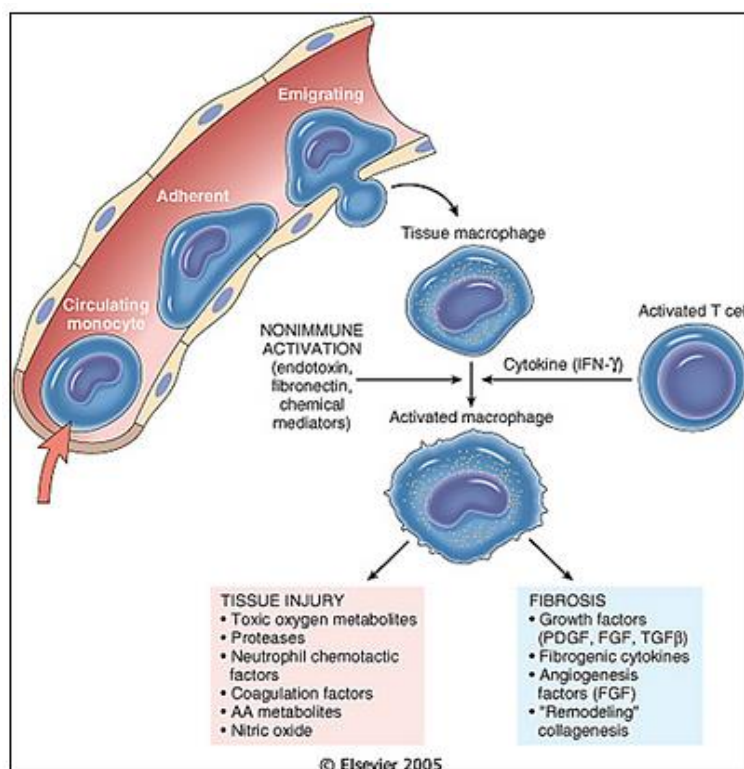


Figura 1.7 Possibili destini di un processo infiammatorio

Le caratteristiche distintive di quest'ultimo processo sono meglio apprezzate comparandole con quelle dell'infiammazione acuta, dove la risposta dell'ospite può comportare l'eliminazione dell'agente irritante, seguita da una ripresa che comprende il riparo e la rigenerazione del tessuto; per l'infiammazione cronica, invece, si osserva che infiammazione e riparo avvengono in contemporanea, piuttosto che in successione. Il riparo è tipicamente raggiunto tramite una crescita verso l'interno di tessuto di granulazione, che consiste di macrofagi, fibroblasti e nuovi vasi sanguigni.

Quando l'agente irritante nell'infiammazione cronica non riesce ad essere eliminato (sia a causa delle sue caratteristiche innate che di una risposta dell'ospite inefficace), esso può causare la continua formazione di tessuto danneggiato. Inoltre, la maggior parte degli agenti irritanti persistenti sono riconosciuti come antigeni estranei dalla risposta immunitaria dell'ospite, che contribuisce al processo d'infiammazione cronica e può aggiungersi alla distruzione del tessuto. Questo è ben evidenziato in processi patologici quali tubercolosi e schistosomiasi, dove gli agenti stimolanti persistono nell'ospite e continuano a suscitare una risposta di infiammazione cronica.

Altre importanti distinzioni tra l'infiammazione acuta e cronica riguardano il bilancio relativo tra l'essudato e il rinvigorismento cellulare, così come i tipi di cellule che predominano nella risposta infiammatoria. Nell'infiammazione cronica c'è tipicamente una risposta essudativa meno pronunciata (sebbene ciò sia ancora da dimostrare) che può essere accompagnata da proliferazione cellulare locale. A differenza dell'infiammazione acuta, la cellula infiltrante dominante in tutte le forme di infiammazione cronica è *il macrofago*.



**Figura 1.8.** Il ruolo dei macrofagi nell'infiammazione cronica. I macrofagi sono attivati da citochine dei linfociti T attivati (in particolare dall'interferone  $\gamma$ , INF- $\gamma$ ) o da stimoli non immunologici come le endotossine.

A seconda della natura dell'agente irritante, sono generati, *in loco*, differenti mediatori infiammatori e fattori di crescita (collettivamente riferiti come *citochine*), responsabili di una serie di modelli morfologici dell'infiammazione cronica.

Gli effetti sistemici dell'infiammazione mediati dalle citochine, sono più pronunciati nelle malattie ad infiammazione cronica che in quelle ad infiammazione acuta: febbre, brividi e

leucocitosi per l'acuta, affaticamento, sonnolenza, febbre, sudore notturno, anoressia, perdita di peso e deperimento per la cronica.

**Tabella 1.1** *Principali differenze tra l'infiammazione acuta e cronica*

|                   | Acuta                                                       | Cronica                                                    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>Durata</b>     | Pochi giorni                                                | Settimane o mesi                                           |
| <b>Clinica</b>    | Sintomatica, funzionalità e morfologia vengono ripristinate | Esordio asintomatico e a lungo termine                     |
| <b>Istologia</b>  | Alterazioni vascolari; infiltrazioni di neutrofili          | Infiltrazione di macrofagi e linfociti                     |
| <b>Guarigione</b> | Processi finali di guarigione                               | Tentativi di guarigione simultanei a processi infiammatori |

### 1.3 I mediatori dell'infiammazione

Accanto alle entità cellulari della risposta infiammatoria, agisce tutta una serie di mediatori chimici discriminabili in mediatori plasmatici e cellulari. La maggior parte di essi espleta la propria attività interagendo con determinate strutture recettoriali localizzate sulle cellule bersaglio stimolando, in taluni casi, il rilascio di altri mediatori (mediatori secondari) e amplificando o controbilanciando l'azione del mediatore iniziale.

**I mediatori di origine cellulare** sono, in condizioni normali, sequestrati all'interno di appositi granuli intracellulari e all'occorrenza opportunamente secreti (es. istamina contenuta nei granuli dei mastociti); in alternativa, tali mediatori possono essere sintetizzati *de novo* in risposta ad uno stimolo (es. i derivati dell'acido arachidonico).

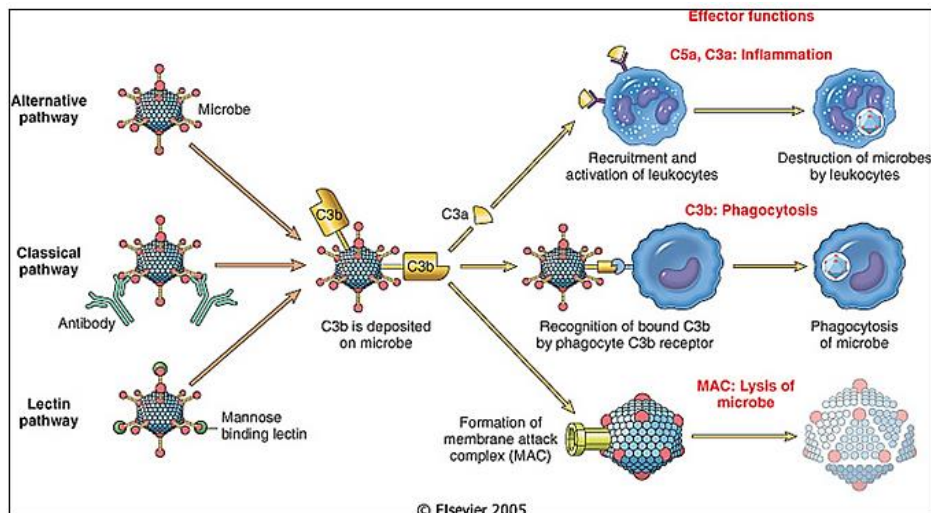
Le fonti principali di mediatori di origine cellulare sono le piastrine, i neutrofilo, i monociti/macrofagi, e i mastociti, anche se le cellule di origine mesenchimale (cellule endoteliali, cellule della muscolatura liscia, fibroblasti) e la maggior parte delle cellule epiteliali possono essere stimolate ad elaborare alcuni dei mediatori. Tra quelli di natura cellulare ricordiamo:

- **Istamina:** Prodotta per decarbossilazione dell'istidina viene immagazzinata all'interno di granuli citoplasmatici presenti nei basofili del sangue e nei mastociti situati nella zona danneggiata. Il suo rilascio avviene per degranulazione citoplasmatica in seguito alla stimolazione esercitata da stimoli fisici e chimici, ed una volta liberata esplica un'azione vasodilatante a livello delle arteriole (vasocontratturante a livello delle grandi arterie). Sembra, inoltre, che l'istamina sia il principale mediatore dell'immediato aumento della permeabilità vascolare e la sua azione sul microcircolo avviene attraverso i recettori  $H_1$ .
- **Serotonina:** È un secondo mediatore vasoattivo con azione simile a quella dell'istamina e presente nelle piastrine e nelle cellule enterocromaffini.
- **Eicosanoidi:** Vengono prodotti in seguito allo stimolo infiammatorio partendo dall'acido arachidonico, attraverso la via ciclossigenasica e lipossigenasica. Ne distinguiamo diversi tipi quali *PGE* (ad attività vasodilatante, iperpiretica ed iperalgesica) *PGI<sub>2</sub>* (ad attività vaso dilatante e prodotta dalle cellule endoteliali), *PGD<sub>2</sub>* (vasodilatante e prodotto dei mastociti), *TXA<sub>2</sub>* (vasocostrittore, pro-aggregante piastrinico prodotto dai macrofagi e dalle piastrine) e leucotrieni (con azione chemiotattica per i neutrofilo come *LTB<sub>4</sub>* e con azione broncocostrittrice e chemiotattica per gli eosinofili come *LTC<sub>4</sub>* e *LTD<sub>4</sub>*).

- **Citochine:** Sono strutture proteiche implicate anche nelle risposte immunitarie, ed hanno effetti pleiotropici in quanto possono agire su differenti tipi di cellule. Possono essere suddivise in cinque classi in base alla funzione principale o in relazione al tipo di cellula bersaglio come le *interleuchine* (*IL-2*, *IL-4*), che regolano l'attivazione, la proliferazione e il differenziamento dei linfociti; l'*interferone* e il *TNF* che attivano i macrofagi durante le risposte immunitarie cellulo-mediate; le *chemochine*, che svolgono un'azione chemiotattica nei confronti di vari leucociti. Le citochine possono essere inoltre di due tipi *TH-2* (favoriscono la flogosi acuta) e *TH-1* (favoriscono la flogosi cronica).

**I mediatori di origine plasmatica** sono, invece, presenti in circolo sotto forma di precursori che devono essere attivati, di norma attraverso una serie di tagli proteolitici, per acquisire le loro proprietà biologiche specifiche. Esempi di tali mediatori sono:

- **Sistema del complemento:** Costituito da 20 proteine inattive presenti in concentrazioni molto alte nel plasma è coinvolto nell'azione di difesa contro i microrganismi, che culmina con la lisi del microbo ad opera del cosiddetto *complesso di attacco alla membrana (MAC)*. Durante tale processo si originano una serie di prodotti del complemento che causano l'aumento della permeabilità vascolare e sono coinvolti nella chemiotassi.



**Figura 1.9.** L'attivazione e le funzioni del sistema del complemento. L'attivazione del complemento da diverse vie porta al taglio della proteina C3. Le funzioni del sistema del

complemento sono mediate dai prodotti di taglio della C3, da altre proteine del complemento e dal complesso di attacco della membrana (MAC, membrane attack complex)

- **Sistema delle chinine:** Tale sistema genera peptidi vasoattivi a partire da proteine plasmatiche chiamate *chininogeni* per azioni di proteasi specifiche chiamate *callicreine*. Il sistema delle chinine porta al rilascio finale del nonapeptide vasoattivo *bradichinina*, un potente mediatore in grado di aumentare la permeabilità vascolare e di promuovere la contrazione della muscolatura liscia.

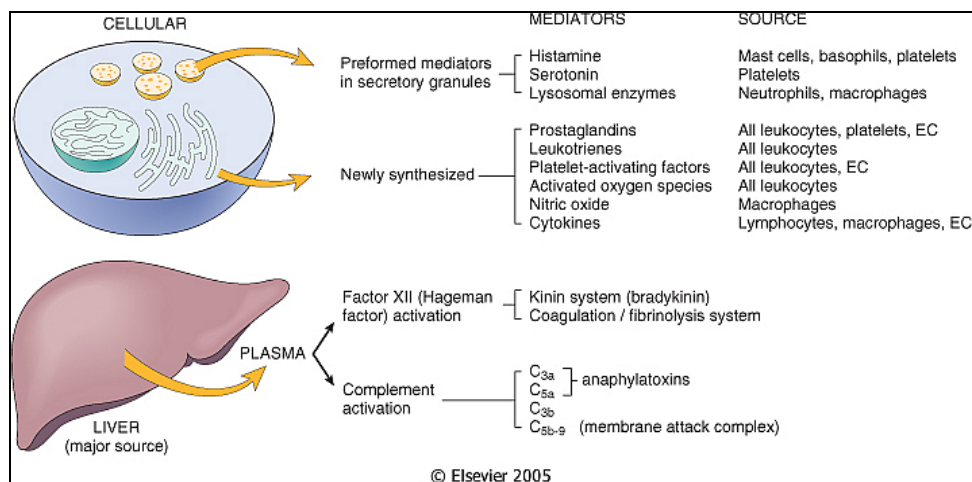
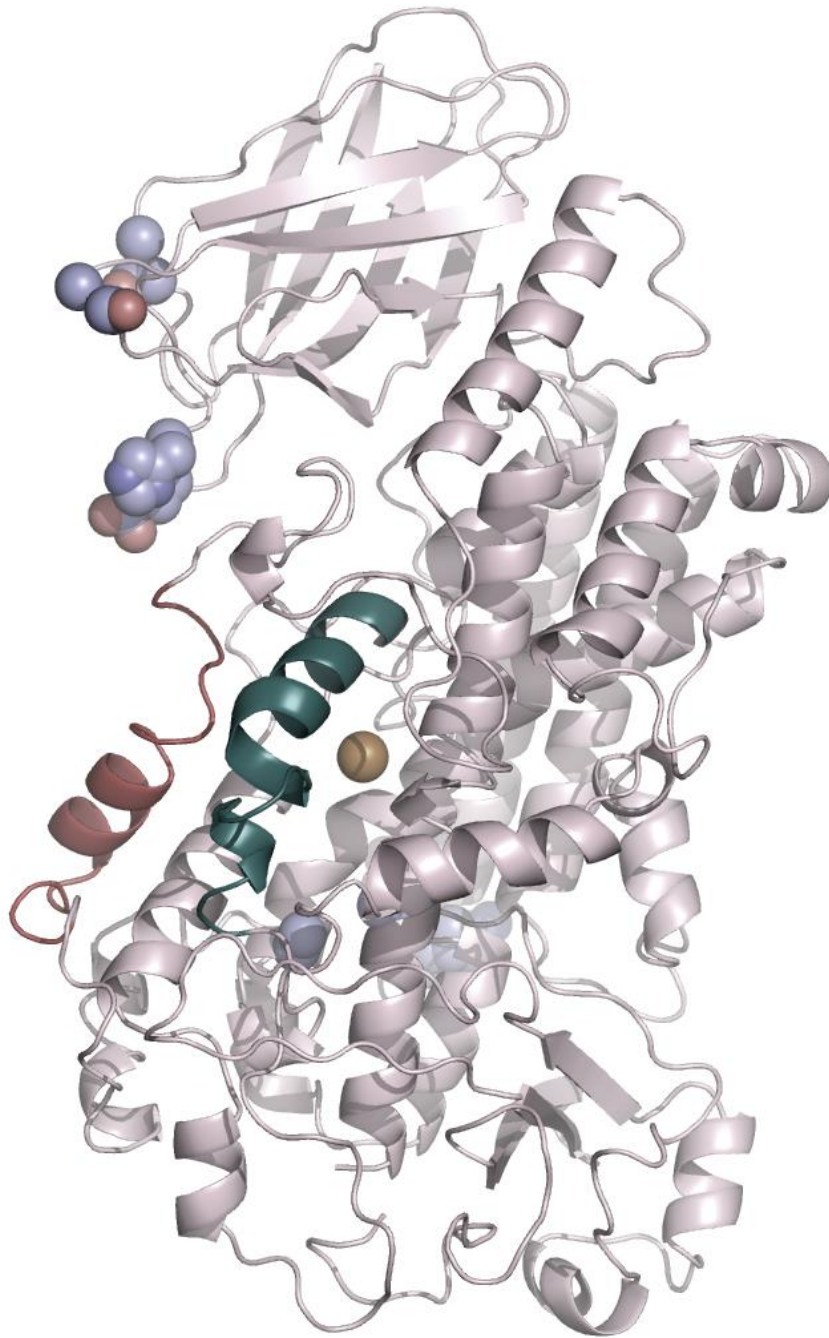


Figura 1.10. Mediatori del processo infiammatorio

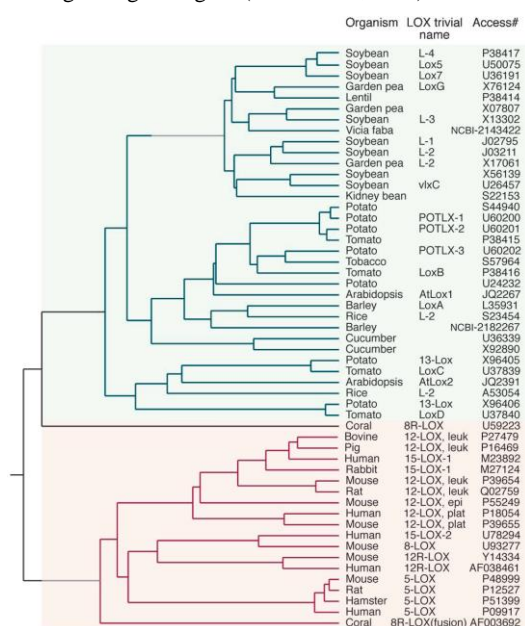


**CAPITOLO II**  
**L'ARACHIDONATO 5-LIPOSSIGENASI**

## 2.1 Le diverse classi di lipossigenasi.

### 2.1.1 Struttura delle Lipossigenasi

Si identifica con il termine di *lipossigenasi* (*Linoleato ossigeno ossidoreduttasi*, nota più comunemente con l'abbreviazione di **LOX**) una famiglia eterogenea di enzimi in grado di perossidare i lipidi e di causare l'ossigenazione di acidi grassi polinsaturi trasformandoli, così, nei corrispettivi derivati idroperossidici. Gli acidi grassi insaturi, essenziali per la sopravvivenza degli esseri umani, risultano essere assenti in molti batteri ed organismi procarioti nei quali, di conseguenza, le LOXs non compaiono nel patrimonio enzimatico cellulare. D'altro canto, tali ossidoreduttasi sono ampiamente espresse in organismi sia di origine animale che vegetale e la loro attività è di fondamentale importanza per la sintesi di differenti segnali molecolari responsabili, altresì, di profondi cambiamenti metabolici e strutturali all'interno delle cellule. (Maccarrone et al., 2001)(Kühn et al., 1999). Un albero filogenetico (riportato in **Fig. 2.1**) è stato stilato separando le forme enzimatiche rilevate nei vegetali rispetto a quelle presenti nei tessuti animali, annoverando anche i corrispondenti sottogruppi all'interno di ogni singolo regno. (Brash et al., 1999)

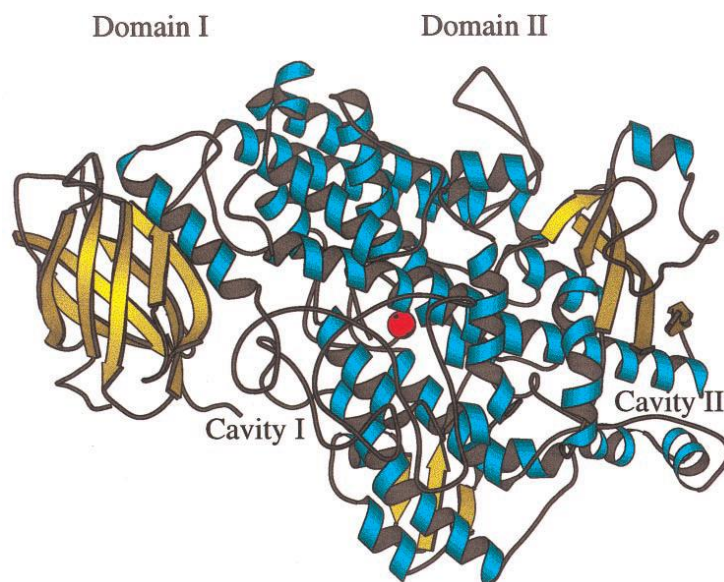


**Figura 2.1** Albero filogenetico delle Lipossigenasi animali e vegetali

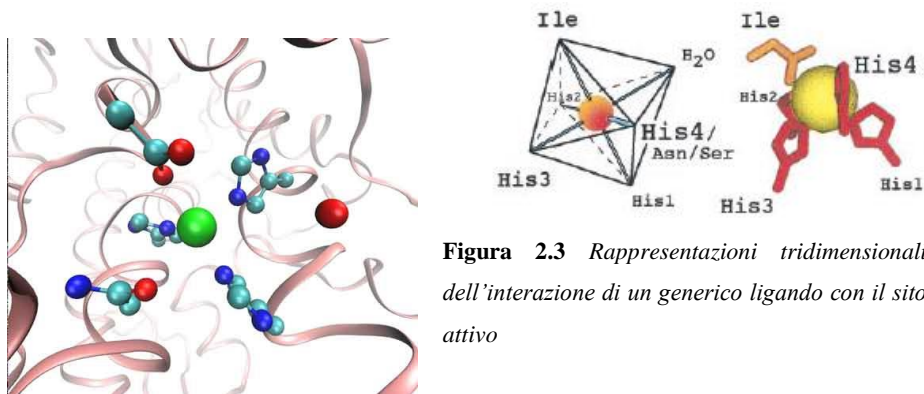
Per lungo tempo si è ritenuta valida l'osservazione secondo la quale le LOXs non fossero presenti negli animali, fino a quando nel 1974 la formazione dell'acido (12*S*, 5*Z*, 8*Z*, 10*E*, 14*Z*) 12-idrossieicoso 5,8,10,14 tetranicoico (**12-HETE**) venne descritta a seguito di esperimenti condotti su trombociti umani, incubati con acido arachidonico esogeno (Hamberg et al., 1974).



Tale fenomeno rappresentò il punto di partenza della spasmodica ricerca delle LOXs nelle cellule animali che, da quegli anni, si estese esponenzialmente permettendo l'identificazione di una lunga serie di isoforme. Nel 1975, un'isoforma delle LOXs fu rilevata nei reticolociti di coniglio, dove sembrò essere coinvolta nell'ossidazione dei fosfolipidi di membrana (Schewe *et al.*, 1975). Le prime informazioni relative alla struttura proteica della classe enzimatica di interesse, provengono da studi sulla LOX-1 ritrovata nella soia e sui suoi isozimi contenuti in altre specie vegetali. Valutazioni sulla sequenza primaria e sulla struttura tridimensionale dell'enzima mostrano che si tratta di un ellissoide di  $90 \times 65 \times 60 \text{ \AA}$ , formato da un susseguirsi di 839 residui aminoacidici e da una massa molecolare di 93.840 Da. (Brash *et al.*, 1999). Nella LOX-1 sono ampiamente identificabili, due domini: una porzione a  $\beta$ -barrel (di 146 amminoacidi) presso l'estremità N-terminale (**dominio I**) e un'  $\alpha$ -elica (di 693 amminoacidi) presso l'estremità C-terminale (**dominio II**).



**Figura 2.2** Rappresentazione tridimensionale della struttura della Lipossigenasi-1 della soia. Il sito attivo, contenente Ferro, è situato al centro del dominio II, dove interagisce con quattro Istidine e con il gruppo carbossilico C-terminale di una Isoleucina (**fig.2.3**). Il sito attivo è raggiungibile attraverso le due cavità (**I e II**), come illustrato nella figura 7



**Figura 2.3** Rappresentazioni tridimensionali dell'interazione di un generico ligando con il sito attivo

La **Cavità I** presenta un percorso ideale per l'accesso dell'ossigeno molecolare al ferro, mentre la **cavità II** è in grado di ospitare l'acido arachidonico o anche acidi grassi leggermente più grandi. Le Lipossigenasi presenti nei mammiferi mancano del dominio N-terminale presente nella LOX-1 della soia (e delle isoforme di lipossigenasi vegetali), mostrando, quindi, una minore massa molecolare (75-80 KDa rispetto ai 94-104 KDa degli enzimi vegetali). Il dominio N-terminale della LOX-1 possiede un solo largo contatto con il dominio C-terminale che, per le lipossigenasi vegetali, risulta essere superfluo, dato che, tutte le catene laterali aminoacidiche responsabili della catalisi, sono posizionate nel dominio C-terminale. Tuttavia, esperimenti di proteolisi indicano che i due domini sono, invece, strettamente connessi e che le interazioni dominio-dominio possono giocare un ruolo essenziale nel *reversible unfolding* della LOX-1, attraverso interazioni ioniche. È necessario sottolineare, inoltre, che la LOX-1 possiede, nella forma inattiva, un ferro nel suo **stato di ossidazione  $Fe^{2+}$**  che, al fine di espletare la sua attività catalitica, necessita l'ossidazione allo stato  **$Fe^{3+}$** . (Maccarrone *et al.*, 2001)

### 2.1.2 Catalisi stereochimica

Formalmente, la reazione catalizzata dalle LOX si compone di quattro *steps* consecutivi (**fig. 2.4**): (i) *acquisizione del substrato*, (ii) *rimozione stereo-selettiva di un idrogeno da un gruppo metilenico allilico*; (iii) *riarrangiamento radicalico* ([+2] e [-2]) accompagnato da una *Z,E-coniugazione dienica*; (iv) *addizione stereospecifica (S- o R-)* dell'ossigeno molecolare e *riduzione della forma anionica dell'intermedio radicalico perossidico*.

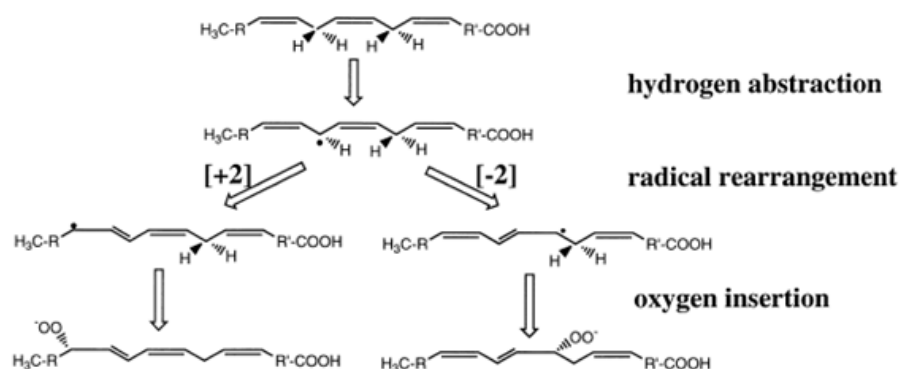


Figura 2.4 Meccanismo radicalico della reazione catalizzata dalle LOXs

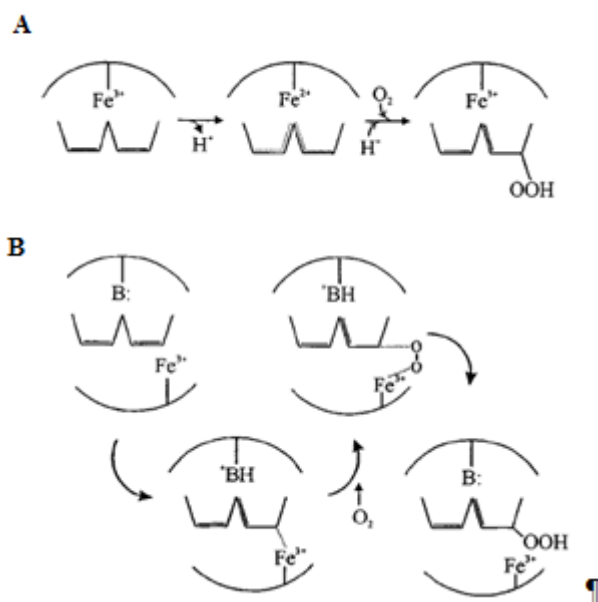
- **Acquisizione del substrato**

Il substrato delle lipossigenasi è costituito da acidi grassi polinsaturi tra cui l'acido arachidonico e l'acido linoleico. Per azione di una fosfolipasi, si ha la liberazione degli acidi grassi a partire dai fosfolipidi di membrana. Tali substrati, caratterizzati da un  $pK_a$  compreso tra 7 e 8.5 ed un  $\log P$  di circa 7, si presentano in una forma parzialmente ionizzata e quindi scarsamente solubile nei fluidi biologici, pertanto hanno poca tendenza ad allontanarsi dalla membrana. In tali condizioni essi vanno ad ancorarsi (con la loro lunga coda idrofobica) alla porzione idrofobica del doppio strato lipidico, esponendo le porzioni più polari (il gruppo carbossilico, carico o neutro) a contatto con l'ambiente acquoso o con le teste idrofiliche dei fosfolipidi stessi. Attualmente sono riportati due diverse teorie che spiegherebbero il meccanismo con cui la LOX viene in contatto con il substrato. Il primo prevede il coinvolgimento di una proteina carrier (**FLAP**) la quale sarebbe in grado di legare il substrato e presentarlo all'enzima. Il secondo meccanismo si basa su interazioni di tipo *protein-protein* tra il dominio  $\beta$ -barrel delle LOXs e alcune lipoproteine di membrana, facilitando il processo di acquisizione del substrato. Ciò sembrerebbe legato all'omologia strutturale presente tra i domini delle lipasi di membrana e i domini  $\beta$ -barrel delle LOXs. Tra i due, il primo meccanismo risulta essere il più accreditato. (Brash *et al.*, 1999)

- **Rimozione dell'idrogeno**

Qualora osservassimo l'acido Arachidonico come substrato, sarà possibile identificare tre differenti gruppi metilenici allilici su cui la reazione si può sviluppare (**C-7**, **C-10**, **C-13**). Dal momento, però, che ognuno dei gruppi metilenici lega due idrogeni (un *pro-S* e un *pro-R*), sei saranno i differenti atomi potenzialmente rimuovibili. Tuttavia, la maggior parte delle lipossigenasi dei mammiferi seleziona un solo idrogeno, sulla base dell'orientamento del

substrato nel sito attivo (Kuhn et al., 1999) Tale processo avviene mediante il coinvolgimento dello ione ferro. Attualmente sono stati ipotizzati due meccanismi che spiegherebbero il ruolo dello ione ferro nel *cleavage* del legame C-H. Il primo meccanismo "free-radical" riguarderebbe la rimozione stereospecifica dell'idrogeno radicale dal gruppo metilenico del sistema pentadienilico, con formazione di un intermedio radicalico e la contemporanea riduzione del  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  (fig.2.5,A). Un'altra ipotesi (meccanismo di tipo "organoiron") prevederebbe un meccanismo concertato secondo cui avverrebbero, contemporaneamente, la deprotonazione del substrato a carico di un gruppo (B) basico dell'enzima e un attacco elettrofilo del ferro al substrato, senza alcuna modifica dello stato di ossidazione dello ione (fig.2.5,B) (Maccarrone et al., 2001; Brash et al., 2001).



**Figura 2.5** Modelli "free-radical" (A) e "organoiron" (B) di meccanismi per la rimozione dell'idrogeno

- **Riarrangiamento radicalico**

Il meccanismo classico della reazione catalizzata dalle LOXs coinvolge la formazione di un radicale pentadienilico. In questo intermedio, l'elettrone radicalico spaiato potrebbe delocalizzarsi sull'intero sistema pentadienilico, caratterizzato da una estesa planarità (fig.2.4). Dati strutturali più attuali (Minor et al., 1996) suggeriscono, però, che la formazione del radicale planare potrebbe essere ostacolata stericamente, pertanto si osserverebbe esclusivamente la formazione di un radicale allilico di tipo perossidico  $ROO\cdot$ , confinato in una

specifica porzione della molecola. Tale ipotesi sarebbe avvalorata da studi spettroscopici riguardanti l'interazione della LOX-1 della soia e l'acido linoleico (Nelson *et al.* 1994) secondo cui la direzione del riarrangiamento radicalico sarebbe funzione della conformazione che l'acido grasso assume nel sito attivo.

- **Addizione dell'ossigeno molecolare**

Al momento si ritiene che le LOXs non abbiano né un sito di legame specifico né un canale attraverso il quale l'ossigeno possa penetrare nel sito attivo. Pertanto, è stato suggerito che l'inserimento dell'ossigeno proceda mediante una diffusione controllata che permetta al gas di migrare verso la stessa cavità cui migrano gli acidi grassi (Kühn *et al.*, 1999)

### 2.1.3 R- o S- Lipossigenasi?

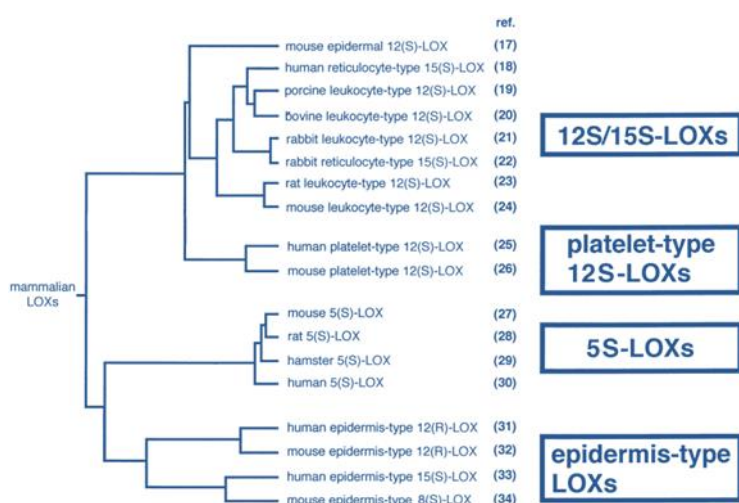
La maggior parte delle lipossigenasi, forma prodotti con una stereochimica di tipo S-. Ciò nonostante, ci si è resi conto che tali enzimi, sono in grado di catalizzare la reazione di formazione dei composti anche con stereochimica opposta (R-), identificati in alcuni invertebrati acquatici (De Petrocellis *et al.*, 1994), in alcune specie vegetali e recentemente anche nell'uomo (Boeglin *et al.*, 1998). Le R-Lipossigenasi conterrebbero lo stesso sito catalitico e gli stessi domini comuni all'intera classe enzimatica, identificati a partire dalla S-LOX animale e vegetale (Brash *et al.*, 1996). Non sono riportate, però, allo stato attuale, informazioni certe circa le sequenze amminoacidiche necessarie per lo sviluppo di una stereochimica opposta che conferirebbero al prodotto una configurazione di tipo R-.

### 2.1.4 Classificazione

Secondo la nomenclatura in uso, le LOXs sono classificate sulla base della posizione scelta sul substrato, come sito per l'ossigenazione. Fino a poco tempo fa, si riteneva che tre fossero le principali isoforme delle LOXs esistenti nei mammiferi:

- i. **Arachidonato 5-Lipossigenasi,**
- ii. **Arachidonato 12-Lipossigenasi,**
- iii. **Arachidonato 15-Lipossigenasi.**

Tale nomenclatura è di semplice applicazione e risulta essere abbondantemente accettata dalla comunità scientifica. Tuttavia, la crescente diversità della famiglia delle LOXs ha imposto una modifica della vecchia nomenclatura che non era in grado di discriminare tra isoforme di lipossigenasi, filogeneticamente differenti e con diversa omologia. Osservando l'albero filogenetico delle LOXs di mammifero, risulta evidente la possibilità di poter suddividere la classe enzimatica in quattro gruppi differenti.



**Figura 2.6** Albero filogenetico di tutte le LOXs di mammifero

In questa rappresentazione, tutte le 12-LOXs leucocitarie e tutte le 15-LOXs reticolocitarie sono raggruppate in un solo grande insieme. Questa classificazione sembrerebbe essere adeguata anche dal punto di vista enzimologico dato che le isoforme di lipossigenasi sono molto simili alle altre del gruppo, rispettando le proprietà enzimatiche (specificità del substrato, reattività and assemblaggio lipide-proteina) (Kuhn *et al.*, 1999). Le più recenti forme di LOXs identificate, le lipossigenasi epidermiche, possono essere raggruppate insieme anche se, il sito di ossigenazione sul substrato non è analogo (Boeglin *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998, Brash *et al.*, 1997; Jisaka *et al.*, 1997). Fino ad ora, non è stato possibile reperire dati strutturali sulle LOXs epidermiche, né tantomeno ipotizzare modelli strutturali (sulla base dei dati ottenuti, da studi ai raggi X) dalle 15-LOXs reticolocitarie del coniglio, a causa del basso grado di omologia. (Kühn *et al.*, 1999)

### 2.1.5 Ruoli biologici delle principali LOXs dei mammiferi.

Per la maggior parte delle lipossigenasi, l'identificazione di un ruolo biologico è ancora lontana dal poter essere acquisita a pieno. E' noto che le LOXs sono coinvolte nella cascata dell'acido arachidonico per la biosintesi di ormoni lipidici, quali leucotrieni, lipossine e/o acidi grassi idrossidici. Ciò nonostante, diversi studi hanno messo in luce il coinvolgimento di alcuni sottotipi di LOXs (es. 15(S)-LOX reticolocitarie o 12(S)-LOX leucocitarie) in pathway differenti. In particolare è stato dimostrato il ruolo delle **15-LOXs reticolocitarie** nella crescita del reticolocita e nella sua maturazione ad eritrocita (Rapoport S.M. *et al.*, 1990). I monociti periferici umani non esprimono questo tipo di isoforma enzimatica delle LOXs (Conrad D.J. *et al.* 1992), ciò nonostante nei macrofagi (che si sviluppano dai monociti periferici) l'espressione

dei tali enzimi può essere, comunque, rilevata (Levy *et al.*, 1997), il che lascia presupporre un ruolo biologico nella transizione monocita/macrofago. Durante gli ultimi due anni, si è discusso abbondantemente su di un'implicazione delle **12/15-LOXs** nel fenomeno dell'aterogenesi. Il plausibile ruolo di tali enzimi sembrerebbe legato alla loro capacità di ossigenare acidi grassi polinsaturi esterificati a lipidi complessi.

Risulta ancora non del tutto chiaro il ruolo delle **LOXs epidermiche** e delle **12-LOXs piastriniche**. Ciò che è stato osservato è l'implicazione delle 12-LOXs (piastriniche ed epidermiche) nella biosintesi delle *epossiline*, molecole coinvolte nella regolazione del trasporto di ioni attraverso membrane e di varie lipossine, associate a processi immunologici ed emodinamici (Kuhn *et al.*, 1999).

## 2.2 L'Arachidonato 5-lipossigenasi: Struttura e funzioni

### 2.2.1 Il pathway biochimico della 5-LOX: la sintesi dei leucotrieni.

I leucotrieni costituiscono gli elementi di una delle più potenti classi di mediatori biologici, definiti nello specifico come derivati lipidici dall'acido arachidonico (Funk *et al.*, 2001). La loro biosintesi richiede un'attivazione cellulare che stimola la conversione dell'acido arachidonico in messaggeri biologicamente attivi. In presenza di uno stimolo esterno, **la Fosfolipasi A2** libera l'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana. Tale intermedio può essere attaccato da due differenti enzimi: le ciclossigenasi (COX-1 e COX-2), portano alla formazione di prostaglandine (PG) e trombassano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) mentre le lipossigenasi sono responsabili della sintesi dei leucotrieni (Dahlén S.E. *et al.*, 2006).

Lo *step* iniziale della biosintesi dei leucotrieni è rappresentato dall'acquisizione dell'acido arachidonico da parte della 5-lipossigenasi, **5-LOX** (Wertz, 2002). Questa diossigenasi solubile incorpora l'ossigeno molecolare alla posizione 5 dell'acido grasso, catalizzando la sua conversione nell'acido *5(S)-Idroperossieicosatetraoico* (**5-HPETE**). Quest'ultimo, per azione della stessa lipossigenasi, è ulteriormente convertito ad un derivato epossidico instabile, noto come *Leucotriene A<sub>4</sub>* (**LTA<sub>4</sub>**) (fig.2.7).

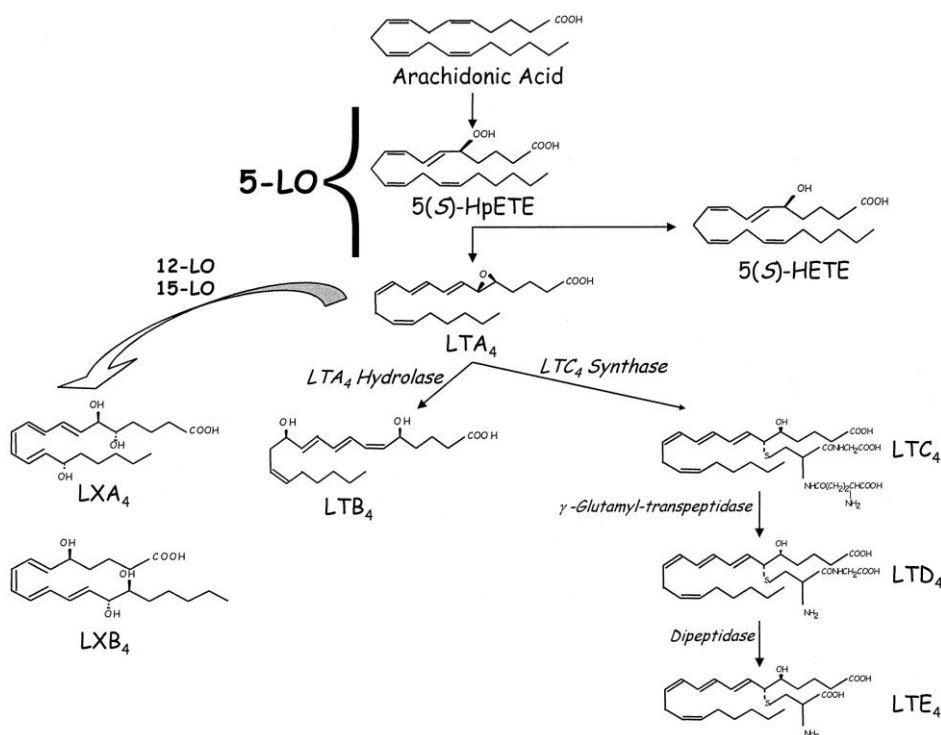


Figura 2.7 Il pathway della 5-Lipossigenasi

Il destino dell'epossido LTA<sub>4</sub> dipende, poi, dal tipo di cellula presa in considerazione e dal tipo di enzimi in essa presente:

- LTA<sub>4</sub> può essere convertito nel *leucotriene B<sub>4</sub>* (LTB<sub>4</sub>) per azione di una *LTA<sub>4</sub> idrolasi*, un enzima zinco-dipendente citosolico di 69kDa, presente nella maggior parte delle cellule dei mammiferi;
- LTA<sub>4</sub> può essere metabolizzato a *Leucotriene C<sub>4</sub>* (LTC<sub>4</sub>) sia per azione di una *LTC<sub>4</sub> sintetasi* (localizzata, in prevalenza, nei mastociti e negli eosinofili) che per azione di alcuni membri appartenenti alla famiglia enzimatica delle proteine associate alla membrana coinvolte nel metabolismo degli eicosanoidi e del glutatione (MAPEG) quali la **MGST2** (*microsomal glutathione S-transferase type2*) o la **MGST3** (*microsomal glutathione S-transferase type3*) in grado di coniugare LTA<sub>4</sub> al glutatione per ottenere il corrispettivo LTC<sub>4</sub>. Quest'ultimo viene rilasciato nell'ambiente extracellulare e qui per successivo taglio di uno o due aminoacidi porta alla formazione dei *Leucotrieni LTD<sub>4</sub>* ed *LTE<sub>4</sub>*.

In alternativa, l'LTA<sub>4</sub> rilasciato dalla 5-LOX, piuttosto che essere impiegato dalla cellula in cui è sintetizzato, può essere trasferito in cellule vicine che non sono in grado di produrre LTA<sub>4</sub> autonomamente, ma che comunque esprimono gli enzimi LTA<sub>4</sub> idrolasi o LTC<sub>4</sub> sintasi/



MAPEG (ad esempio le cellule parenchimali o eritrociti). È da aggiungere, infine, che l'azione combinata di 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX può portare alla produzione delle *Lipossine (LX)* (Serhan et al., 1999), lipidi contenenti una porzione triidrossitetraenica, impiegati come segnali di stop del processo infiammatorio e come promotori della guarigione della ferita. (Werz O. et al., 2006)

Se da un lato la 5-LOX utilizza l'acido arachidonico per la formazione dei leucotrieni, dall'altro la *prostaglandina H sintasi (PGHS)* ne prevede la conversione a prostaglandine (PG) e trombossano (TX) A<sub>2</sub>.

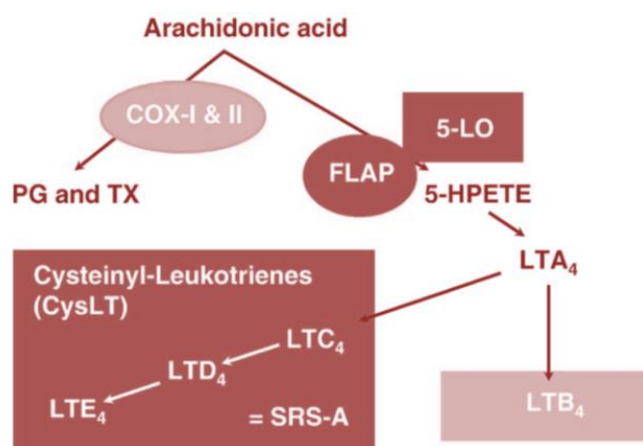


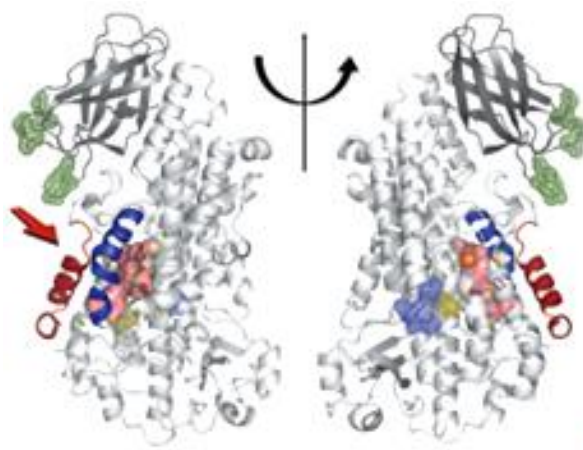
Figura 3 Pathway di trasformazione dell'acido arachidonico

La PGHS è un enzima che, come la 5-LOX, catalizza due reazioni accoppiate: un'iniziale ciclo-ossigenazione e una successiva formazione di idroperossidi. Tuttavia, poiché i farmaci che inibiscono la formazione di prostaglandine in genere inibiscono la prima reazione di ciclo-ossigenazione, la prostaglandina H sintasi è funzionalmente e farmacologicamente descritta come *prostaglandina ciclo-ossigenasi (COX)*. Di questo enzima si annoverano due isoforme:

- La **COX-1**, costitutivamente espressa in molte cellule e coinvolta principalmente nella produzione fisiologica di prostanoidi;
- La **COX-2**, la cui espressione è spesso indotta nelle cellule durante gli stadi infiammatori e ritenuta pertanto coinvolta nei processi patologici (Fitzgerald, 2003). Recenti studi hanno però messo in evidenza come tali enzimi non siano solo espressi durante i processi infiammatori, ma abbiano anche un ruolo costitutivo che spiegherebbe gli effetti collaterali degli inibitori selettivi delle COX-2 sull'apparato cardiovascolare (FitzGerald et al., 2004)(Dahlén et al., 2006).

### 2.2.2 La Struttura della 5-LOX umana

L'espressione della 5-LO umana è strettamente regolata. Essa è presente in prevalenza nei leucociti maturi compresi granulociti, monociti/macrofagi, mastociti, linfociti B e nelle cellule dendritiche, dove la capacità di esprimere l'enzima è acquisita durante la maturazione cellulare (Steinhilber *et al.*, 1999). Il gene che codifica per tale proteina è localizzato sul  **cromosoma 10** (Funk *et al.*, 1989) e mutazioni, a carico della regione del promotore, portano a polimorfismi della stessa lipossigenasi. Tuttavia, è ancora poco chiaro se i polimorfismi degli enzimi hanno o meno una rilevanza nell'alterare i processi di biosintesi dei leucotrieni. Quello che è certo, invece, è che nelle cellule non in grado di esprimere la 5-LOX, la trascrizione è bloccata a causa di una metilazione del DNA (Uhl *J.*, *et al.*, 2002). Recenti studi (Gilbert e Bartlett *et al.*, 2011) hanno permesso di ottenere informazioni alquanto dettagliate sulla struttura cristallografica della 5-LOX, con una risoluzione di 2,4Å. Data la scarsa stabilità dell'enzima (in parte associata ad una instabilità strutturale intrinseca, dovuta ad una regione specifica, in prossimità dell'estremità C-terminale, ricca di Lisine), gli studi cristallografici si sono concentrati su di una forma mutata della LOX risultata essere più stabile, dove le tre lisine sono state sostituite da acido glutammico, asparagina e leucina (**fig.2.9**).

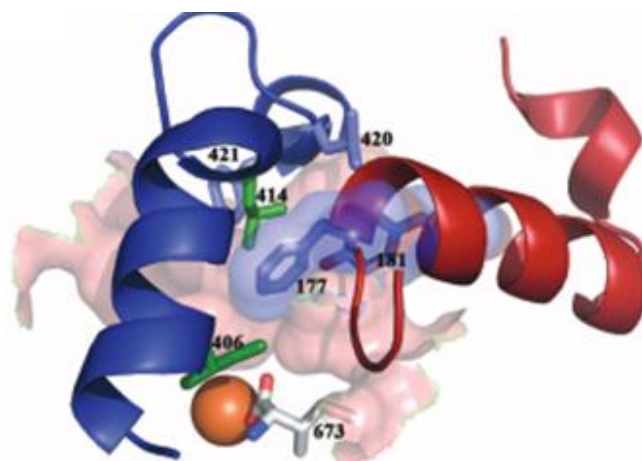


**Figura 2.9** Struttura tridimensionale della forma stabilizzata della 5-LOX

La 5-LOX stabilizzata presenta due distinti domini:

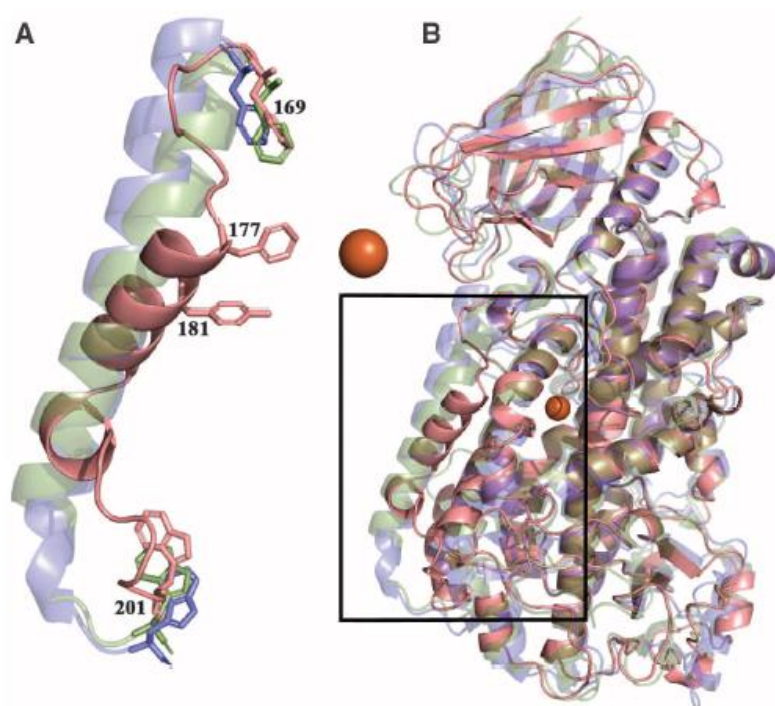
1. il dominio N-terminale “C2-like” (all'incirca di 120 amminoacidi), responsabile dell'interazione con gli ioni  $Ca^{2+}$ , fondamentali per l'attivazione enzimatica (Chen. *et al.*,1998) (Chen *et al.*, 2001) (Hammarberg *et al.*, 2002) (Kulkarni *et al.*, 2002) ,
2. un esteso dominio catalitico C-terminale. Quest'ultimo ha principalmente una struttura secondaria  $\alpha$ -elicoidale e contiene il ferro “non-eme”, responsabile della catalisi, coinvolto in quattro legami di coordinazione, tre dei quali con tre istidine altamente conservate (Hys<sup>367</sup>, Hys<sup>372</sup> e Hys<sup>550</sup>) ed il rimanente con il gruppo

carbossilico terminale di una isoleucina (**Ile**<sup>673</sup>). Un'altra caratteristica strutturale del dominio catalitico C-terminale, (descritto in dettaglio anche da *Minor et al*, 1996 per la LOX-1 della soia), è la presenza di un'elica arcuata, che impedisce l'accesso al sito catalitico. Al vertice di quest'elica, è presente una leucina, **Leu**<sup>414</sup> (**fig.2.10**), che, come nelle altre LOXs, è coinvolta nel controllare l'accesso di O<sub>2</sub> al substrato (*Knapp et al.,2001*) (*Knapp et al.,2003*) e nel posizionare il substrato pentadienilico in maniera ottimale per l'attacco (**fig. 2.11**).



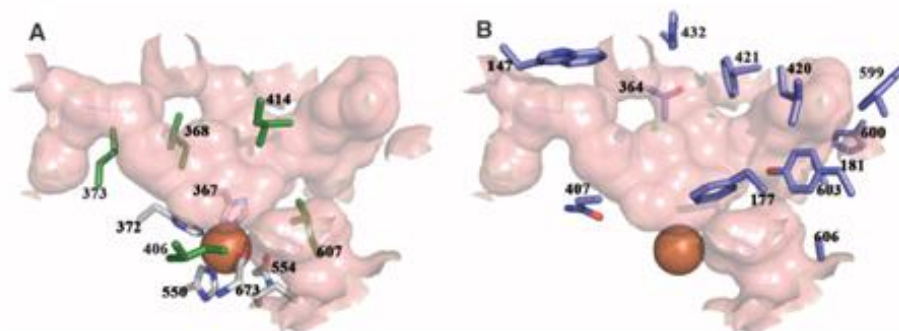
**Figura 2.10** Sito catalitico dell'enzima

Questa particolare  $\alpha$ 2-elica risulta essere più corta rispetto a quella presente in altre LOXs (es. 15-LOX e 8R-LOX), e pertanto la sua orientazione rende più difficile l'accesso del substrato al sito catalitico. In particolare, le catene laterali di una fenilalanina e di una tirosina (**Phe**<sup>177</sup> e **Tyr**<sup>181</sup>) sono posizionate verso l'interno, quasi a chiudere il sito attivo dell'enzima (**fig. 2.12A e 2.12B**).



**Figura 4** La caratteristica disposizione spaziale dell'alfa2-elica della 5-LOX (in rosa) in prossimità del sito catalitico. In trasparenza si evidenziano le disposizione della 15-LOX (in blu) e 8R-LOX (in verde)

Nella 5-LOX stabilizzata è, inoltre, possibile notare come il sito attivo si presenta come una cavità allungata nella quale gli amminoacidi **Leu<sup>368</sup>**, **Leu<sup>373</sup>**, **Leu<sup>414</sup>**, **Leu<sup>607</sup>** e **Ile<sup>406</sup>**, sono disposti a formare una struttura simile ad una costellazione di catene laterali idrofobiche ramificate, che avvolge la regione in cui il substrato pentadienilico deve essere posizionato per la catalisi (**fig.2.12A**).



**Figura 2.12** *A* Sito attivo della 5-LOX stabilizzata *B* Sequenza di amminoacidi che contribuisce all'azione del sito catalitico.

Gli amminoacidi presenti nel sito attivo della 5-LOX sono **Tyr<sup>181</sup>**, **Ala<sup>603</sup>**, **Ala<sup>606</sup>**, **His<sup>600</sup>** e **Thr<sup>364</sup>**. Le piccole catene laterali delle alanine Ala<sup>603</sup> e Ala<sup>606</sup> sono fondamentali per stabilizzare, tramite interazioni di Van der Waals, la conformazione della tirosina Tyr<sup>181</sup>, che insieme alla fenilalanina Phe<sup>177</sup>, forma una sorta di “tappo” a ridosso della cavità catalitica (**fig.2.12B**). La presenza di un amminoacido addizionale, il triptofano **Trp<sup>599</sup>**, sembra rafforzare l’occlusione della cavità mentre l’asparagina **Asn<sup>407</sup>** e l’istidina **His<sup>432</sup>** aiutano a definire i limiti del sito attivo.

La presenza di una cavità chiusa (con un volume di **663Å<sup>3</sup>**) solleva questioni circa le modalità con le quali il substrato possa migrare in prossimità del sito catalitico. Le due ipotesi maggiormente accreditate prevedono: **(i)** la rimozione sia del tappo, ad una estremità della cavità, che del Trp<sup>599</sup>, **(ii)** una rotazione del Trp<sup>147</sup> verso l’estremità opposta. Questa caratteristica del sito attivo suggerisce che l’acido arachidonico entra nella 5-LOX seguendo una direzione completamente opposta a quella seguita nella 15S- o nella 8R- lipossigenasi.

### 2.2.3 Regolazione dell'attività cellulare della 5-Lipossigenasi

Data la grande varietà di effetti biologici a cui i leucotrieni sembrano essere associati, non sorprende che sia l'espressione cellulare della 5-LOX che la biosintesi dei LT siano strettamente regolate (Steinhilber *et al.*, 1994). La formazione cellulare dei metaboliti della 5-LOX è controllata, infatti, sia dalla liberazione dell'acido arachidonico (AA), catalizzata dalla cPLA<sub>2</sub> citosolica, che dalla regolazione dell'attività della 5-LOX. La stimolazione cellulare da parte di vari agonisti (quali fMLP, *N-formyl-methionyl-leucyl phenylalanine*, o PAF, *platelet-activating factor*) provoca la traslocazione della 5-LOX verso la membrana nucleare (fig.2.13). Tale processo risulta essere indispensabile affinché l'enzima possa venire a contatto con il substrato, a meno che esso non sia esogeno. Nelle cellule a riposo, la 5-LOX può essere presente, come enzima solubile, nel citosol o nel nucleo, a seconda del tipo di cellula considerata (Werz *et al.*, 2002). Ad esempio, nei neutrofili ritroviamo le 5-LOXs citoplasmatiche che migrano verso la membrana nucleare esterna, mentre nelle cellule dendritiche o nei macrofagi alveolari, sono presenti le 5-LOX intranucleari che traslocano in prossimità della membrana interna dell'involucro nucleare (Luo *et al.*, 2003). La capacità di dar vita al metabolismo dei leucotrieni risulta maggiormente accentuata quando la 5-LOX è collocata nel nucleo (Luo *et al.*, 2003).

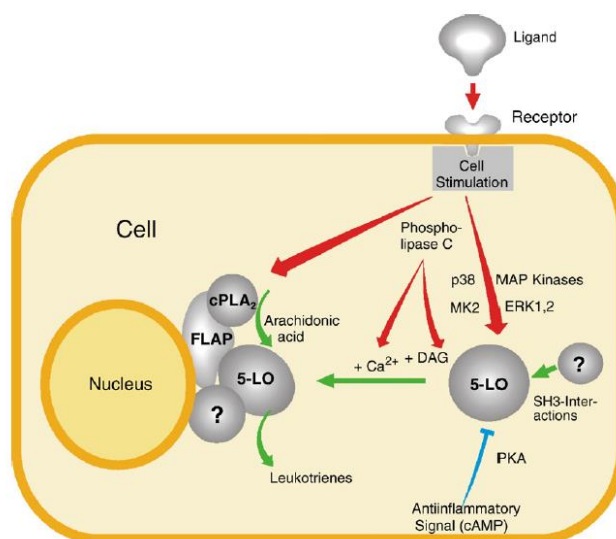


Figura 2.13. Regolazione dell'attività cellulare della 5-LOX

#### Regolazione dell'attività cellulare della 5-lipossigenasi tramite fosforilazione

La stimolazione dell'enzima avviene tramite la fosforilazione dei residui di Serina Ser<sup>271</sup> e Ser<sup>663</sup> operata, rispettivamente da due differenti chinasi *Mitogen activated protein kinase-activated protein (MAPKAP) chinasi (MK)* e le *Extracellular signal-regulated chinasi (ERK 1/2)* (fig.2.13). Tale fosforilazione è promossa dalla presenza di acidi grassi polinsaturi (Werz *et*

al.2002a,2002c). Nella maggior parte dei casi l'attivazione dell'enzima deve prevedere, oltre che la fosforilazione ad opera delle suddette chinasi, un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$ . Soltanto nei leucociti polimorfonucleati umani (PMNL), la stimolazione della *p38 mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e della MK è in grado di attivare la 5-Lipossigenasi senza la necessità di un concomitante incremento della concentrazione ionica  $[Ca^{2+}]_i$  intracellulare. L'attivazione "stress-indotta" della 5-LOX sembra essere efficientemente bloccata da molecole non ancora approvate come farmaci, quali la SB203580 e la U0126, attive come inibitori rispettivamente della p38-MAPK e dell'ERK1/2 (Werz *et al.*, 2002b). Studi condotti su preparati enzimatici semi-purificati evidenziano che la fosforilazione tramite MK e/o ERK non ha alcuna influenza sull'attività dell'enzima, il che lascerebbe supporre che tale processo modula o regola l'interazione della 5-LOX con altri componenti cellulari coinvolti direttamente nell'attivazione della catalisi.

Un'altra proteina coinvolta nella regolazione della 5-LOX è la *proteina chinasi A* (PKA). È noto da molti anni ormai, che i segnali che elevano i livelli di cAMP cellulare inibiscono l'attività della 5-LOX. Recentemente, è stato scoperto che la fosforilazione di PKA sulla lipossigenasi blocca la sua traslocazione e quindi la biosintesi dei leucotrieni, soprattutto nei neutrofili umani (Flamand *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2004). Ciò avviene in seguito alla fosforilazione del residuo di Serina (Ser<sup>523</sup>) situato alla periferia del dominio catalitico dell'enzima, che genera una modifica allosterica responsabile sia del decremento dell'attività enzimatica, che di un'influenza sulla localizzazione cellulare (Luo *et al.* 2004, 2005).

#### Regolazione dell'attività cellulare della 5-lipossigenasi ad opera di mediatori lipidici.

Un'up-regulation dell'attività dell'enzima sembra essere indotta da una interazione della lipossigenasi con le vescicole di fosfatidilcolina, PC. Il dominio C2-like della lipossigenasi lega selettivamente la PC tramite la presenza di tre residui di triptofano (Trp<sup>13</sup>, Trp<sup>75</sup> e Trp<sup>102</sup>) localizzati nel sito di binding per il  $Ca^{2+}$  (Kulkarni *et al.*, 2002). Il legame della PC con il dominio C2-like può essere impedito dall'1-oleil-2-acetilglicerolo (OAG), un diacilglicerolo derivato che si lega direttamente al dominio C2 della 5-LOX in un sito che, almeno in parte, si sovrappone a quello per la fosfatidilcolina (Hörnig *et al.*, 2005).

Un altro importante parametro da considerare nella regolazione dell'attività della 5-LOX è il tono redox. È stato visto che alcuni idroperossidi lipidici, quali gli acidi 5- e 12-idroperossieicosatetraenoico, e l'acido 13-idroperossitadecadienoico sono in grado di attivare in vitro la 5-LOX, favorendo la conversione del ferro da  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . (Weitzel & Wendel, 1993; Werz & Steinhilber, 1996).

#### Regolazione della FLAP (5-Lipoxygenase-activating protein)

La FLAP è una proteina membranaria di 18kDa identificata inizialmente come target del MK886 (Miller *et al.*, 1990), un potente inibitore della biosintesi dei LTs nei leucociti intatti,

ma sprovvisto di attività sulla 5-LOX, in lisati cellulari. La FLAP è un membro della superfamiglia delle *MAPEG protein* (tra le quali si annoverano la *LTCA<sub>4</sub> sintetasi*, *mPGE sintetasi-1* e le *MGST1,-2 e -3*), (Lame *et al.*, 1994; Jakobsson *et al.*, 2000) ancorata alla membrana nucleare, la cui funzione è quella di promuovere la presentazione dell'arachidonato alla 5-LOX. Nella maggior parte delle cellule del sangue, tranne che per i linfociti T, vi è un'espressione concomitante sia della FLAP, il cui gene è localizzato sul **cromosoma 13q12**, che della 5-LOX (Steinhilber, 1994; Vickers, 1995). La necessità dell'intervento della FLAP nella biosintesi dei leucotrieni venne evidenziata per la prima volta tramite esperimenti di trasfezione condotti su cellule umane affette da osteosarcoma (Dixon *et al.*, 1990). Secondo tali osservazioni, quando cellule, come i leucociti, vengono stimulate da opportuni fenomeni di stress, l'azione di una *cPLA<sub>2</sub>* rilascia l'acido arachidonico dalla membrana nucleare permettendo, a quest'ultimo, di interagire con la FLAP; e l'incremento della concentrazione di ioni calcio all'interno della cellula stimolata, promuove la traslocazione della 5-LOX alla membrana nucleare, dove acquisisce il substrato dalla FLAP (Dixon *et al.*, 1990). Pertanto, la FLAP è considerata indispensabile per la sintesi dei derivati dei leucotrieni solamente quando l'AA è endogeno (Abramovitz *et al.*, 1993). Questo implica che l'approvvigionamento dell'AA da fonti esogene compromette l'efficacia degli inibitori della FLAP (Steinhilber *et al.*, 1993; Werz *et al.*, 1997). Tale meccanismo di migrazione trans cellulare si riscontrano, *in vivo*, a carico di cellule endoteliali e piastrine. Recentemente è stato dimostrato che la FLAP può generare un omodimero in cellule di neutrofili e formare un complesso composto da 2 proteine FLAP e da una 5-LOX, che aumenta notevolmente la biosintesi di 5-HETE (Plante *et al.*, 2006).

### 2.3 Il coinvolgimento della 5-LOX nelle varie patologie

I Leucotrieni (LT) sono stati riconosciuti fra i vari mediatori di una vasta gamma di reazioni infiammatorie e allergiche quali artrite reumatoide, malattie infiammatorie intestinali, psoriasi, rinite allergica anche se la loro implicazione fisiopatologica primaria è legata all'asma bronchiale (Samuelsson *et al.*, 1987; Lewis *et al.*, 1990). Essi interagiscono con diversi recettori:

- Recettori *BLT<sub>1</sub>* e *BLT<sub>2</sub>*,

classificati come recettori metabotropici **GPCR**, con una elevata omologia strutturale (36-45%), e con una distribuzione tissutale ben distinta, a cui sono connesse diverse proprietà farmacologiche (Brink *et al.*, 2003). Il **recettore *BLT<sub>1</sub>*** possiede una elevata affinità per *LTB<sub>4</sub>* ed è principalmente espresso a carico dei leucociti e in cellule della milza, timo, midollo osseo e vari altri tessuti (anche se, nelle ultime tre è presente in quantità molto inferiori, Owman *et al.*, 1996; Yokomizo *et al.*, 1997). Il recettore *BLT<sub>1</sub>* è coinvolto nella mediazione della chemiotassi e nei processi patologici dell'aterogenesi, dell'asma bronchiale, della glomerulonefrite, dell'artrite cronica e delle malattie infiammatorie croniche intestinali (Okuno

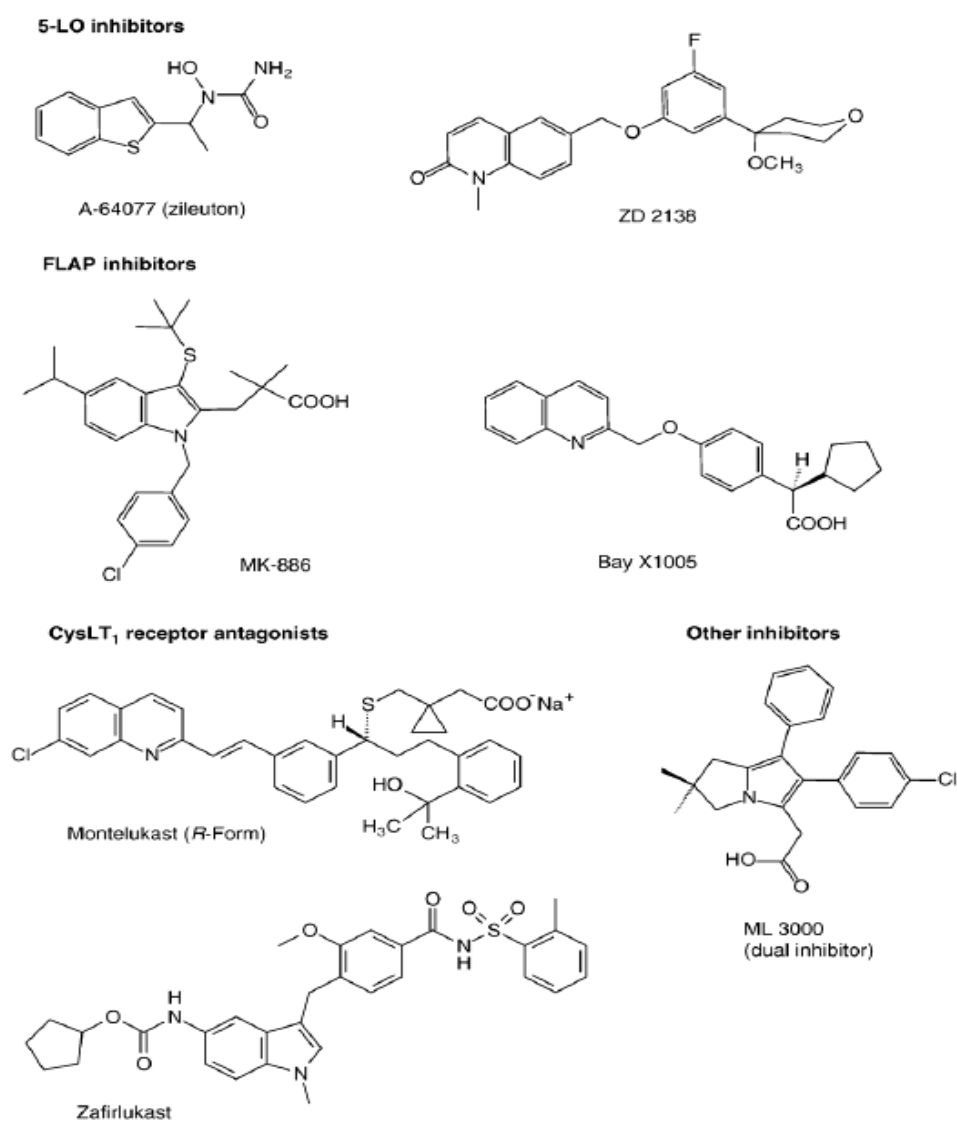


et al., 2005). Nei saggi cellulari, è stato dimostrato, inoltre, che l' $LTB_4$  attiva, per interazione con tali recettori, i granulociti, macrofagi e monociti, inducendo il rilascio di enzimi lisosomiali e proteine di adesione dei leucociti alle cellule endoteliale modulando, così, le funzioni delle cellule immunitarie. Il **recettore  $BLT_2$** , invece, si lega all' $LTB_4$  con una affinità di 20 volte inferiore rispetto a quella posseduta per il  $BLT_1$ , pur essendo più espresso nelle cellule endoteliali e nei neutrofili. Il ruolo fisiologico e fisiopatologico dei recettori  $BLT_2$  è ben lungi dall'essere identificato.

- Recettori CysLT

Tali recettori appartengono anch'essi alla superfamiglia di recettori metabotropici GPCR. Si distinguono in **CysLT<sub>1</sub>** e **CysLT<sub>2</sub>**. Il Recettore CysLT<sub>1</sub> è espresso maggiormente negli eosinofili, nei monociti e macrofagi e nelle cellule muscolari lisce bronchiali. Il recettore espresso in maniera ubiquitaria è, invece, il CysLT<sub>2</sub>. (Lotzer et al, 2003. Sjöström et al, 2003; Kanaoka & Boyce, 2004). I sopracitati recettori rappresentano i *targets* di due farmaci attualmente utilizzati nel trattamento dell'asma bronchiale: il **Montelukast** e lo **Zafirlukast** (fig.2.14) (Kemp, 2003).

Recentemente, il *pathway* della 5-LOX è stato anche associato a processi patologici quali l'aterosclerosi, l'osteoporosi e ad alcuni tipi di cancro, (Werz et al.,2006). Considerando il fatto che i segnali proinfiammatori  $LTB_4$ , e CysLT mediano le loro azioni tramite l'interazione con specifiche strutture recettoriali, ci si aspetta che l'inibizione della formazione di tali prodotti (a causa di inibitori della 5-LOX) dovrebbe essere almeno tanto efficace quanto l'uso di farmaci antagonisti del recettore CysLT<sub>1</sub>, ormai da tempo affermati sul mercato (es. Zafirlukast e Montelukast) che bloccano solo un sottotipo recettoriale. Tuttavia, l'efficacia terapeutica degli inibitori della 5-LOX (fino a poco tempo fa disponibili) non soddisfaceva molto le aspettative. Ciò nonostante il potenziale valore terapeutico degli inibitori della 5-LOX in vari processi infiammatori e metabolici è particolarmente elevato e risulta, così, rilevante definirne le possibili implicazioni in alcune delle patologie citate.



**Figura 2.14.** Farmaci anti-leucotrieni

### Asma

La *Slow reacting substance of anaphylaxis (SRSA)* è stata descritta nel 1938 (Feldberg & Kellaway, 1938) come un composto in grado di indurre una contrazione marcata dei muscoli lisci più lenta in termini di esordio, e più lunga in termini di durata, rispetto a quella generata dall'istamina. La natura chimica di tale sostanza, è stata risolta solo molti anni esser stata identificata, delineandosi come una miscela di CysLT (Murphy *et al.*, 1979). I CysLT (LTC<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>) sono stati, poi, identificati come importanti mediatori dei processi di broncocostrizione

e delle reazioni di ipersensibilità: essi suscitavano, infatti, contrazioni in preparati di muscolatura liscia bronchiale umana, circa 1000 volte più potenti di quelle generate dall'istamina a tal livello (Dahlén *et al.*, 1981). Oggigiorno, è ormai appurato che i CysLT svolgono un ruolo importante nei casi di asma. Questi mediatori sono, infatti, coinvolti nel reclutamento di eosinofili nei tessuti respiratori, nella contrazione della muscolatura liscia del polmone e nella secrezione di muco (McMillan, 2001). Esperimenti condotti su topi *knock-out* per la 5-LOX, affetti da asma e da infiammazione allergica hanno confermato il ruolo essenziale svolto dalla 5-LOX nello sviluppo dell'ipersensibilità delle vie aeree (Funk, 1996; Irvin *et al.*, 1997). Così, antagonisti dei CysLT1-receptors ed inibitori della 5-LOX riducono sia la fase precoce che tardiva del broncospasma riducendo, al contempo, l'iper-reattività delle vie aeree (McGill & Busse, 1996; Claesson & Dahlen, 1999). I dati ottenuti dal trattamento con lo Zileuton sono paragonabili agli stessi risultati ottenuti con gli antagonisti del recettore CysLT1: poiché la somministrazione degli antagonisti dei CysLT1-receptors (Montelukast, Zafirlukast, Pranlukast; **fig.2.14**) è più vantaggiosa, in termini di *compliance*, frequenza di somministrazione e profilo di sicurezza, sono diventati la classe preferita di farmaci per tale patologia, a discapito dello Zileuton. Questo, però, non deve escludere gli inibitori della 5-LOX dalla classe dei potenti anti-infiammatori, dato che la somministrazione di 800 mg di Zileuton in dose singola orale, riduce la sintesi di LTB<sub>4</sub> di circa l'80% (Bell *et al.* 1992)

#### *Patologie infiammatorie della cute*

Il profilo di attività dei metaboliti della 5-LOX suggerisce il coinvolgimento di tali mediatori in malattie infiammatorie della cute, come la dermatite atopica e la psoriasi. Sebbene l'espressione della 5-LOX è stata rilevata nella differenziazione dei cheratinociti in coltura (Janssen-Timmen *et al.*, 1995), nessuna espressione dell'enzima è stata ritrovata nei cheratinociti di pelle umana sana (Spanbroek *et al.*, 1998) il che indicherebbe che i cheratinociti non possono essere considerati come la fonte diretta dei LT. Forti segnali della presenza di 5-LOX sono stati ottenuti nelle *cellule di Langerhans (LC)* e si è concluso che, nella pelle umana, l'importazione di LTA<sub>4</sub> può derivare solo dalle LCs o dall'infiltrazione di leucociti nella cute. L'LTA<sub>4</sub> può, poi, essere ulteriormente convertito ad un LT biologicamente attivo, tramite biosintesi *transcellulare* per esempio, per azione della LTA<sub>4</sub>-idrolasi (Iversen *et al.*, 1993). Zileuton, l'unico inibitore della 5-LOX approvato, è in grado di indurre un significativo miglioramento nella dermatite atopica e orticaria cronica (Woodmansee & Simon, 1999) mentre, risulta inattivo nel trattamento della psoriasi (DeGreef *et al.*, 1990; van de Kerkhof *et al.*, 1996).

#### *Malattie infiammatorie intestinali e artrite reumatoide*

In contrasto con l'asma, il ruolo dei Leucotrieni in altri processi infiammatorie come l'artrite reumatoide o infiammazione intestinale, è molto meno chiaro. Nei topi deficienti di FLAP, la gravità dell'artrite "collagene-indotta" è stata sostanzialmente ridotta, se confrontata con quella

di gli animali *wild-type* o eterozigoti. Questi dati suggerirebbero che gli LT svolgano un ruolo essenziale sia nella risposta infiammatoria acuta, che in quella cronica, dei topi (Griffiths *et al.*, 1997). Ciò nonostante, sebbene i primi studi hanno dimostrato elevati livelli di LT nel fluido sinoviale di pazienti con artrite reumatoide (Klickstein *et al.*, 1980; Davidson *et al.*, 1983.) e nei campioni di mucosa del colon, proveniente da pazienti con infiammazioni intestinali (Sharon & Stenson, 1984; Lobos *et al.*, 1987), l'inibizione della biosintesi dei Leucotrieni, (promossa dall'azione dello Zileuton o dall'inibitore della FLAP MK-591) non ha portato a benefici terapeutici particolarmente significativi (Hawkey *et al.*, 1997; Roberts *et al.*, 1997, Weinblatt *et al.*, 1992).

#### *Patologie cardiovascolari*

Sebbene i LT siano stati collegati al sistema cardiovascolare molto tempo fa, un numero crescente di studi negli ultimi anni vede coinvolta la cascata della 5-LOX in malattie cardiovascolari (CVD), tra cui l'aterosclerosi, l'ictus, l'infarto del miocardio (MI) e l'aneurisma aortico. Gli effetti di un aumento dei LT sul sistema cardiovascolare sembrerebbero, infatti, essere la promozione della fuoriuscita del plasma da venule postcapillari e formazione di edema, la vasocostrizione coronarica associata a contrazione ventricolare ridotta, la riduzione del flusso coronarico e della gittata cardiaca. (Feuerstein, 1984; Letts, 1987). Un aumento della produzione di LT è stato, poi, osservato in pazienti ischemici, e in pazienti sottoposti a bypass cardiopolmonare. Sulla base di tali osservazioni, si è notato che, in vari modelli animali con topi, gatti o cani, gli antagonisti dei recettori dei LT e gli inibitori 5-LOX hanno effetti cardioprotettivi (Vila, 2004).

#### *Obesità*

Sembra che la 5-LOX influenzi i livelli di adiposità e delle lipoproteine il che implicherebbe una possibile connessione tra la 5-LOX e l'obesità (Mehrabian *et al.*, 2005). Inoltre, sembra vi sia un aumento dell'espressione di FLAP nel tessuto adiposo sottocutaneo dei soggetti obesi rispetto ai non obesi (Kaaman *et al.*, 2005)

#### *Neoplasie*

Numerose evidenze suggeriscono un coinvolgimento del *pathway* della 5-LOX nella proliferazione e sopravvivenza delle cellule tumorali, implicando una nuova indicazione terapeutica anti-cancro basata su di un'azione anti-LT:

- (I) gli enzimi necessari per la biosintesi dei LT, così come i recettori per i LT, sono presenti o addirittura *over-espressi* in cellule trasformate o in tessuti neoplastici;
- (II) una cospicua formazione di prodotti della 5-LOX avviene in questi siti;
- (III) l'aggiunta dall'esterno di prodotti della 5-LOX stimola la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali,
- (IV) l'inibizione farmacologica o genetica della 5-LOX inibisce la crescita delle cellule tumorali e induce l'apoptosi.

È da precisare, però, che l'over-espressione di enzimi e recettori del *pathway* della 5-LOX è limitato solo a certi tipi di cellule, e in particolare la 5-LOX è stata rilevata in abbondanza in linee cellulari di cancro di origine animale o umana quali cancro al cervello (Boado et al., 1992), seno (Przylipiak et al., 1998; Avis et al., 2001), colon (Wachtershauser et al., 2000), mucosa esofagea (Zhi et al., 2003; Hoque et al., 2005), polmone (Avis et al., 1996), reni (Matsuyama et al., 2005), mesotelio (Romano et al., 2001), pancreas (Ding et al., 1999; Hennig et al., 2002), e della prostata (Myers & Ghosh., 1999), e nella maggior parte di questi studi si ha anche un concomitante aumento dei prodotti della 5-LOX (Boado et al., 1992; Avis et al., 1996; Przylipiak et al., 1998; Myers & Ghosh, 1999; Avis et al., 2001; Romano et al., 2001; el-Hakim et al., 1990; Ghosh & Myers, 1997).

Per confermare l'implicazione della 5-LOX nella patofisiologia del cancro, molti ricercatori hanno applicato l'impiego di strumenti farmacologici come gli inibitori della 5-LOX (Avis et al., 1996; Ghosh & Myers, 1997; Ding et al., 1999; Romano et al., 2001; Tong et al., 2002b; Kennedy et al., 2003; Hoque et al., 2005; Li et al., 2005), inibitori della FLAP (Anderson et al., 1998; Ghosh e Myers, 1998; Przylipiak et al., 1998; Anderson et al., 2000; Fan et al., 2004), inibitori della LTA<sub>4</sub> idrolasi (Chen et al., 2003, 2004) ed antagonisti dei LT (Nakano et al., 1998; Tong et al., 2002a; Ding et al., 2005) che hanno attenuato gli effetti attribuiti alla 5-LOX e ai suoi metaboliti, bloccando la proliferazione delle cellule e inducendo apoptosi, in vitro e in vivo.

Nonostante il forte potenziale della terapia anti-LT per la prevenzione e trattamento del cancro, finora, solo un paio di prove cliniche sono state lanciate per la valutazione di tali farmaci. Studi clinici di fase II per l'inibitore della 5-LOX e della trombossano sintetasi A2, **CV6504**, (Ferry et al., 2000), e per l'antagonista LTB4, **LY293111** (Ding et al., 2005) stanno fornendo buoni risultati nel trattamento del cancro al pancreas in stadio avanzato.

#### *Altri possibili coinvolgimenti*

In alcuni lavori pubblicati recentemente, indicazioni plausibili per gli inibitori della 5-LOX sono state rivendicate sulla base di alcuni coinvolgimenti fisiopatologici. Ad esempio, lo Zileuton è risultato essere efficace nel trattamento dell'**acne**, dopo aver ridotto il numero di lesioni, il contenuto totale di lipidi nel sebo e gli acidi grassi pro-infiammatori in uno studio clinico (Zouboulis et al., 2003). L'analisi *Microarray*, circa l'espressione genica nella **sclerosi multipla** (MS), ha evidenziato il coinvolgimento della 5-LOX nello sviluppo delle lesioni infiammatorie (Whitney et al., 2001), ed elevati livelli di LTB4 e LTC4 sono stati riscontrati nel fluido cerebrospinale di pazienti con sclerosi multipla rispetto ai *casi-controllo* (Neu et al., 1992). Il trattamento clinico con Zileuton, dei pazienti affetti da MS, per 3 mesi, ha impedito il riacutizzarsi dell'infiammazione per almeno 6 mesi dopo la terapia mentre l'inibitore della FLAP, **Bay-x 1005**, si è affermato come nuova proposta per il trattamento della sclerosi

multipla (Werz & Steinheilber, 2005). Infine, lo Zileuton è stato definito efficace nella cura della **malattia dalle cellule falciformi** (*anemia falciforme*) (Haynes et al., 2004).



**CAPITOLO III**  
**GLI INIBITORI DELLA 5-LIPOSSIGENASI**

### 3.1. Le diverse classi di inibitori

Nel tentativo di inibire l'intera cascata della 5-LOX, tre strategie farmacologiche risultano essere le più concrete: *l'inibizione della cPLA2*, *l'inibizione della FLAP* ed infine *l'inibizione della 5-LOX*.

**La soppressione dell'enzima PLA2** (mediata, ad esempio, da glucocorticoidi) impedisce la formazione di tutti gli eicosanoidi, come sostenuto da esperimenti su topi con deficit di cPLA2 (Uozumi et al., 1997). Tuttavia, i glucocorticoidi in alcuni modelli sperimentali di studi clinici, si sono dimostrati inefficaci nel ridurre la produzione dei LT (Claesson et al. 1999). Tutto ciò, è supportato anche da recenti studi che evidenziano come gli effetti benefici degli inibitori selettivi della cPLA2 su modelli animali di artrite (Tai et al., 2009), danno polmonare acuto (Nagase et al., 2003) o da ischemia da riperfusione (Bellido-Reyes, et al., 2006) sono dovuti alla soppressione di più mediatori, quali citochine e proteasi e, non esclusivamente ai ridotti livelli di LT.

I cosiddetti **"inibitori della FLAP"** (quali, tra i più potenti **NK886**, **Bay-X 1005**, **MK0591**) (Evans et al., 2008) espletano la loro attività interferendo con il trasferimento dell'AA dalla membrana nucleare all'enzima, causando una ridotta disponibilità di AA per la 5-LOX (Ferguson et al., 2007). Tali composti sono altamente attivi su cellule intatte, in particolar modo quando i LT sono sintetizzati a partire da AA endogeno (Werz, 2002). Al contrario, l'AA fornito dall'esterno alla cellula, compromette fortemente l'efficacia, degli inibitori.

Per ciò che concerne **l'inibizione diretta della 5-LOX**, ad oggi, gli inibitori esistenti vengono classificati in base alla loro modalità d'azione, in:

- i) *Inibitori di tipo redox* che agiscono riducendo il ferro del sito attivo, in modo da bloccare il ciclo catalitico dell'enzima;
- ii) *Inibitori leganti il ferro*, contenenti gruppi idrossammici o N-idrossiureidici che chelano il ferro del sito attivo;
- iii) *Inibitori di tipo non-redox*, che competono con l'AA nel legame con la 5-LOX, senza alcuna proprietà redox;
- iv) *Nuovi classi di inibitori*, con specifiche modalità d'azione. Per quest'ultimo gruppo, vari sono stati gli sviluppi negli ultimi anni, promuovendo nuovi meccanismi molecolari accompagnati da una favorevole farmacodinamica. È da precisare, però, che molti di questi nuovi inibitori sono in grado di espletare un'attività anche nei confronti di alcuni enzimi correlati quali le 12- e 15-LOXs. Ciò, in realtà, non sorprende perché questi enzimi condividono lo stesso substrato, (ovvero l'AA) che alloggia in una tasca comune, più o meno conservata, presente in ognuna delle proteine citate. Tuttavia, la maggior parte degli studi circa tali inibitori, trascura la selettività in termini di interazioni con 12/15-LOX.



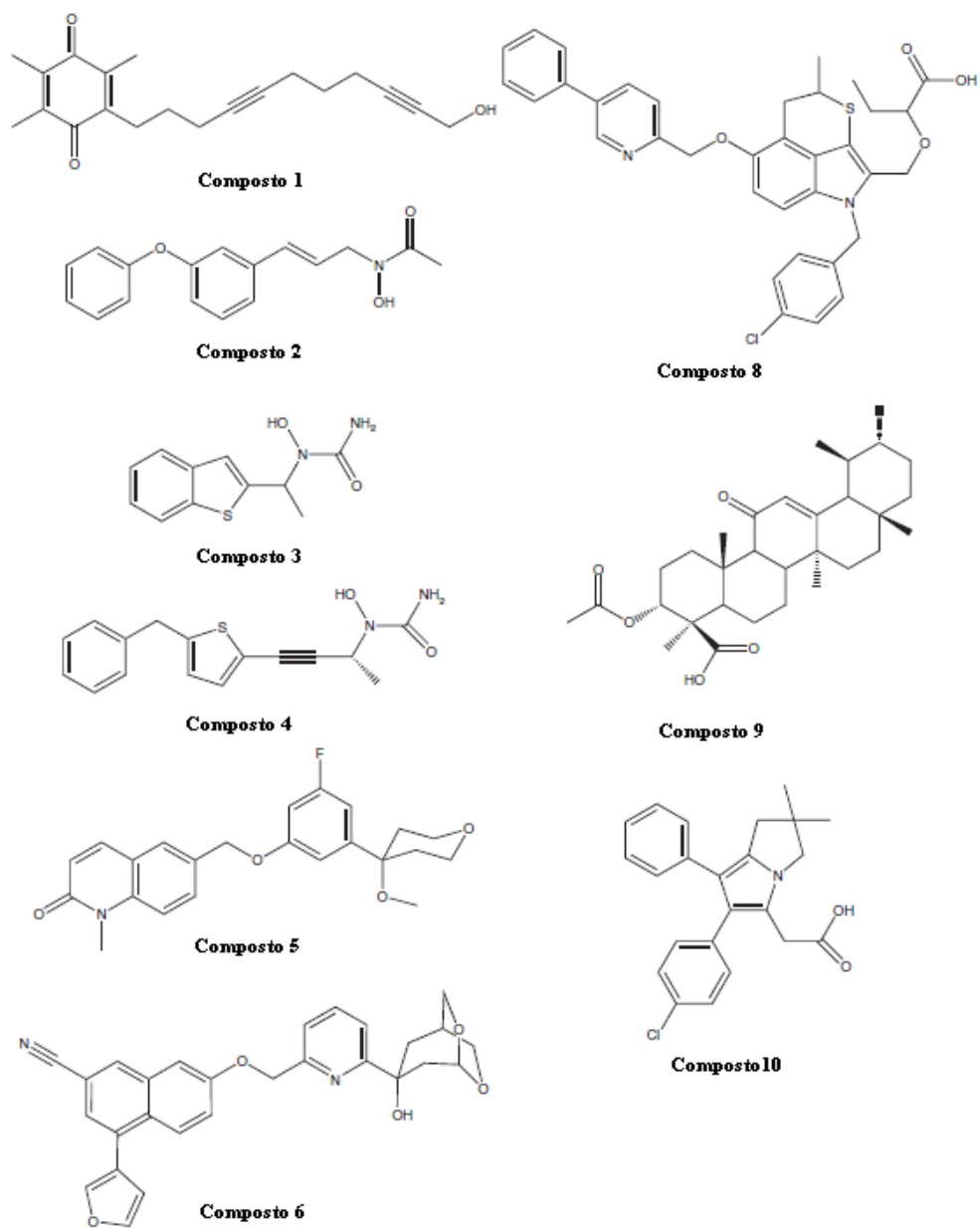


Figura 3.1. Noti inibitori della 5-LOX

### 3.1.1. Inibitori di tipo Redox (Redox-active inhibitors)

Tale classe di inibitori comprende, essenzialmente, agenti riducenti lipofili tra cui molti composti naturali di origine vegetale (quali l'acido nor-diidroguaretico, acido caffeico, flavonoidi, cumarine e diversi polifenoli) ma anche diversi derivati sintetici. In effetti, i primi inibitori sintetici della 5-LOX quali **AA-861 (composto 1, fig.3.1)**, **L-656224**, **Fenidone** e **BW755C** appartengono a questa classe (Ford-Hutchinson et al., 1994). Questi farmaci agiscono bloccando il ferro del sito attivo nello stato di ossidazione ferroso, inibendo, così, l'intero ciclo catalitico dell'enzima. Essi sono considerati inibitori altamente efficienti nel ridurre la formazione dei LT *in vitro*, ma la maggior parte di loro possiede una scarsa biodisponibilità orale, senza considerare il fatto che hanno una scarsa selettività per la sola 5-LOX ed esercitano gravi effetti collaterali (quali la formazione di metaemoglobina), per interferenze con altri sistemi biologici redox o per la produzione di specie reattive radicaliche (Ford-Hutchinson et al., 1994) (McMillan et al., 1992). A causa di tali caratteristiche dannose, ad oggi, ne è ostacolata l'immissione in commercio.

### 3.1.2 Inibitori leganti il ferro (Iron ligand inhibitors)

Gli inibitori leganti ferro, rappresentati da acidi idrossammici o da derivati N-idrossiureidici espletano la loro attività chelando il ferro del sito attivo, pur essendo in possesso di deboli proprietà riducenti (fig.3.1). L'acido idrossammico **BWA4C (composto 2)** e il derivato N-idrossiureidico dello Zileuton (**composto 3**) sono i più potenti della classe, espletando una buona attività di inibizione se somministrati per via orale. Lo Zileuton (con una  $IC_{50} = 0,5-1\mu M$  nei leucociti stimolati) ha fornito un miglioramento nelle compromissioni acute e croniche delle funzioni delle vie aeree, tale da ridurre la necessità di un trattamento a base di  $\beta$ -agonisti o glucocorticoidi; per tali ragioni è stato approvato negli Stati Uniti per il trattamento dell'asma con il nome commerciale di Zyflo<sup>®</sup>. Tuttavia, il suo impiego nel trattamento della rinite allergica, dell'artrite reumatoide e della malattia infiammatoria intestinale, è risultato non soddisfacente (Werz, & Steinhilber., 2005). Un'ottimizzazione strutturale ha portato all'**ABT-761 (VIA-2291, composto 4)**, che si è dimostrato fino a cinque volte più potente dello Zileuton, in modelli animali di broncospasmo, con un'emivita (per somministrazione orale) di 16 h (Brooks, et al., 1995) mostrando anche una notevole efficacia nella broncocostrizione da esercizio fisico, nei pazienti asmatici (Brooks, et al., 1995). Ad oggi, VIA-2291 ha completato con successo la fase II di sperimentazione clinica per il trattamento dell'aterosclerosi e di alcune malattie cardiovascolari ed è in procinto di entrare in fase clinica di sperimentazione come inibitore della 5-LOX (Back et al., 2009). Un altro derivato N-idrossiureidico, **LDP-977 (CMI-977)**, si è dimostrato particolarmente attivo per via orale, e i valori di  $IC_{50}$  per la soppressione della 5-LOX nel sangue umano e per l'inibizione delle contrazioni dei tessuti delle vie aeree umane IgE-mediate, sono stati rispettivamente di 120 e 100 nM, con una potenza di 5-10 volte

superiore rispetto allo Zileuton, accompagnato da una più lunga durata d'azione. Tuttavia, **LDP-977** non è più considerato un candidato per la sperimentazione clinica.

### 3.1.3 Inibitori di tipo non-redox (Nonredox-type inhibitors)

Gli inibitori della 5-LOX di tipo *non-redox*, competono con l'AA o, più in generale, con LOOH per il legame con la struttura enzimatica. Essi sono sprovvisti di proprietà *redox* e comprendono molecole strutturalmente diverse tra loro (Werz, & Steinhilber, 2007). Non è ancora chiaro se il sito di *binding* di questi composti sia lo stesso dell'AA, dato che alcuni dati sperimentali derivanti da studi biochimici e molecolari, suggerirebbero un'azione modulatoria allosterica. I rappresentanti di questa classe, come l'attivo per via orale **ZD 2138 (composto 5)** o il suo analogo etilico **ZM 230487**, **L-739010 (composto 6)** nonché il tiopiranoindol-derivato **L-699333 (composto 8)** si sono dimostrati non solo molto potenti ma anche molto selettivi nei confronti della 5-LOX, con valori di IC<sub>50</sub>, in saggi cellulari, dell'ordine del nanomolare. E' da sottolineare, però, che elevati livelli di perossidi e/o la fosforilazione di 5-LOX mediata da MK-2 e/o da parte delle ERK compromette fortemente la potenza di alcuni inibitori *non-redox* in PMNL attivati. Questo spiegherebbe perché **ZD 2138** ha dimostrato una scarsa efficacia in alcuni processi pato-fisiologici (come l'infiammazione polmonare) accompagnati da livelli elevati di perossidi e da un aumento dell'attività di fosforilazione cellulare.

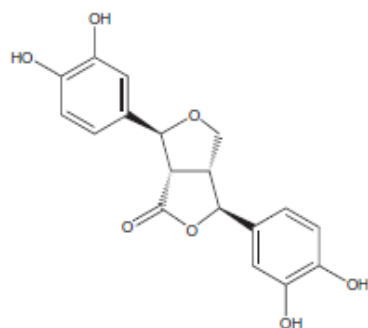
### 3.1.4 Diversi inibitori della 5-LOX

Un meccanismo di inibizione singolare della 5-LOX, non ancora ben definito, è stato suggerito per l'*acido 3-O-acetil-11-cheto-boswellico (AKBA, composto 9)* un ingrediente della gomma-resina derivante dalle specie di *Boswellia* che agisce direttamente sulla 5-LOX, apparentemente in un sito che è diverso da quello catalitico per l'AA (Safayhi, et al., 1992). Tuttavia, **AKBA** non è riuscito a inibire la formazione di LT umani nel sangue umano e *in vivo* (Siemoneit, et al., 2009) e, anche se un estratto di *Boswellia serrata*, arricchito con il 30% AKBA, ha ottenuto buoni risultati in uno studio di Fase II per patologie infiammatorie come l'osteoartrite (Sengupta, et al., 2008), *in vivo* l'estratto non può essere assunto. I recenti sviluppi nel campo dei farmaci anti-infiammatori hanno fornito composti che non agiscono esclusivamente sulla sola 5-LOX, ma anche su altri *targets* rilevanti quali COX, PAF o il recettore istaminergico H1 (Werz, & Steinhilber, 2005). Molecole in grado di inibire sia le COX che la 5-LOX (*Inibitori duali*) hanno dimostrato una doppia efficacia antinfiammatoria, accompagnate anche da minore tossicità gastrica rispetto ai tradizionali inibitori delle COX (Celotti, et al., 2001). Tra questi inibitori duali, quello più promettente è il **Licofelone (composto 10)** che ha raggiunto la fase III di sperimentazione clinica, per il trattamento dell'osteoartrosi.

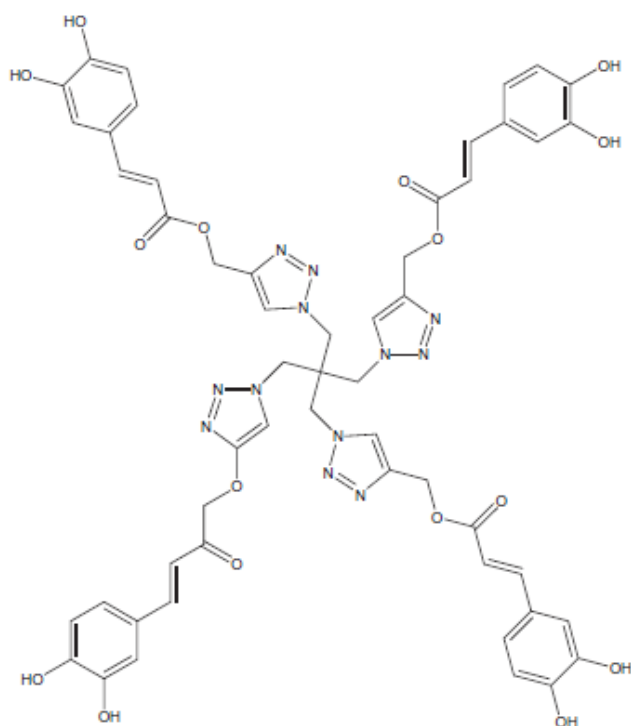
### 3.2 Nuovi sviluppi

#### 3.2.1 Inibitori di tipo redox

Numerosi studi sostengono che composti fenolici (**fig.3.2**) agiscano come inibitori di tipo redox. Ad esempio, il *lattone (+)-3,4,3',4'-tetraidrossi-9,7' $\alpha$ -epossilignano-7 $\alpha$ ,9'* polifenolico (**composto 11**), dove la porzione catecolica è apparentemente la porzione farmacoforica, inibisce numerosi enzimi della cascata dell'AA tra cui 5-LOX, 15-LOX e COX-1/2 in concentrazioni dell'ordine del micromolare (*Tahitian Noni International, 2008*). Nuovi derivati dell'acido caffeico (trimeri o tetrameri, esemplificati dal **composto 12**) sono in grado di inibire la 5-LOX con valori di IC<sub>50</sub> compresi tra 0,66 e 0,79  $\mu$ M mostrando, così, un'attività inibitoria paragonabile a quella dell'acido caffeico (IC<sub>50</sub> ~ 3 mM) (*Doiron, et al., 2009*).



**Composto 11**



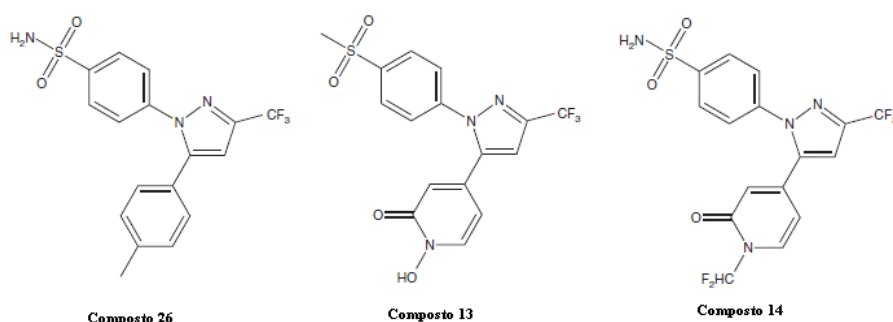
**Composto 12**

**Figura 3.2** Nuovi inibitori di tipo redox per la 5-LOX

### 3.2.2 Inibitori chelanti il ferro (*N*-idrossiurea derivati)

Tra tutti gli inibitori della 5-LOX sviluppati finora, solo lo Zileuton come membro della classe è riuscito ad entrare in commercio. Ciò nonostante, negli ultimi 5 anni tra le nuove proposte ve ne sono alcune di notevole interesse che meritano di essere menzionate. Il concetto di inibitori duali COX/5-LOX ha portato all'evoluzione dei tradizionali FANS con proprietà leganti il ferro (**Fig.3.5**). Grazie ai recenti sviluppi, la porzione *N*-idrossipiridin-2(1*H*)onica del **composto 13**

(Chowdhury, *et al.*, 2008a) (Chowdhury *et al.*, 2008b) e la porzione *N*-difluorometil-1,2-diidropiridin-2-onica del **composto 14** (Chowdhury, *et al.*, 2009a) (Chowdhury, *et al.*, 2009b) possono essere definite come farmacofori di base per la progettazione di nuovi mimetici idrossammici ciclici, in grado di chelare il ferro del sito attivo (Chowdhury, *et al.*, 2008a) (Chowdhury *et al.*, 2008b). La successiva associazione di tali molecole con le porzioni farmacoforiche degli inibitori COX-2 selettivi (ad esempio, il *Celecoxib*) ha portato allo sviluppo di potenti inibitori duali COX-2/5-LOX con valori di IC<sub>50</sub> nell'ordine del micromolare, paragonabili a quelli di ottimi farmaci anti-infiammatori quali *Celecoxib* o *Ibuprofene* (Chowdhury, *et al.*, 2009a).



**Figura 3.5.** Nuovi inibitori chelanti il ferro della 5-LOX

### 3.2.3 Inibitori di tipo non-redox

Numerosi composti, appartenenti alla classe, sono stati identificati già a partire dal 2005 (**fig.3.6**). Il derivato ureidico **RBX 7796 (composto 15)** con una catena dodecilica di atomi di carbonio è stato presentato dalla Ranbaxy come un nuovo tipo di inibitore della 5-LOX, sprovvisto di somiglianze strutturali con il tocoferolo. RBX 7796 si è dimostrato essere un inibitore attivo per via orale, competitivo e molto selettivo per la 5-LOX, con valori di IC<sub>50</sub> di 3,8 e 5  $\mu$ M rispettivamente nei confronti dell'enzima purificato o in cellula. L'efficienza del derivato è stata notevole, indipendentemente dallo stato redox dell'enzima, e il composto ha anche soppresso la sintesi di LTB<sub>4</sub> *ex vivo* nel sangue di ratto, dimostrandosi attivo in vari modelli animali di infiammazione e di broncocostrizione (Shirumalla, *et al.*, 2006). **RBX 7796** è, inoltre, stabile nei microsomi di fegato, non inibisce il citocromo P450, e possiede una sufficiente biodisponibilità orale (Shirumalla, *et al.*, 2008).

Il gruppo Merck Frosst ha introdotto derivati a nucleo cumarinico sostituito, basati sulla struttura di **L-739,010 (composto 6, fig.3.1)** al fine di ridurre la potenziale tossicità (**fig.3.6**). Così, sostituendo la porzione diossabicyclottanilica con una esafluorocarbonilica e rimuovendo il nucleo furil-ciano-naftilico del composto 6 per rimpiazzarlo con uno cumarinico fluorofenil-

sostituito si è giunti al **composto 16** con una potenza *in vitro* comparabile al composto 6, e con un'alta efficacia antinfiammatoria *in vivo*, ma privo di quegli effetti collaterali tossici (ad esempio, l'interazione covalente con le proteine) osservati per i precedenti elementi della classe (Grimm, *et al.*, 2006). La porzione cumarinica può essere sostituita da un gruppo 2-cianochinolinico indolico o benzotiofenico legante un gruppo 1,2,3-triazolico (**composto 17**). Della Merck & Co sono anche i derivati in cui la porzione tioarilica (agganciata al nucleo cumarinico fluorofenil-sostituito) è stata rimossa per far spazio ad un ammino-ossadiazolo (**composto 18**). Per tutte queste sostanze, è stata dimostrata una potente attività di inibizione della 5-LOX in test *cell-free* così come in quelli su sangue umano.

E' stata, di recente, ottenuta anche una serie di potenti inibitori non-redox della 5-LOX a struttura imidazolica derivanti da una tetraidropirano-carbossammide, quali il **CJ-13,610** (**composto 7**), (Mano, *et al.*, 2005) **CJ-13,610** (sviluppato dalla Pfizer) possiede una IC<sub>50</sub> di 70 nM in neutrofili intatti (Fischer, *et al.*, 2004) e di 230 nM nel sangue umano (Mano, *et al.*, 2005). In contrasto con i relativi analoghi tetraidropiranic (ad esempio, **ZM230487**), l'efficienza di CJ-13,610 non è intaccata dalla fosforilazione della 5-LOX (Fischer, *et al.*, 2004). **CJ-13,610** ha mostrato, anche, un'efficacia significativa in vari modelli pre-clinici di dolore, con un effetto antiiperalgiesico associato alla riduzione dei livelli di LT nel cervello infiammato (Cortes-Burgos, *et al.*, 2009). Basandosi sulla struttura di **CJ-13,610**, è stato ottenuto il **composto 19** nel quale il gruppo imidazolico di **CJ-13,610** è stato sostituito da un residuo pirazolico (**fig.3.6**). Questo composto ha raggiunto un valore di IC<sub>50</sub> di 135 nM nel sopprimere la formazione di LTB<sub>4</sub>, (indotta da carragenina nei polmoni di ratto) alla dose di 3 mg / kg. Un altro recente studio della Pfizer sostiene che i pirazolo-derivati, in cui il gruppo carbossamidico è stato scambiato con un carbonitrile e i gruppi arilici sono stati fluorurati, siano particolarmente attivi come il **composto 20** con un valore di IC<sub>50</sub> nel sangue umano di 33 nM e su 5-LOX isolate di 84 nM.

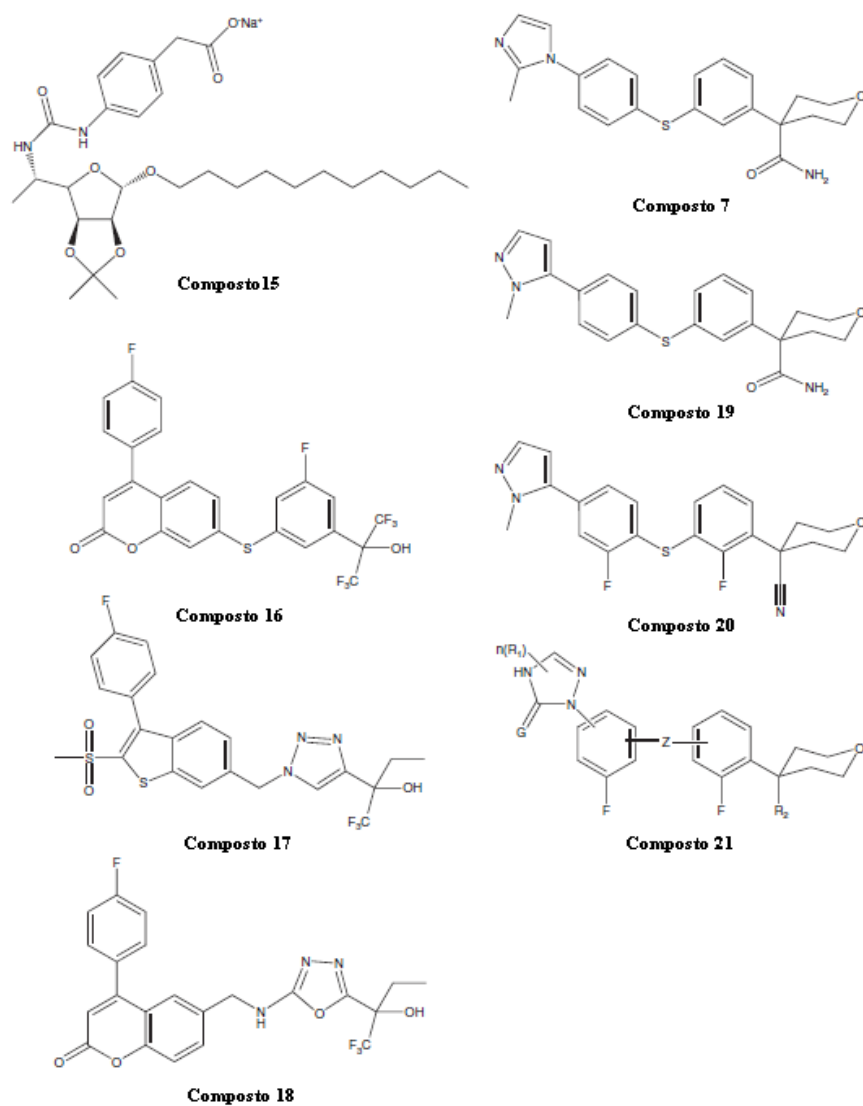


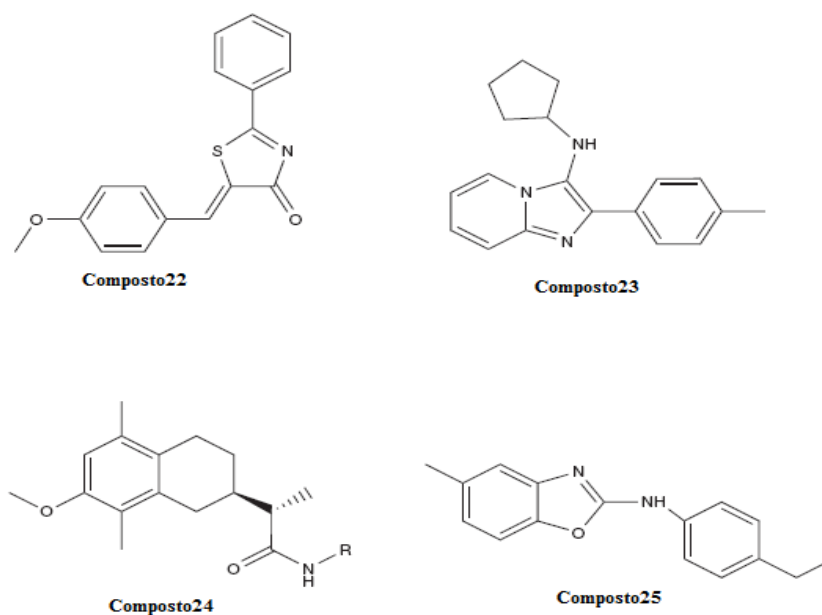
Figura 3.6 Nuovi inibitori non-redox della 5-LOX

Derivati tetraidropirani con struttura triazolica come il **composto 21** (fig.3.6), secondo quanto sostenuto dai laboratori della Ranbaxy, inibirebbe la sintesi di LTB4 in neutrofili ionoforo-stimolati con una  $IC_{50} > 10$  nM ma l'attività nei test su sangue o *in vivo* non è stata riportata (Goethe *et al.*, 2009). Una serie di nuovi derivati tiazolici triciclici con una porzione centrale tiazolonica è stata identificata mediante *screening virtuale* ottenendo composti come il **composto 22** (fig.3.7) che inibisce la 5-LOX di 0,15 e 0,17  $\mu$ M, rispettivamente sull'enzima purificato e nei neutrofili intatti, ma ancora una volta l'efficacia *in vivo* o sull'uomo non è



riportata (Goethe *et al.*, 2009). Nello stesso studio, derivati di imidazopiridine sono stati considerati alla stregua dei precedenti, e il rappresentante più potente (**composto 23**) inibisce la 5-LOX nei neutrofili intatti e nel sovrantante dei corrispettivi omogenati, con valori di  $IC_{50}$  di 0,7 e 0,9  $\mu$ M. Anche tramite *screening virtuale*, a partire da composti di origine naturale, sono stati identificati tetraidronaftol-derivati come il **composto 24** che sopprime l'attività della 5-LOX nei neutrofili intatti e nei rispettivi preparati *cell-free* con valori di  $IC_{50}$  nell'ordine del sub-micromolare. Recentemente, un sulfamidico-spiro (2H-1-benzopirano-2,4-piperidin) è stato brevettato come inibitore della 5-LOX, molecola con una nuova struttura di base, ma sprovvista di una completa caratterizzazione. Infine, una serie di benzo-ossazoli (esemplificati dal **composto 25**) si sono dimostrati attivi nell'inibire la 5-LOX in cellule del midollo osseo con una  $IC_{50} = 0,12 \mu$ M.

Per tutti i composti citati, il meccanismo molecolare di inibizione della 5-LOX è sconosciuto, ma in base alle loro strutture si possono già da ora escludere proprietà riducenti o chelanti il ferro.



**Figura 3.7** Nuovi inibitori non-redox della 5-LOX

### 3.3 Nuovi inibitori duali

#### *Inibitori duali COX/5-LOX*

L'inibizione della 5-LOX e del *pathway* delle COXs è stata una delle grandi strategie farmacologiche degli ultimi 15 anni, mirata a sviluppare una più efficace terapia anti-infiammatoria, riducendo il numero e la gravità degli effetti collaterali derivanti dai precedenti approcci terapeutici (Celotti, *et al.*, 2001). Tale inibizione può essere ottenuta sia sfruttando un singolo composto con una doppia azione sia combinando un inibitore della 5-LOX, con un inibitore delle COXs (**fig.3.8**). Per quanto riguarda questi ultimi, l'applicazione combinata dell'inibitore COXs *Naprossene 2-Metansulfonil-etil estere* e l'inibitore della 5-LOX *Zileuton* è stata recentemente affermata. Tuttavia, la possibilità di ottenere un unico prodotto con una duplice azione si è dimostrata più interessante. Il **Licofelone (composto 10, fig.3.1)** è stato uno dei prototipi sviluppati nel 1994 da *Laufer et al.* 1994, che è riuscito sia nell'intento di inibire la 5-LOX che le COX in vari modelli cellulari con valori di  $IC_{50}$  nell'intervallo sub-micromolare-micromolare (*Tries et al.*, 2002). Recenti indagini hanno indicato che i principali *targets* del Licofelone sono la proteina FLAP (*Fischer, et al.*, 2007), la COX-1 e prostaglandina E2 sintasi-1 microsomiale (**mPGES-1**) (*Koeberle, et al.*, 2008), ma non 5-LOX né tantomeno la COX-2. Tali risultati sono sostenuti dalla somiglianza strutturale del Licofelone con l'inibitore FLAP/mPGES-1 **MK-886** (*Fischer, et al.*, 2007) in grado di bloccare anche la COX-1 (*Koeberle, et al.*, 2009). Il Licofelone ha comunque, mostrato efficacia clinica nell'osteoartrite ed è attualmente in Fase III di sperimentazione clinica. Si noti che rispetto ai FANS tradizionali il Licofelone ha dimostrato una tollerabilità gastrointestinale maggiore in modelli animali, e ha mostrato superiore tollerabilità gastrica e una minore incidenza di ulcere nei soggetti sani volontari (*Kulkarni et al.*, 2008). È interessante notare che il **Celecoxib**, inibitore selettivo della COX-2 (**composto 26**,  $IC_{50}$  per COX-2 nel sangue umano intero di 0,87  $\mu$ M) è stato recentemente identificato come inibitore della 5-LOX (*Sud'ina et al.*, 2008) e quindi può essere classificato come un inibitore duale COX/5-LOX. In particolare, il Celecoxib sopprime la formazione dei prodotti della 5-LOX nei neutrofili umani (con una  $IC_{50}$  di 8  $\mu$ M) nel sangue umano (con una  $IC_{50}$  di 27,3  $\mu$ M) e nei confronti dell'enzima purificato (con una  $IC_{50}$  di 23-25  $\mu$ M). Le relative isoforme della 5-LOX (la 12 e la 15-LOX) non sono inibite dall'azione del Celecoxib e altri inibitori COX-2 selettivi (Etoricoxib e Rofecoxib) o il Diclofenac hanno fallito nell'inibire anche la 5-LOX. Il Celecoxib, somministrato per via intraperitoneale riduce i livelli ematici di LTB4 con un  $ED_{50}$  di 35,2 mg / kg nel topo (*Maier et al.*, 2009).

Sono stati identificati come inibitori duali 5-LOX/COX anche nuovi diaril-ditiolani e isotiazoli come il composto **27** (5- (4- (metilsolfonil) fenil)-4-p-tolil-3H-1 ,2-ditiol-3-tione) con evidenti analogie strutturali con i coxib (*Scholz et al.*, 2009). Il *lead compound* **27** riesce, infatti, ad inibire sia le COX-1 e -2, che la 5-LOX con valori di  $IC_{50}$  nel range di 7-9  $\mu$ M, in saggi

cellulari. Inoltre si è dimostrato efficace nel trattamento della peritonite, in modelli *in vivo* su ratti, con una dose di 50 mg / kg, per via intraperitoneale.

*Chen et al.* hanno presentato la sintesi di un nuovo inibitore basandosi sulla struttura del Rofecoxib (**composto 28**, incapace di inibire la 5-LOX), in cui l'incorporazione di un'ossima in posizione para sull'anello fenilico in C3 dello stesso, ha portato al **composto 29**, che non solo blocca la COX-2 ma anche la 5-LOX, con una  $IC_{50}$  di 1,4 e 0,28  $\mu$ M, rispettivamente (*Chen et al., 2006*). Questo composto è in grado di inibire anche la 15-LOX e *in vivo* ha mostrato una buona attività anti-infiammatoria (in saggi di edema della zampa di ratto). Lo stesso gruppo ha identificato una serie di 1,3-diarilprop-2-inoni possedenti un gruppo farmacoforico per le COX-2 rappresentato dal *p-SO<sub>2</sub>Me* in C3 (esemplificati nel **composto 30**) come inibitori sia di entrambe le COX che delle 5/15-LOXs (con rispettive  $IC_{50}$  di : (COX-1) 9,2  $\mu$ M; (COX-2) 0,32  $\mu$ M, (5-LOX) 0,32  $\mu$ M; (15-LOX) 0,36  $\mu$ M) in combinazione ad una buona attività anti-infiammatoria se somministrato per os. ( $ED_{50}$  = 35 mg / kg) rispetto a quella del Celecoxib ( $ED_{50}$  = 10,8 mg / kg) (*Rao, et al., 2006*).

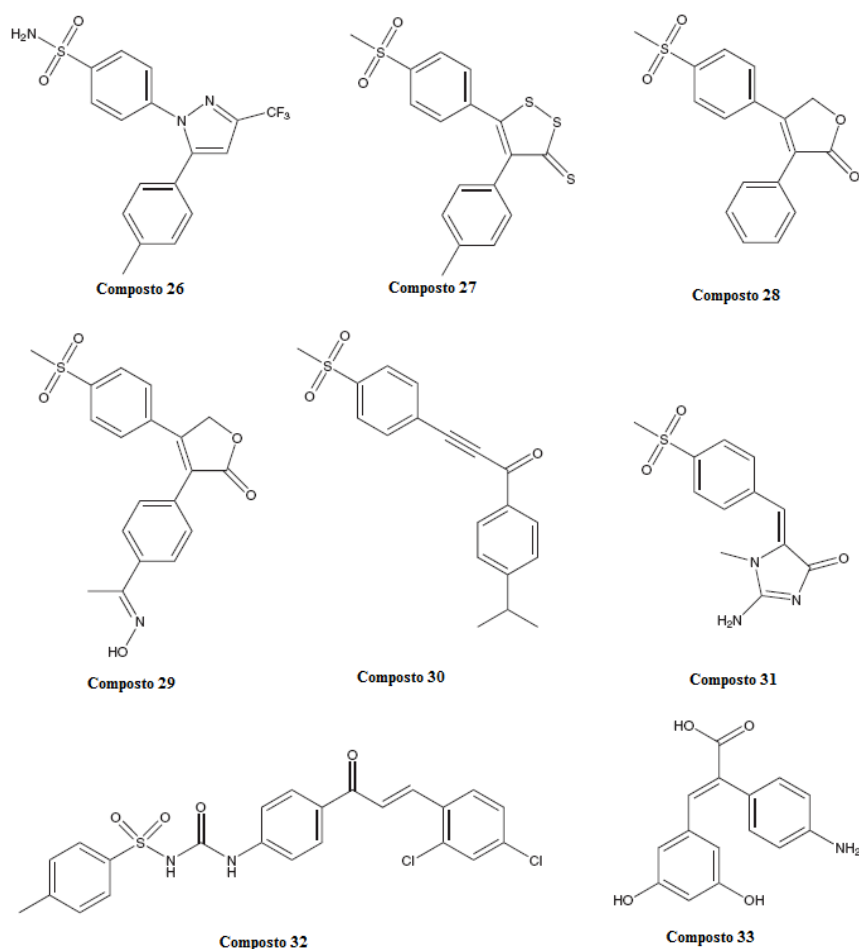
Allo stesso modo, il **composto 31** (nel quale il fenile con un gruppo *p-SO<sub>2</sub>Me* è legato ad un imidazol-4-one), inibisce contemporaneamente sia la 5-LOX che le COX (con valori di  $IC_{50}$  nel range di 0,31-2,59  $\mu$ M sia in saggi *cell-free* che cellulari) con buona attività antinfiammatoria nei roditori. Sorprendentemente, in questo composto, manca la seconda porzione arilica (legata all'anello a cinque membri centrale), che è di solito presente negli inibitori duali 5-LOX/COX (*Li, et al., 2009*).

Per mezzo di analisi *in silico*, una serie di 7-*ter-butyl-2,3-diidro-3,3-dimetilbenzofurano derivati* sono stati identificati come inibitori selettivi COX-2/5-LOX sulla base di *homology modeling*, simulazioni di dinamica molecolare, *docking* automatizzati e analisi *3D-QSAR*, ma purtroppo i dati biologici non sono ancora disponibili (*Zheng, et al., 2006*).

Nuovi composti sono stati introdotti anche da *Araico et al.* per i quali, due serie di *fenilsulfonil-urenil-calcon derivati* hanno inibito la formazione di PGE2 nei macrofagi del topo RAW264.7, con valori di  $IC_{50}$  nel range del sub-micromolare (*Araico, et al., 2006*). I composti selezionati hanno ridotto anche la sintesi di LTB4 mediante l'inibizione diretta della 5-LOX (con una  $IC_{50}$  all'incirca di 0,5-0,8  $\mu$ M) (*Araico, et al., 2006*). aggiungendo questa inibizione, alle varie attività farmacologiche sviluppate nei neutrofili (soppressione della *elastasi* e del rilascio delle *mieloperossidasi* per la generazione di superossidi). A tal proposito, il **composto 32** (2,4-dicloro-4'-*N*'(4 metilfenilsulfonil) urenil]calcone) ha ridotto i livelli di PGE2 e LTB4 in essudati presenti in polmone di ratto e nel liquido edematoso, di edema da carragenina nella zampa di ratto.

In ultima istanza, la combinazione del Resveratrolo con i derivati dell'acido propenoico ha portato alla formazione dell'*acido 2-(4-amminofenil)-3-(3,5-diidrossifenil)propenoico*

(**composto 33**) che oltre ad inibire dualmente le COXs (COX-1  $IC_{50}$  = 2.2  $\mu$ M, COX-2  $IC_{50}$  = 1,8  $\mu$ M) e la 5-LOX ( $IC_{50}$  = 0,28  $\mu$ M), influenza anche l'espressione di questi enzimi nell'inflammation polmonare murina LPS-indotta (Xu, et al., 2009a). Tale composto ha esibito effetti anti-infiammatori e antinocicettivo *in vivo* accompagnati anche da una maggiore sicurezza gastrica (Xu, et al., 2009b).



**Figura 3.8** Nuovi inibitori duali 5-LOX/COX

*Nuovi inibitori duali Prostaglandina E<sub>2</sub> sintasi-1 microsomiale (m-PGES-1) e 5-LO*

A partire dal dualismo 5-LOX/COX, è stata suggerita una nuova strategia farmacologica, che potrebbe aggirare la tossicità cardiovascolare degli inibitori 5-LOX/COX-2 rivolgendolo la sua attenzione in maniera contemporanea alla 5-LOX e alla mPGES-1, enzima che produce PGE<sub>2</sub> a partire da PGH<sub>2</sub>, un COX-2-derivato (Koeberle *et al.*, 2008): il rischio cardiovascolare associato, infatti, all'uso di farmaci COX-2-selettivi che influenzano negativamente il bilancio prostaciclina/trombossano, potrebbe essere, così, drasticamente ridotto, dato che in questi termini l'inibizione della mPGES-1 non inibisce più la formazione di prostaciline (Koeberle, & Werz 2009). Gli studi iniziali hanno rivelato che una  $\alpha$ -(*n*)-alchil-sostituzione e l'inserimento di una 6-aminochinolina al posto della *o*-dimetilnilina presente nell'acido pirinixico (**composto 34**, **fig 3.9**) ha portato allo sviluppo del **composto 35** potente soppressore della 5-LOX in neutrofili umani (IC<sub>50</sub> = 0,6  $\mu$ M) (Werz *et al.*, 2008).

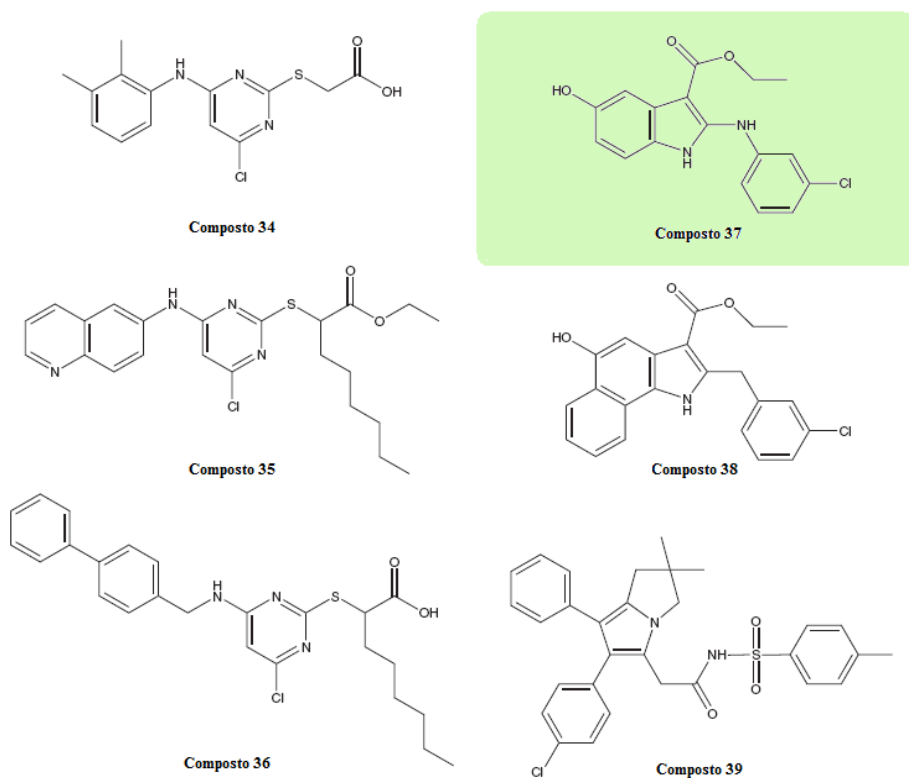
Mirare modifiche strutturali di questi derivati dell'acido pirinixico  $\alpha$ -(*n*)-alchil-sostituiti, e in particolare la sostituzione della 2,3-dimetilanilina con un difenil-4-il-ammino metano, ha determinato la potente soppressione dell'attività della mPGES-1 e della 5-LOX, come nel **composto acido 36** (IC<sub>50</sub> = 1,3 e 1  $\mu$ M, rispettivamente).

L'inibizione contemporanea della di 5-LOX e della mPGES-1 è evidente soprattutto con i nuovi derivati **indol-3-carbossilati** (**fig. 3.9**). Infatti, una serie di 2-amino-5-idrossiindol-3-carbossilati (ad es. **composto 37**) sono stati identificati come potenti inibitori della 5-LOX umana sia come enzima tal quale che come 5-LOX presente in neutrofili umani (Landwehr *et al.*, 2006). Ottimizzandone la struttura si è giunti ai nuovi **benzo[g]indol-3-carbossilati** (**composto 38**), in grado di inibire l'attività della 5-LOX, ancora una volta, sia sull'enzima tal quale che in saggi cellulari su neutrofili umani, con valori di IC<sub>50</sub>, rispettivamente, di 0,23 e 0,086  $\mu$ M

Il *lead-compound* **38** ha efficientemente bloccato la formazione di prodotti della 5-LOX, anche nel sangue umano intero con una IC<sub>50</sub> di 0,83-1,6  $\mu$ M riducendo anche la sintesi di LTB<sub>4</sub> negli essudati pleurici di ratti carragenina-indotti, con maggiore effetti nel trattamento della pleurite (Karg *et al.*, 2009). Il composto **38** e i suoi derivati, hanno anche inibito la mPGES-1 umana mostrando una IC<sub>50</sub> di 0,6  $\mu$ M sull'enzima tal quale così come hanno fatto in cellule intatte **A549** (IC<sub>50</sub> = 2  $\mu$ M), sopprimendo i livelli di PGE<sub>2</sub> presenti negli essudati pleurici di ratti, carragenina-indotti. Purtroppo l'attività cellulare di entrambe le COX-1/2 non ha risentito in alcun modo della presenza dei composti (Koeberle *et al.*, 2009).

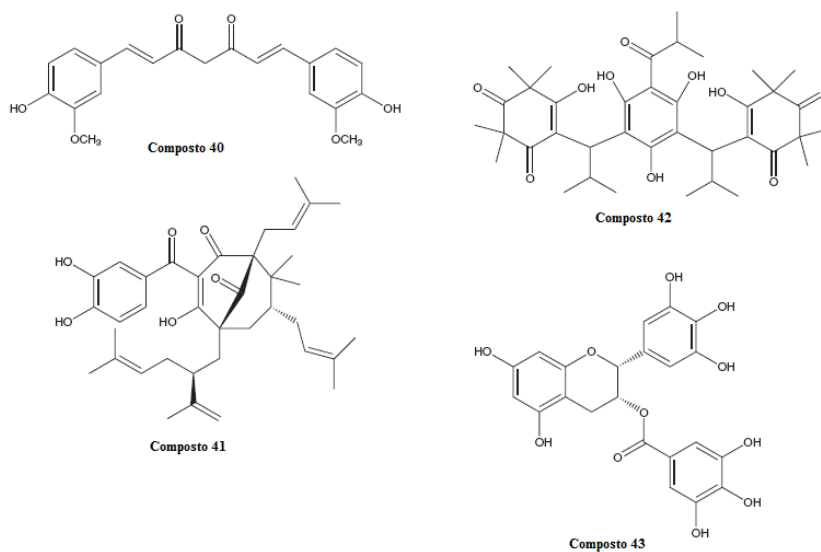
Recentemente, è stata ottenuta una serie di nuove *sulfonimmidi* a struttura *tolilsulfonimmidica* (**composto 39**) (basate sulla porzione *aril-pirrolizinica* del licofelone) che ha fornito buoni risultati inibendo l'azione della mPGES-1 in un *cell-free test* e quella della 5-LOX in cellule

intatte con ridotti effetti inibitori sulla COX (Liedtke et al., 2009) (fig. 3.9). Purtroppo, sia i dati in vivo che i risultati preclinici non sono disponibili



**Figura 3.9** Nuovi inibitori duali 5-LOX/mPGES-1

In ultima istanza, si annoverano composti di origine naturale come potenti inibitori duali della 5-LOX e della mPGES-1, in particolare composti fenolici lipofili (fig.3.10), come la Curcumina (**composto 40**) dalla *Curcuma* (Koeberle, et al., 2009a), il Garcinolo (**composto 41**) dalla buccia del frutto delle specie *Guttiferae*, il Mirtocommulone (**composto 42**) dal Mirto (*Myrtus communis*) e l'Epigallocatechin-3-gallato (**composto 43**) dal tè verde (*Camellia sinensis*) (Koeberle, et al., 2009b). Va' precisato che molti di questi composti erano noti come soppressori della formazione di PGE<sub>2</sub> in saggi cellulari o anche *in vivo*, sebbene non fosse stata evidenziata l'azione inibitoria sulla mPGES-1, bersaglio farmacologico (Koeberle, & Werz 2009). Inoltre, i prodotti naturali e i rispettivi estratti delle piante di cui sopra posseggono una ben nota e già consolidata attività antinfiammatoria, come dimostrato in diversi studi preclinici o clinici.



**Figura 3.10** *Composti di origine naturale inibenti la 5-LOX*

### 3.4 SCOPO ED ARTICOLAZIONE DEL PROGETTO DI RICERCA

Come è noto, nel percorso che va dalla progettazione di un farmaco al test biologico di una libreria di composti si possono distinguere alcune fasi: lo sviluppo del metodo; la validazione con un numero di composti limitato; la produzione della libreria, la fase analitica e di controllo qualità. Dopo decenni in cui i cambiamenti tecnologici erano stati tutto sommato contenuti, almeno per quel che riguarda la chimica sintetica, la possibilità di creare collezioni (*libraries*) di composti nell'ordine delle decine o centinaia di migliaia di prodotti diventava concreta anche per la sintesi delle molecole organiche più in generale. Convenzionalmente si possono definire *primary libraries* quelle libraries usate nella fase di ricerca di un hit. Una *focused library* può essere invece definita come una library dedicata all'espansione veloce di una classe chimica già ben individuata: Come tale si avvale di conoscenze pregresse di SAR e solitamente conta meno di 1000 composti, frequentemente il range è di 50-500 composti. Nel processo di Drug Discovery l'intervento della *combinatorial chemistry* è di solito limitato alle fasi di *hit identification* ( o *hit finding*) e di *lead finding*. Serie di prodotti via via più piccole e definite vengono sintetizzate nella fase di lead optimization. Una *primary library* non è necessariamente una *random library* ma può riguardare una classe chimica specifica e una classe di target già definita.

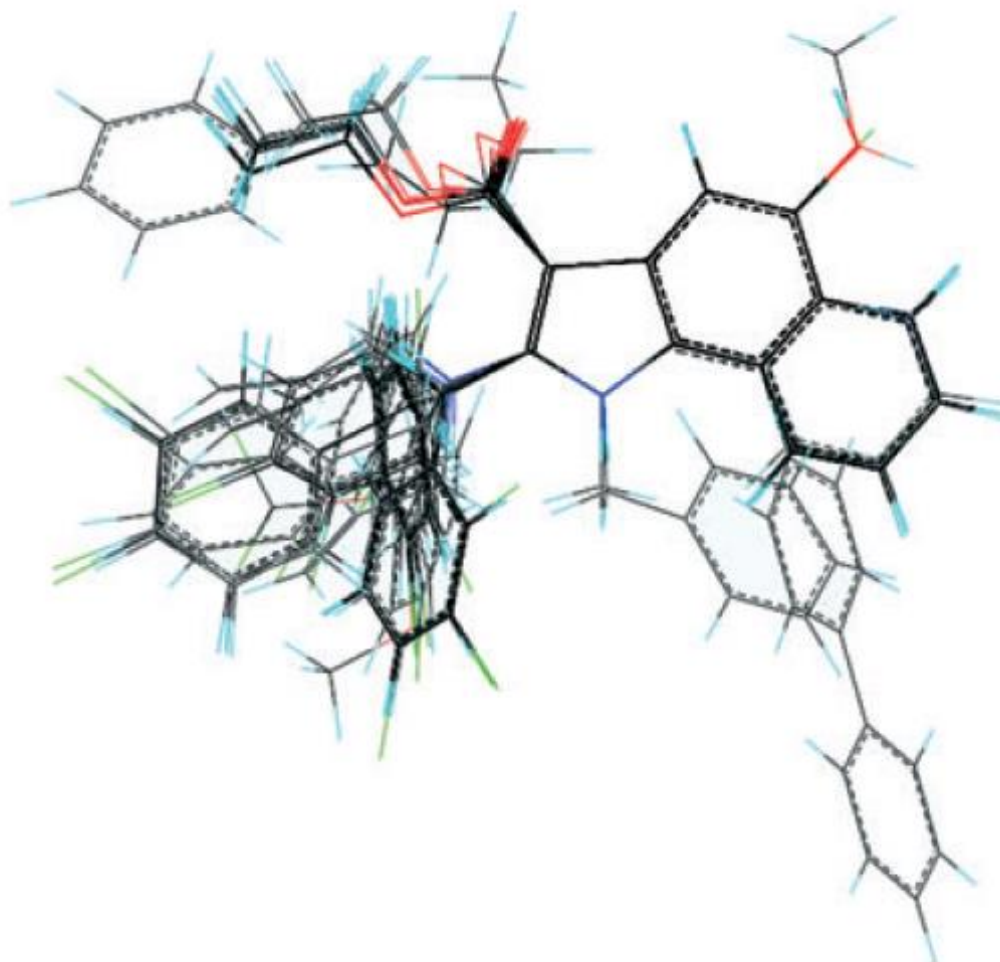
Recipite tali informazioni, l'attività scientifica svolta durante il corso di dottorato si è sviluppata affrontando la sintesi di diverse librerie di composti, al fine di individuare molecole guida per lo sviluppo di nuovi *lead* con attività inibitoria a carico della 5-LOX.

Nello specifico il progetto di ricerca si è articolato nel modo seguente:

- ♣ Progettazione e sintesi di nuovi derivati a nucleo indolico e benzo[g]indolico;
- ♣ Progettazione e sintesi di nuovi derivati a nucleo catecolico;
- ♣ Progettazioni e sintesi di nuovi derivati a nucleo chinonico;
- ♣ Studi in vitro e su cellula per *screening* di potenziali molecole di interesse farmacologico;
- ♣ Ottimizzazioni strutturali al fine di ampliare le informazioni SAR delle tre classi di composti;
- ♣ Saggi in vitro e in vivo per la selezione di nuovi *lead compounds* per applicazioni terapeutiche

Ognuna delle tre classi di composti ha interessato un anno specifico del corso di dottorato al fine di ottenere un quadro sufficientemente dettagliato circa le caratteristiche strutturali necessarie ad una molecola affinché questa possa espletare un'attività inibitoria nei confronti della 5-Lipossigenasi, impiegabile nel trattamento di patologie infiammatorie acute e croniche





#### CAPITOLO IV

#### PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI DERIVATI A NUCLEO INDOLICO E BENZO[g]INDOLICO

#### 4.1 SINTESI e VALUTAZIONE BIOLOGICA DI COMPOSTI A NUCLEO *Etil 5-Idrossindol-3-Carbossilato*

##### 4.1.1. PRESUPPOSTI SCIENTIFICI E SCOPO DELLO STUDIO

Un gruppo di ricerca capitanato da O.Werz nel 2006 ha aggiunto, alla classe dei nuovi inibitori della 5-LOX, una serie di derivati a nucleo *etil-2-amino-5-idrossindol-3-carbossilato* dimostratisi essere buoni inibitori della Lipossigenasi sia in test *cell-free* che in test cellulari (PMNL), ma per i quali non è stato possibile individuare un reale meccanismo d'azione. In particolare, il capostipite della serie è rappresentato dall'*Etil 2-[(3-clorofenil)-amino]-5-idrossi-1H-indol-3-carbossilato* (composto **37**, fig.3.9) che, con valori di IC50, sia nei confronti dell'enzima purificato che all'interno del sistema cellulare, rispettivamente dell'ordine di 0.3  $\mu\text{M}$  e 2.4  $\mu\text{M}$ , si è dimostrato un ottimo inibitore enzimatico.

Successive modifiche strutturali del *lead*, apportate dal medesimo gruppo di ricerca, hanno permesso di ampliare le informazioni di correlazione struttura attività e di identificare i requisiti strutturali necessari per un incremento dell'azione inibitoria. Questi possono essere così riassunti:

1. il nucleo *5-idrossi-indolico* è indispensabile ai fini dell'attività, soprattutto nei *tests cell-free*;
2. il gruppo *anilino* in posizione **2** non è essenziale per l'attività;
3. la presenza di un gruppo benzilico o fenil-etilico sostituito con un alogeno porta a composti dotati di attività superiore o paragonabile al *lead* di riferimento sia nei confronti dell'enzima tal quale che in cellula. (fig.4.1)

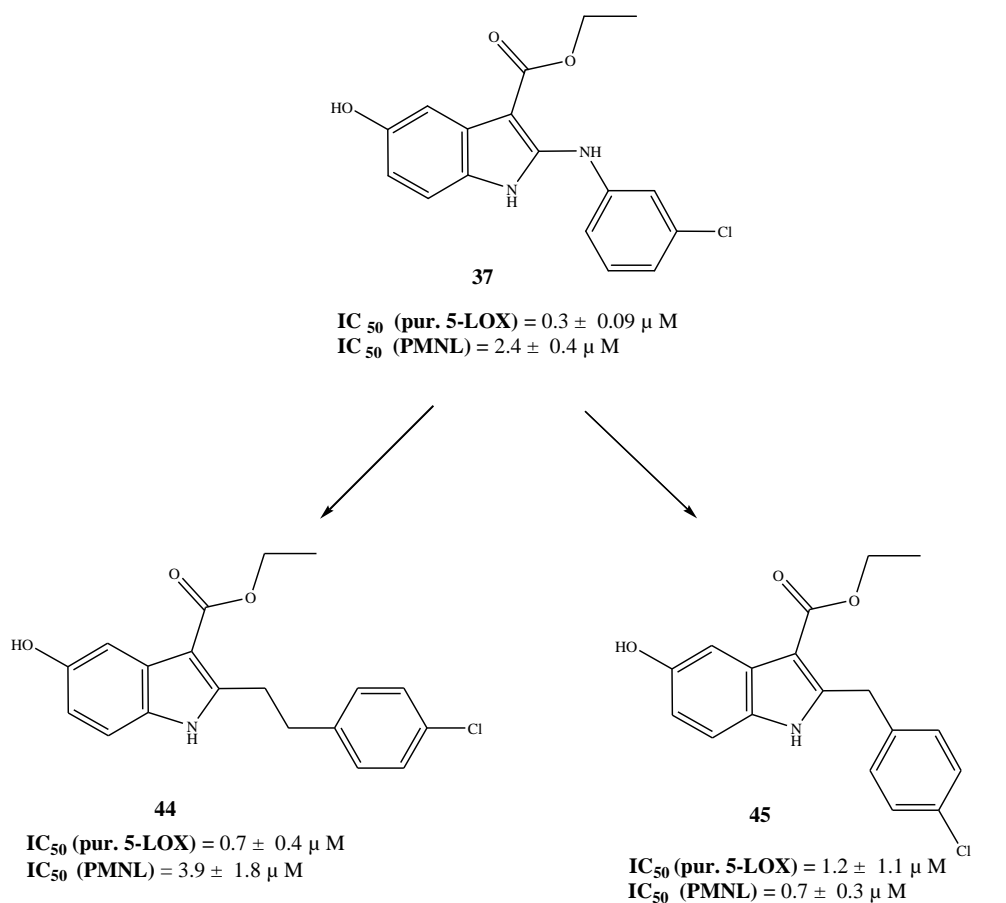
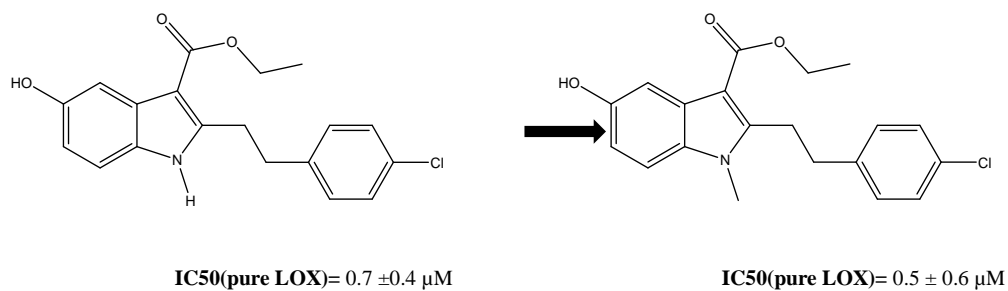


Figura 4.1. Composti indolici inibitori della 5-LOX

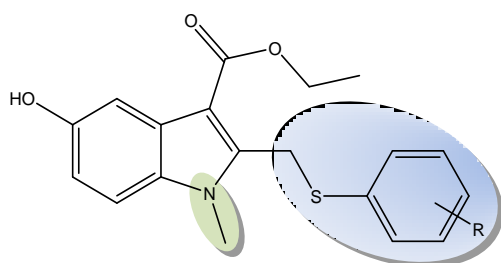
A quanto affermato, si aggiunge che in uno studio (non pubblicato) condotto in precedenza dal gruppo di ricerca a cui afferisco si evidenziava come la metilazione dell'atomo di azoto in posizione 1 del nucleo 5-idrossindolico portava allo sviluppo di composti ad attività paragonabile rispetto ai composti di letteratura (fig.4.2)



**Figura 4.2** Tollerabilità della metilazione dell'azoto indolico rispetto al composto lead

Pertanto, partendo da questi presupposti allo scopo di implementare lo studio di SAR, il lavoro da me svolto durante il primo anno di Dottorato ha interessato la sintesi di una nuova serie di composti a nucleo indolico. Nello specifico, sfruttando un approccio chimico farmaceutico classico, ho apportato alcune modifiche strutturali:

- l'inserimento di un gruppo feniltiometilico variamente sostituito in posizione 2;
- la *N*-metilazione dell'azoto indolico.



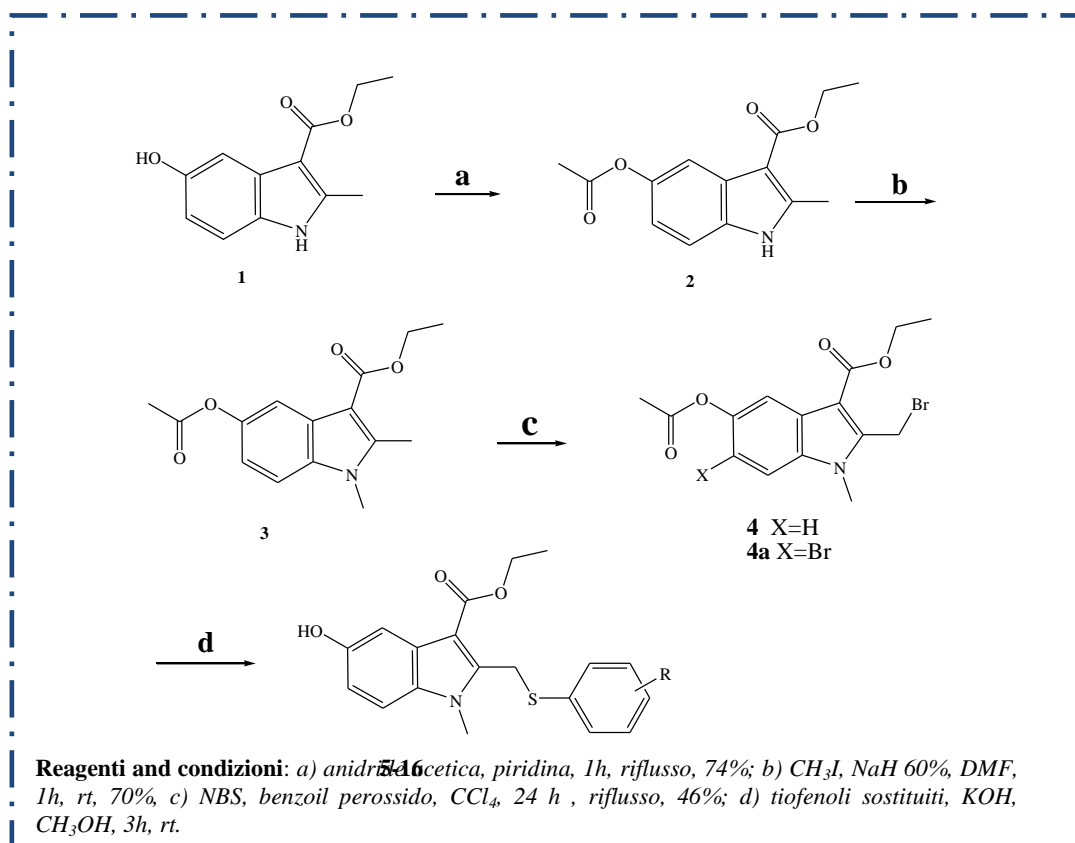
5. R=H
6. R=2-OCH<sub>3</sub>
7. R=4-Cl
8. R=4-F
9. R=4-OCH<sub>3</sub>
10. R=3,5-CH<sub>3</sub>
11. R=2-CF<sub>3</sub>
12. R=4-CF<sub>3</sub>
13. R=4-OCF<sub>3</sub>
14. R=2,4-F
15. R=2,6-Cl
16. R=2,4,6-CH<sub>3</sub>

#### 4.1.2 PARTE CHIMICA

Nella progettazione di una serie di derivati si prefigge come obiettivo primario quello di individuare uno schema di sintesi versatile che preveda un intermedio comune per l'introduzione di diversi scaffolds.

Nell'ambito dello sviluppo e della validazione di diversi schemi sintetici per la sintesi della libreria di derivati indolici, è stata presa in considerazione la diversità molecolare come concetto fondamentale così come la facile realizzazione. Pertanto, la sintesi dei composti desiderati **I-XII** è riportata nello **Schema 4.1**.

Schema 4.1



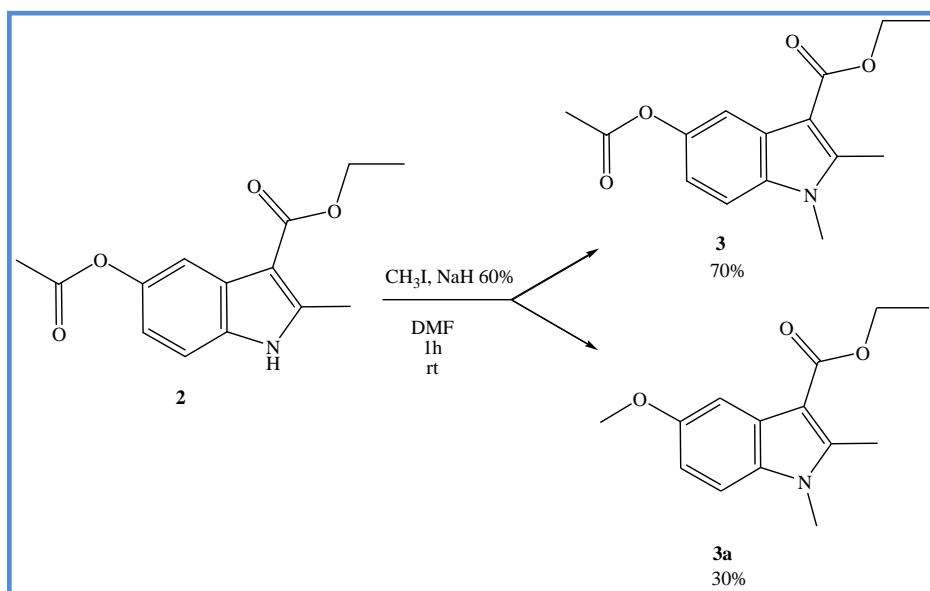
Il prodotto di partenza, l'etil 5-idrossi-2-metil-1H-indol-3-carbossilato (**1**) è stato sottoposto ad una reazione di protezione dell'OH fenolico mediante l'utilizzo di anidride acetica e piridina. Il composto

acetilato **2** è stato ottenuto con una resa del 74% in seguito a purificazione mediante flash cromatografia.

La metilazione dell'azoto indolico è stata ottenuta trattando il composto **2** con iodometano in presenza di una dispersione al 60% di NaH in olio minerale. La reazione, condotta in DMF per 1 h a temperatura ambiente, ha portato alla formazione dell'intermedio **3**, con una resa del 70% in seguito a purificazione per flash cromatografia.

Durante tale reazione, si ha la completa scomparsa del prodotto di partenza con formazione di un sottoprodotto (**3a**) in cui, si è avuta l'idrolisi del gruppo acetilico e la contemporanea metilazione dell'ossidrilico (Schema 4.2).

Schema 4.2



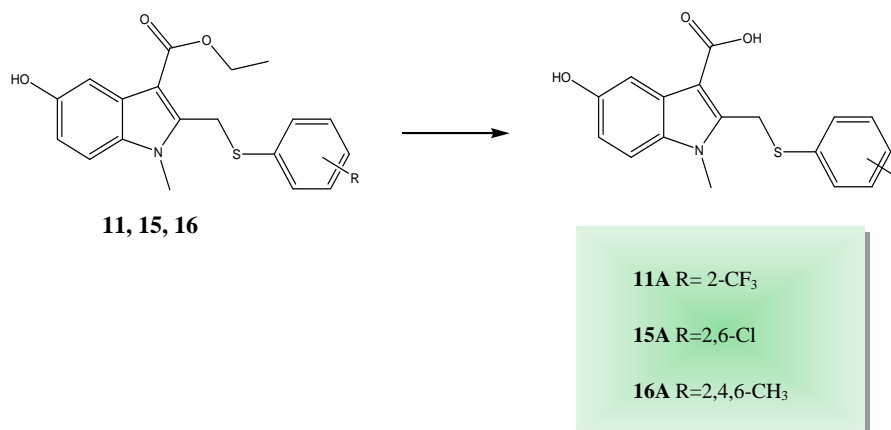
La bromurazione radicalica del  $\text{CH}_3$  allilico è stata condotta utilizzando la N-bromosuccinimide (NBS), con l'aggiunta di quantità catalitiche di perossido di benzoile. La reazione è stata condotta in tetracloruro di carbonio a refluxo per tutta la notte fornendo mono- e dibromurati, con rese rispettive del 46% e del 6%, facilmente separati mediante flash-cromatografia su di gel di silice.

A questo punto, l'intermedio monobromurato è stato sottoposto ad una reazione di sostituzione nucleofila, mediante l'utilizzo di diversi tiofenoli, variamente sostituiti con gruppi ad attrazione o a

rilascio elettronico, per fornire i composti finali **5-16**, con rese complessive, comprese tra il 41% e il 99%, dopo purificazione mediante flash cromatografia.

Allo scopo di ampliare le informazioni di correlazione struttura-attività e verificare il ruolo effettivo del gruppo estereo nell'attività biologica, ho sintetizzato composti **11A**, **15A** e **16A** che rappresentano rispettivamente i derivati carbossilici dei composti **11**, **15** e **16** risultati essere i più attivi della serie. I composti sono stati ottenuti mediante reazione di idrolisi in ambiente alcalino condotta in etanolo e acqua per 16h. Essi sono stati, poi, purificati mediante flash cromatografia ed ottenuti con rese comprese fra il 15 e il 20% (**Schema 4.3**)

**Schema 4.3**



**Reagenti e condizioni:** NaOH, H<sub>2</sub>O/EtOH, 90°C, 16h, 15-20%.

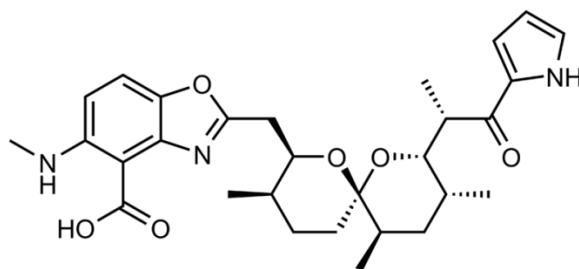
#### 4.1.3 PARTE BIOLOGICA e CONCLUSIONI

I *tests* biologici sono stati condotti presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli studi di Jena, Germania, sotto la supervisione del Prof. Oliver Werz.

In primo luogo è stata valutata l'attività inibitoria nei confronti delle tre differenti lipossigenasi (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) allo scopo di evidenziare una possibile selettività d'azione fra le varie isoforme.

Nello specifico, i test hanno permesso di identificare la capacità inibitoria delle molecole saggate in *maniera indiretta*, determinando la percentuale di formazione dei leucotrieni (LTB<sub>4</sub>, HPETE, ecc.) prodotti dall'enzima.

Cellule di polimorfonucleati (PMNL), vengono opportunamente trattate con l'aggiunta di 2.5 µM di **Calcimina** (A23187, uno ionoforo del Ca<sup>2+</sup>) (**fig. 4.3**), che mimando lo stimolo infiammatorio è in grado di stimolare la produzione di leucotrieni (Werz, *O. 2002*), promuovendo l'attivazione della cPLA<sub>2</sub> responsabile del rilascio dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana.



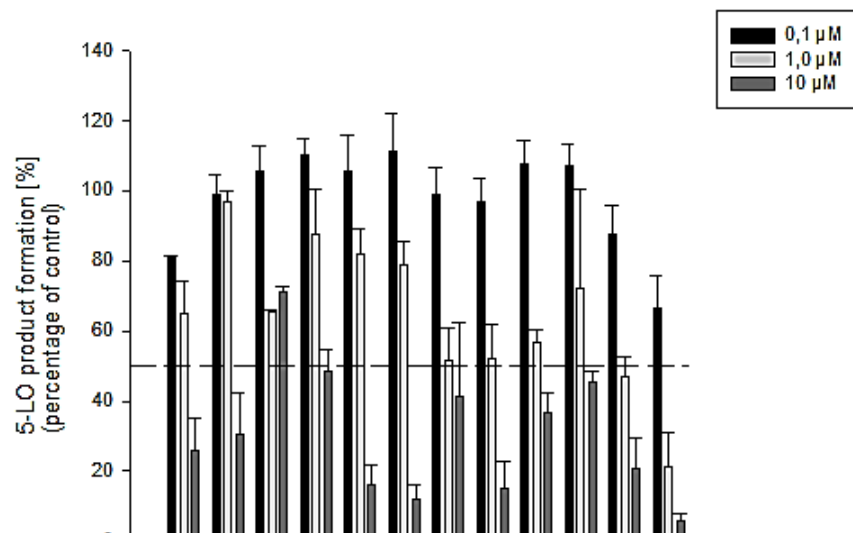
**Figura 4.3** Struttura della Calcimicina

In questo tipo di saggio, la riduzione della produzione dei leucotrieni, oltre che all'inibizione della 5-LOX, potrebbe essere legata anche all'inibizione di altri enzimi coinvolti nel *pathway*, quali FLAP e/o cPLA<sub>2</sub>. Per escludere quest'ultimo evento il saggio viene condotto anche in presenza di acido arachidonico esogeno (20 µM).

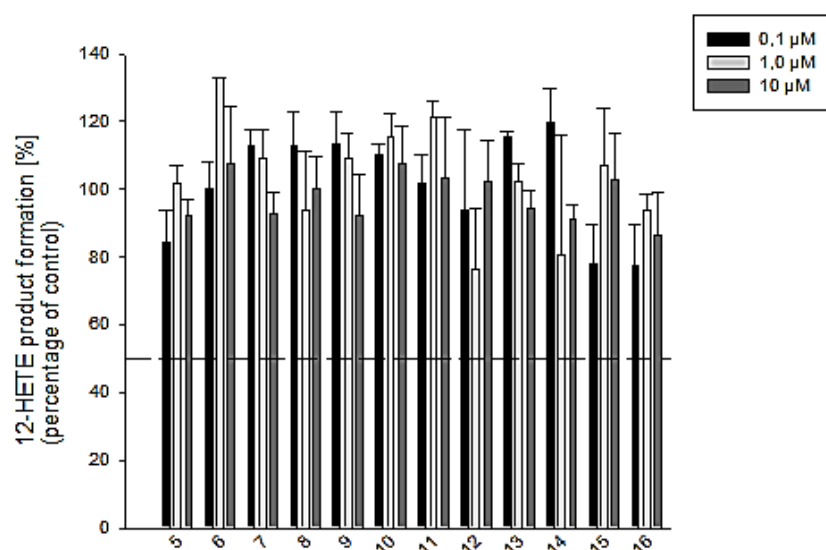
Il saggio condotto ha permesso di valutare la percentuale di formazione dei rispettivi prodotti enzimatici di 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX in seguito a trattamento con dosi crescenti di inibitore (0.1, 1 e 10 µM) (**fig. 4.4**).

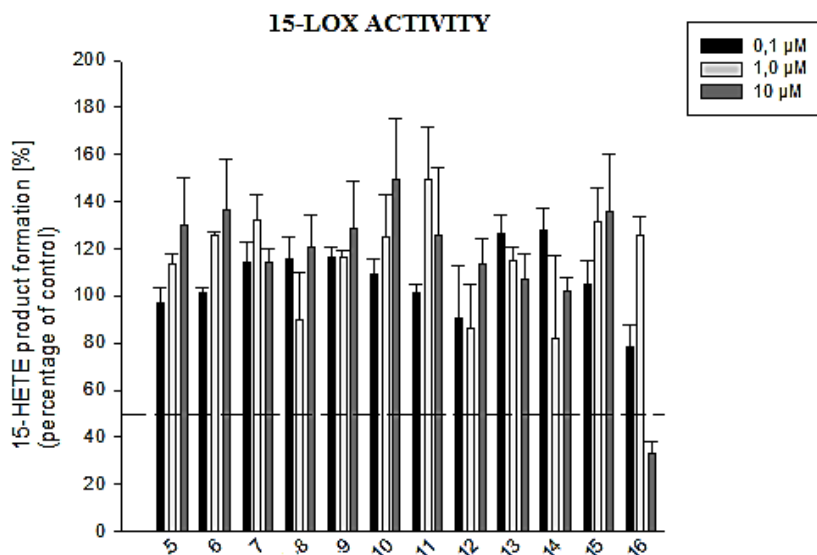


### 5-LOX ACTIVITY



### 12-LOX ACTIVITY





**Figura 4.4** Inibizione dell'attività di 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX da parte dei composti 5-16

Nello specifico è stata determinata la percentuale di attività enzimatica della 12- e della 15-LOX rispetto al *Cinnamil-3,4-diidrossi- $\alpha$ -cianocinnamato* (CDC) e solo per il composto **16** è stato possibile determinare un valore di  $IC_{50}$  pari ad  $8.2\mu M$ .

**Tabella 4.1.** Inibizione della 12- e della 15-LOX in cellule di PMNL incubate con  $10\mu M$  di campione. I dati sono espressi come media  $\pm$  S.E.M.,  $n=3-4$

| Composto | Attività residua 12-LO, PMNL              | Attività residua 15-LO, PMNL              |
|----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
|          | dopo la somministrazione di $10\mu M$ (%) | dopo la somministrazione di $10\mu M$ (%) |
| 5.       | 107.6 $\pm$ 17.1                          | 136.2 $\pm$ 21.7                          |
| 6.       | 92.1 $\pm$ 12.3                           | 128.3 $\pm$ 20.3                          |
| 7.       | 94.1 $\pm$ 5.4                            | 107.1 $\pm$ 11.0                          |
| 8.       | 103.5 $\pm$ 17.6                          | 125.8 $\pm$ 29.0                          |
| 9.       | 102.4 $\pm$ 12.1                          | 113.9 $\pm$ 10.6                          |
| 10.      | 100.0 $\pm$ 9.9                           | 120.4 $\pm$ 13.8                          |
| 11.      | 92.9 $\pm$ 6.3                            | 114.0 $\pm$ 5.8                           |
| 12.      | 91.4 $\pm$ 4.1                            | 101.8 $\pm$ 6.0                           |
| 13.      | 102.6 $\pm$ 10.0                          | 135.8 $\pm$ 24.6                          |
| 14.      | 94.1 $\pm$ 12.3                           | 125.3 $\pm$ 20.3                          |
| 15.      | 107.4 $\pm$ 11.4                          | 149.7 $\pm$ 25.6                          |
| 16.      | 86.5 $\pm$ 12.8                           | 33.0 $\pm$ 5.1 ( $IC_{50} = 8.2\mu M$ )   |
| CDC      | 5.6 $\pm$ 0.9                             | 11.1 $\pm$ 3.7                            |

Una volta dimostrata l'azione selettiva, dose-dipendente, nei confronti della 5-LOX, si è proceduti alla determinazione dei valori di IC<sub>50</sub> di inibizione della sintesi dei leucotrieni in due differenti condizioni: all'interno di cellule di polimorfonucleati (PMNL) ed in un sistema *cell-free* di lisati cellulari di *Escherichia coli* esprimenti la 5-LOX ricombinante. I risultati ottenuti sono riportati in **tabella 4.2** dove ritroviamo i valori di IC<sub>50</sub> nei due differenti saggi e l'attività residua dell'enzima in seguito alla somministrazione dell'inibitore ad una concentrazione di 10 μM.

**Tabella 4.2.**

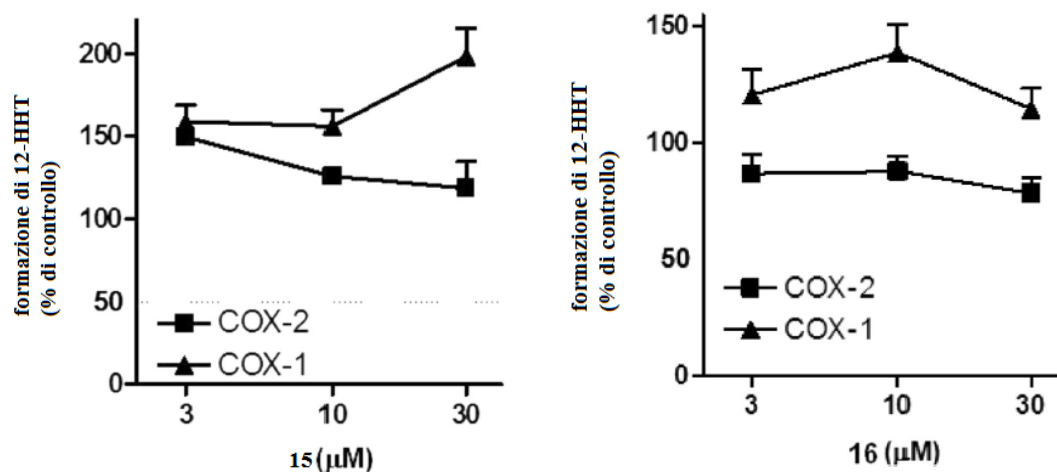
| Composto  | <i>cell-free</i>                                             |                       | <i>PMNL</i>                                                  |                       |
|-----------|--------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------|
|           | Attività residua dell'enzima 5-LO dopo la somm. di 10 μM (%) | IC <sub>50</sub> (μM) | Attività residua dell'enzima 5-LO dopo la somm. di 10 μM (%) | IC <sub>50</sub> (μM) |
| <b>5</b>  | 40.7±7.6                                                     | 5.7                   | 25.63±9.72                                                   | 2.38                  |
| <b>6</b>  | 21.9 ± 5.8                                                   | 2.9                   | 30.56 ± 12.01                                                | 5.14                  |
| <b>7</b>  | 45.3 ± 7.1                                                   | 3.8                   | 70.98 ± 1.68                                                 | /                     |
| <b>8</b>  | 41.2 ± 7.6                                                   | 5.0                   | 48.46 ± 6.19                                                 | 9.13                  |
| <b>9</b>  | 18.4 ± 3.3                                                   | 2.3                   | 16.24 ± 5.69                                                 | 3.09                  |
| <b>10</b> | 10.5 ± 2.1                                                   | 1.8                   | 11.84 ± 4.38                                                 | 2.70                  |
| <b>11</b> | 35.9 ± 5.6                                                   | 0.8                   | 15.19 ± 7.66                                                 | 1.17                  |
| <b>12</b> | 34.4 ± 6.1                                                   | 4.2                   | 53.22 ± 7.97                                                 | /                     |
| <b>13</b> | 33.9 ± 6.3                                                   | 0.9                   | 36.59 ± 5.60                                                 | 2.10                  |
| <b>14</b> | 37.4 ± 6.2                                                   | 3.2                   | 45.65 ± 3.03                                                 | 6.80                  |
| <b>15</b> | 33.9 ± 7.4                                                   | 0.8                   | 20.81 ± 8.44                                                 | 0.85                  |
| <b>16</b> | 14.7 ± 6.2                                                   | 0.7                   | 5.87 ± 1.80                                                  | 0.23                  |

Come mostrato in tabella, tutti i composti testati presentano una significativa potenza inibitoria nei confronti della 5-LOX sia in test *cell-free* che in saggi cellulari. Tali informazioni dimostrano che l'inserimento di un gruppo feniltiometilico in 2 e la metilazione del N-1 indolico rappresentano modifiche favorevoli ai fini dell'attività biologica. La natura e la posizione del sostituente sull'anello

feniltiometilico influenzano notevolmente l'attività biologica. In particolare è possibile dedurre da studi SAR che :

- ⊗ Il composto **5**, che non ha alcun sostituito sul tiofenolo, mostra una potenza inibitoria moderata sia in test *cell-free* (5,7  $\mu\text{M}$ ) che in PMNL (2,38  $\mu\text{M}$ );
- ⊗ L'inserimento di un gruppo elettron-donatore, metossilico o trifluoroacetossilico, in posizione 4 sull'anello feniltiometilico (**9** e **13**) è ben tollerata per l'attività in cellule intatte ( $\text{IC}_{50}$  = 3,09  $\mu\text{M}$  e 2,1  $\mu\text{M}$  rispettivamente) mentre un miglioramento dell'attività è stato osservato nel saggio *cell-free*, soprattutto per il derivato **13**, con un  $\text{IC}_{50}$  di 0,9  $\mu\text{M}$ ;
- ⊗ Lo spostamento del gruppo metossilico dalla posizione 4 (**9**) alla posizione 2 dell'anello (**6**) mantiene l'efficacia nel saggio sull'enzima purificato, con una piccola perdita di potenza in quello in cellule intatte;
- ⊗ I Composti **7**, **8** e **12**, che presentano sostituenti elettron-attrattori, come alogeni-F, -Cl o -CF<sub>3</sub> in posizione 4, sono equipotenti al composto **5** nel saggio *cell-free*, con valori di  $\text{IC}_{50}$  compresi tra 3,8 e 5,0  $\mu\text{M}$ , ma perdono marcatamente la loro potenza in PMNL;
- ⊗ Quando il gruppo trifluorometilico viene spostato dalla posizione 4 (**12**) alla posizione 2 (**11**), si ottiene un significativo miglioramento della potenza inibitoria non solo in test *cell-free* ma anche in cellula (rispettivamente  $\text{IC}_{50}$  = 4,2 vs 0,78  $\mu\text{M}$  e >10 vs 1,17  $\mu\text{M}$ );
- ⊗ L'introduzione di un altro fluoro al composto **8** nella posizione orto porta al composto **14**, che è più potente in entrambi i saggi cellulari ( $\text{IC}_{50}$  = 3,2  $\mu\text{M}$  e 6,8  $\mu\text{M}$  vs 5  $\mu\text{M}$  e 9,13  $\mu\text{M}$ ). Quando due alogeni occupano le posizioni orto dell'anello tiofenolico (**15**) si osserva un notevole incremento dell'attività inibitoria ( $\text{IC}_{50}$  = 0,8  $\mu\text{M}$  e 0,85  $\mu\text{M}$ );
- ⊗ L'introduzione di due gruppi metilici in meta (**10**) aumenta la potenza rispetto al composto **5** di circa 3 volte nel test *cell-free* ( $\text{IC}_{50}$  = 1,8  $\mu\text{M}$ ), mentre non si osservano sostanziali modifiche nel saggio su PMNL;
- ⊗ Infine, di particolare interesse è il fatto che la presenza di tre gruppi metilici in posizioni orto e para, (**16**), comporta un notevole aumento di inibizione della 5-LOX con valori di  $\text{IC}_{50}$  di 0,23  $\mu\text{M}$  (*cell-based*) e 0,7  $\mu\text{M}$  (*cell-free*).

Dei derivati più attivi della serie (**15** e **16**) è stata, infine, studiata una possibile attività inibitoria a carico delle Ciclossigenasi COX-1 e COX-2. In questo caso, però, si assiste ad una mancata azione inibente a carico degli enzimi, confermando una selettività d'azione.



**Figura 4.5** *Inibizione dell'attività di isolate di COX-1 e COX-2 ad opera dei composti 15 e 16. I valori sono espressi come medie  $\pm$ S.E.M., n=3. L'inibitore di riferimento per le COX-1 è l'Indometacina, 10 $\mu$ M responsabile di ridurre l'attività dell'enzima al 6 $\pm$ 2%, mentre per le COX-2 è il Celecoxib, che somministrato alla concentrazione di 5  $\mu$ M porta ad un'attività residua del 22 $\pm$  8 %*

Per quanto concerne la serie di derivati presentanti il gruppo carbossilico in posizione 3 (Composti 11A, 15A, 16A) attualmente non è possibile fornire informazioni significative, in quanto i test sono ancora in corso. Dati preliminari, però, testimonierebbero una riduzione dell'attività inibitoria a carico della 5-Lipossigenasi.

#### 4.1.4 PARTE SPERIMENTALE

##### Sezione Chimica

##### *Materiali e metodi*

Tutti i reagenti sono di grado analitico e acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano-Italia). La purificazione mediante flash cromatografia è stata effettuata utilizzando gel di silice Carlo Erba 60 (230 ÷ 400 mesh; Carlo Erba, Milano, Italia). La TLC è stata effettuata utilizzando piastre rivestite con gel di silice 60F 254 nm acquistate dalla Merck (Darmstadt, Germania). Gli spettri  $^1\text{H}$  e quelli  $^{13}\text{C}$  sono stati effettuati su un AC Bruker 300. I *Chemical shifts* sono riportati in ppm. Le abbreviazioni usate sono le seguenti: **s**, singoletto; **d**, doppietto; **dd** doppio doppietto; **m** multipletto, **t** tripletto, **q** quadrupletto **bs**, segnale ampio. Gli spettri di massa sono stati effettuati con uno strumento Finnigan a trappola ionica LCQ Deca. I punti di fusione sono stati eseguiti da uno strumento Stuart SMP30.

##### *Etil 5-acetossi-2-metil-1H-indol-3-carbossilato (2)*

Una soluzione di etil 5-idrossi-2-metil-1H-indol-3-carbossilato (**1**) (3 g, 13.55 mmol), anidride acetica (26 mL, 270 mmol) e piridina (3.32 mL, 40.65 mmol) è stata posta sotto agitazione e a riflusso per 1 h. L'intera miscela di reazione è stata, poi, raffreddata, addizionata di una soluzione satura di bicarbonato di sodio ed estratta 3 volte con acetato di etile. Le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua, anidrificate con sodio solfato anidro e concentrate. Il residuo è stato purificato mediante flash cromatografia su gel di silice, utilizzando come miscela eluente Esano: Acetato di etile 7:3, per ottenere il composto finale con una resa del 74%;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.43 (s, 3 H, J = 7.1 Hz), 2.34 (s, 3 H); 2.73 (s, 3 H); 4.38 (q, 2 H, J = 7.1 Hz); 6.90 (dd, 1 H, J=8.79, 1.76 Hz); 7.24 (d, 1 H, J=8.79 Hz); 7.75 (d, 1 H, J=1.76 Hz); 8.32 (NH).

##### *Etil 5-acetossi-1,2-dimetil-1H-indol-3-carbossilato (3)*

Una miscela di etil 5-acetossi-2-metil-1H-indol-3-carbossilato (**2**) (1.86 g, 6.96 mmol) in DMF anidro (30 mL) è stata trattata con NaH al 60% (0.255 g, 10.44 mmol) iodometano (1.31 mL, 20.37 mmol). La miscela è stata mantenuta a temperatura ambiente per 1 ora. Successivamente è stata diluita con acqua ed estratta con acetato di etile. La fase organica è stata lavata più volte con acqua e *brine*, anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e concentrata. Il residuo ottenuto è stato, poi, purificato mediante cromatografia su colonna di silice utilizzando come miscela eluente Esano:

acetato di etile 8:2 per fornire il composto desiderato con una resa del: 70%;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.42 (s, 3 H, J = 7.1 Hz), 2.32 (s, 3 H); 2.75 (s, 3 H); 3.67 (s, 3 H); 4.37 (q, 2 H, J = 7.1 Hz); 6.93 (dd, 1 H, J=8.79, 1.76 Hz); 7.25 (d, 1 H, J=8.79 Hz); 7.77 (d, 1 H, J=1.76 Hz).

#### ***Etil 5-acetossi-2-(bromometil)-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (4)***

L'Etil 5-acetossi-1,2-dimetil-1H-indol-3-carbossilato (**3**) (0.814 g, 2.89 mmol) e la N-bromosuccinimide (0.521 g, 2.89 mmol) sono stati sciolti in  $\text{CCl}_4$  (100 ml). Alla miscela è stato, poi, aggiunto il perossido di benzoile (50 mg, 0.20 mmol) e la reazione è stata condotta a refluxo per tutta la notte. La soluzione risultante è stata raffreddata a temperatura ambiente e diluita con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase organica è stata lavata con acqua, *brine* ed anidrificata mediante l'ausilio di  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Il prodotto è stato purificato tramite *flash* cromatografia utilizzando toluene/EtOAc 95:5 come eluente. La resa è stata del 46%;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.46 (s, 3 H, J = 7.1 Hz), 2.34 (s, 3 H); 3.82 (s, 3 H); 4.44 (q, 2 H, J = 7.1 Hz); 5.16 (s, 2 H); 7.04 (dd, 1 H, J=8.79, 1.76 Hz); 7.34 (d, 1 H, J=8.79 Hz); 7.84 (d, 1 H, J=1.76 Hz). Da questa purificazione abbiamo recuperato anche l'etili-5-acetossi-6-bromo-2-(bromometil)-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (**4a**) con una resa del 6%.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.43 (s, 3 H, J = 7.1 Hz), 2.39 (s, 3 H); 3.74 (s, 3 H); 4.42 (q, 2 H, J = 7.1 Hz); 5.08 (s, 2 H); 7.55 (s, 1 H); 7.87 (s, 1 H).

#### **Procedura generale per la sintesi dei prodotti 5-16**

Ad una soluzione metanolica di tiofenoli differentemente sostituiti (1 eq) è stata aggiunta una soluzione di KOH in metanolo (3.0 eq., 1 mL). Dopo 15 minuti, è stato aggiunto l'intermedio **4** o **4a** (30 mg, 0.083 mmol) e la miscela è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 3 h. Successivamente è stata neutralizzata con una soluzione di acido acetico 1 M ed evaporata. Il grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash.

#### ***Etil 5-idrossi-1-metil-2-(feniltiometil)-1H-indol-3-carbossilato (5)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (7.5:2.5). Resa: 93 %. M.p. 168-172 °C.  $^1\text{H}$  NMR ( $d_6$ -DMSO): 1.28 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.67 (s, 3 H); 4.20 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.82 (s, 2H); 6.73 (dd, 1H, J = 8.79, 1.76 Hz), 7.19-7.39 (m, 7 H); 9.02 (s, OH).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $d_6$ -DMSO): 14.0, 22.4, 35.2, 61.0, 103.0, 111.5, 112.8, 125.6, 126.8, 126.8, 127.7, 128.9, 130.0, 130.0, 136.4, 140.5, 152.9, 166.0. ESI-MS (m/z) : 364.42.  $[\text{M} + \text{Na}^+]$

#### ***Etil 5-idrossi-2-((2-metossifeniltio)metil)-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (6)***

Miscela eluente: Toluene/EtOAc (9:1). Resa: 84 %. M.p. 169-173 °C. <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.29 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.69 (s, 3 H); 3.73 (s, 3 H); 4.19 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.71 (s, 2H); 6.73 (dd, 1H, J = 8.5, 2.1 Hz), 6.89 (t, 1 H, J = 7.5 Hz); 6.98 (d, 1 H, J=8.5 Hz); 7.22-7.35 (m, 4 H); 9.02 (s, OH). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 14.5, 22.9, 35.8, 55.5, 60.8, 103.5, 103.7, 111.2, 112.5, 114.5, 119.2, 121.5, 126.5, 127.8, 129.0, 141.0, 152.4, 155.9, 166.7 ESI-MS (m/z) : 394.45 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 2-((4-clorofeniltio)metil)-5-idrossi-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (7)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (8:2). Resa: 90 %. M.p. 193-197°C. <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.28 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.67 (s, 3 H); 4.16 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.76 (s, 2H); 6.73 (dd, 1H, J = 8.5, 2.1 Hz), 7.30-7.36 (m, 6 H); 9.04 (s, OH). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO):15.0, 22.9, 36.0, 61.3, 105, 105.7, 113.2, 115.2, 130.2, 131.2, 131.2, 131.9, 132.1, 132.1, 133.7, 135.0, 141.0, 152.4, 167.2.. ESI-MS (m/z) : 398.87 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 2-((4-fluorofeniltio)metil)-5-idrossi-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (8)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (8:2). Resa: 83 %. M.p. 192-196°C. <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.28 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.70 (s, 3 H); 4.20 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.83 (s, 2H); 6.73 (dd, 1H, J = 8.5, 2.1 Hz), 7.10-7.16 (m, 2 H); 7.31-7.39 (m, 4 H); 9.03 (s, OH). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 14.5, 24.1, 36.0, 60.9, 103.0, 104.5, 111.6, 112.9, 117, 128.0, 129.3, 129.3, 129.9, 133.5, 140.5, 152.4, 159.3, 166.0.. ESI-MS (m/z) : 384.21 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 5-idrossi-2-((4-metossifeniltio)metil)-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (9)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (75:25). Resa:99 %. M.p. 170-174°C. <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.28 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.61 (s, 3 H); 3.72 (s, 3 H); 4.16 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.65 (s, 2H); 6.71 (dd, 1H, J = 8.5, 2.1 Hz), 6.83 (d, 2 H, J = 8.4 Hz); 7.24 (d, 2 H, J = 8.4 Hz); 7.29, (d, 1 H, J = 8.5 Hz); 7.33 (d, J = 2.1 Hz); 9.03 (s, OH). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 15.2, 23.5, 35.2, 55.9, 62.1, 103.5, 104.5, 111.6, 113.5, 116.1, 116.2, 127.8, 127.8, 128.0, 128.1, 128.9, 145.2, 153.9, 157.6, 167.2 ESI-MS (m/z) : 394.45 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 2-((3,5-dimetilfeniltio)metil)-5-idrossi-1-metil-1H-indoli-3-carbossilato (10)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (8:2). Resa: 99 %. M.p. 169-173°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.40 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 2.23 (s, 6 H); 3.66 (s, 3 H); 4.31 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.70 (s, 2H); 6.86-6.90 (m, 2 H), 6.98 (s, 2 H); 7.18 (d, 1 H, J = 9 Hz); 7.66, (d, 1 H, J = 2.1 Hz). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 15.9, 22.3, 29.6, 31.1, 60.3, 104.8, 107.1, 112.4, 114.2, 128.3, 129.5, 130.9, 132.6, 135.8, 144.2, 154.6, 166.8. ESI-MS (m/z) : 392.48 [M + Na<sup>+</sup>]



***Etil 5-idrossi-1-metil-2-((2-(trifluorometil)feniltio)metil)-1H-indol-3-carbossilato (11)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (8:2). Resa: 91 %. M.p. 171-175°C. <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 1.24 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.72 (s, 3 H); 4.14 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.90 (s, 2H); 6.72(dd, 1H, J = 8.5, 2.1 Hz), 7.33-7.37 (m, 3 H); 7.58 (d, 2 H, J = 3.6 Hz); 7.73, (d, 1 H, J = 8.5 Hz); 9.05 (s, OH). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 15.2, 23.5, 36.8, 61.4, 104, 104.7, 112.1, 112.4, 117.2, 125.5, 125.8, 126.9, 127.7, 129.4, 129.3, 130.2, 134.5, 144, 153.0, 166.7 ESI-MS (m/z) : 432.42 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 5-idrossi-1-metil-2-((4-(trifluorometil)feniltio)metil)-1H-indol-3-carbossilato (12)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (8:2). Resa: 94 %. M.p. 172-176°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.40 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.77 (s, 3 H); 4.31 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.85 (s, 2H); 6.89 (dd, 1H, J = 8.7, 2.4 Hz), 7.22 (d, 1 H, J = 8.7 Hz); 7.49 (dd, 4 H, J = 8.7, 14.5 Hz); 7.55, (d, 1 H, J = 2.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO):14.3, 24.3, 35.9, 62.5, 103.2, 104.1, 115.3, 116.4, 124.2, 126.3, 126.5, 127.8, 128.1, 129.3, 129.5, 129.8, 139.5, 141.2, 153.0, 166.8. ESI-MS (m/z): 432.33 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 5-idrossi-1-metil-2-((4-(trifluorometossi)feniltio)metil)-1H-indol-3-carbossilato (13)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (8:2). Resa: 86 %. M.p.170-174°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.38 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.71 (s, 3 H); 4.27 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.74 (s, 2H); 6.88 (dd, 1H, J = 8.7, 2.4 Hz), 7.09 (d, 2 H, J = 8.1 Hz); 7.18 (d, 1 H, J = 8.7 Hz); 7.37, (d, 2 H, J = 8.1 Hz), 7.54 (d, 1 H, J = 2.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO):13.5, 23.5, 36.4, 63.5, 105.7, 106.8, 114.6, 115.9, 116.8, 117.4, 122.0, 128.4, 128.9, 129.1, 130.5, 130.9, 145.9, 157.6, 158.4, 170.1.. ESI-MS (m/z) : 448.42 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 2-((2,4-difluorofeniltio)metil)-5-idrossi-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (14)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (8:2). Resa: 87 %. M.p. 172-176°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.38 (t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.71 (s, 3 H); 4.27 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.74 (s, 2H); 6.72-6.88 (m, 4H), 7.24 (d, 2 H, J = 8.1 Hz); 7.54 (d, 1 H, J = 2.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 12.8, 27.0, 28.4, 57.3, 102.9, 104.1, 109.3, 111.1, 112.6, 129.0, 130.0, 130.6, 132.5, 133.7, 144.5, 154.6, 157.5, 162.7, 166.2.. ESI-MS (m/z) : 400.40 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 2-((2,6-diclorofeniltio)metil)-5-idrossi-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (15)***

Miscela eluente: Esano/EtOAc (8:2). Resa:74 %. M.p. 196-200°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.39(t, 3 H, J = 7.1 Hz); 3.81 (s, 3 H); 4.22 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.72 (s, 2H); 6.88 (dd, 1H, J = 8.7, 2.4 Hz), 7.20-7.38 (m, 4 H); 7.57 (d, 1 H, J = 2.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 14.1, 22.4, 35.2, 62.1, 102.9, 104.6, 113.5,

115.9, 127.5, 127.9, 128.0, 128.6, 129.2, 131.4, 136.1, 140.6, 153.2, 165.9.. ESI-MS (m/z) : 410.32 [M + Na<sup>+</sup>]

***Etil 5-idrossi-2-(mesitiltiometil)-1-metil-1H-indol-3-carbossilato (16)***

Miscela eluente: Esano /EtOAc (8:2). Resa:91 %. M.p. 168-172°C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 1.39(t, 3 H, J = 7.1 Hz); 2.22 (s, 3H); 2.26 (s, 6H); 3.58 (s, 3 H); 4.22 (q, 2H, J = 7.1 Hz); 4.42 (s, 2H); 6.82-6.88 (m, 2H), 7.20-7.38 (m, 4 H, J = 0.9, 8.7 Hz); 7.53 (d, 1 H, J = 0.9 Hz). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 13.7, 20.7, 36.8, 60.9, 102.7, 103.5, 111.3, 112.4, 126.8, 127.1, 127.7, 128.0, 128.9, 130.1, 130.5, 134.9, 142.1, 152.7, 166.2. ESI-MS (m/z): 406.50 [M + Na<sup>+</sup>]

**Procedura generale per la sintesi dei prodotti 11A,15A e 16A**

In una miscela di H<sub>2</sub>O/EtOH 7:3 vengono sciolti i corrispettivi derivati 11,15, 16. La miscela disomogenea ottenuta viene addizionata di una soluzione acquosa di NaOH 8M e il tutto lasciato sotto agitazione magnetica per 16h in condizioni di riflusso ad una temperatura di 90°C. . Successivamente la soluzione risultante, è stata neutralizzata con una soluzione di acido cloridrico 3M, anidrificata e concentrata. Il grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash.

***Acido 2-((2-(trifluorometil)feniltio)metil)-5-idrossi-1-metil-1H-indol-3-carbossilico (11A)***

Miscela eluente: Esano /EtOAc (6:4). Resa:20 %. M.p. 164-169°C. <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 3.60 (s, 3 H); 4.90 (s, 2H); 6.20(s, 1H), 7.33-7.37 (m, 3 H); 7.58 (d, 2 H, J = 3.6 Hz); 7.73, (d, 1 H, J = 8.5 Hz); 9.05 (s, OH). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 23.5, 36.8, 104, 104.7, 112.1, 112.4, 117.2, 125.5, 125.8, 126.9, 127.7, 129.4, 129.3, 130.2, 134.5, 144, 153.0, 166.7 ESI-MS (m/z) : 381.37 [M + Na<sup>+</sup>]

***Acido 2-((2,6-diclorofeniltio)metil)-5-idrossi-1-metil-1H-indol-3-carbossilico (15A)***

Miscela eluente: Esano /EtOAc (6:4). Resa:18 %. M.p. 160-164°C <sup>1</sup>H NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 3.81 (s, 3 H); 4.60 (s, 2H); 6.88 (dd, 1H, J = 8.7, 2.4 Hz), 7.20-7.38 (m, 4 H); 7.57 (d, 1 H, J = 2.4 Hz). <sup>13</sup>C NMR (d<sub>6</sub>-DMSO): 22.4, 35.2, 102.9, 104.6, 113.5, 115.9, 127.5, 127.9, 128.0, 128.6, 129.2, 131.4, 136.1, 140.6, 153.2, 165.9.. ESI-MS (m/z) : 382.26 [M + Na<sup>+</sup>]

***Acido 5-idrossi-2-(mesitiltio)metil)-1-metil-1H-indol-3-carbossilico (16A)***

Miscela eluente: Esano /EtOAc (6:4). Resa:18 %. M.p. 161-163°C  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 2.22 (s, 3H); 2.26 (s, 6H); 3.58 (s, 3 H); 4.42 (s, 2H); 6.82-6.88 (m, 2H), 7.20-7.38 (m, 4 H, J = 0.9, 8.7 Hz); 7.53 (d, 1 H, J = 0.9 Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{d}_6$ -DMSO): 20.7, 36.8, 102.7, 103.5, 111.3, 112.4, 126.8, 127.1, 127.7, 128.0, 128.9, 130.1, 130.5, 134.9, 142.1, 152.7, 166.2. ESI-MS (m/z): 355.54 [M + Na<sup>+</sup>]

## **Sezione biologica**

### ***Culture cellulari***

I PMNL umani sono stati isolati da concentrati di leucociti ottenuti al St. Markus Hospital (Francoforte, Germania). In breve, un'aliquota di sangue venoso (prelevata da donatori adulti sani) è stata sottoposta a centrifugazione a 4000g per 20 minuti ad una temperatura di 20 °C per recuperare i leucociti concentrati. I PMNL sono stati, poi, prontamente isolati per sedimentazione con destrano, centrifugazione (Laboratori PAA, Linz, Austria), e lisi ipotonica degli eritrociti. I PMNL ( $7.5 \cdot 10^6$  cellule/mL; purezza > 96-97%) sono stati infine risospesi in un "buffer" salino contenente fosfato con un pH 7,4 (PBS) seguiti dall'aggiunta 1 mg/ml di glucosio.

### ***Determinazione della formazione dei prodotti della 5-,12- e 15-Lipossigenasi in cellule intatte***

Per le analisi in cellule intatte, un quantitativo di  $10^7$  PMNL è stato risospeso in 1 mL di PBS addizionato con 1 mg/mL di glucosio e 1 mM di  $\text{CaCl}_2$ . Dopo la preincubazione con i composti indicati (a 37 °C), la formazione dei prodotti della 5-LOX è stata avviata dall'aggiunta di 2,5  $\mu\text{M}$  dello ionoforo A23187 con o senza AA 20  $\mu\text{M}$ , come indicato. Dopo 10 min a 37 °C, la reazione è stata bloccata con 1 mL di metanolo, e 30  $\mu\text{L}$  1 N HCl, 200 ng di prostaglandina B1 e 500  $\mu\text{L}$  di PBS sono stati ulteriormente addizionati. I metaboliti della 5-LOX formati sono stati estratti e analizzati mediante HPLC e la loro quantità è espressa in ng di prodotto per  $10^6$  cellule. Tra quelli identificati ricordiamo LTB4 e i suoi *all-trans* isomeri: l'acido 5(S),12(S)-diidrossi-6-10-*trans*-8,14-*cis*-eicosatetraenoico (**5(S),12(S)-DIHETE**), e l'acido 5(S)-idro(pero)ssi-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraenoico (**5-H(p)ETE**). I Cisteinil-LT (LTC4, D4 e E4) non sono stati rilevati e prodotti di ossidazione di LTB4 non sono stati determinati. La biosintesi del prodotto della 12-LO, l'acido 12(S)-idro(-per)ssi-5,8-*cis*-10-*trans*-14-*cis*-eicosatetraenoico (**12H(P)ETE**) e della 15-LO, l'acido 15(S)-idro(per)ssi-5,8,11-*cis*-13-*trans*-eicosatetraenoico (**15-H(P)ETE**) è espressa per ng per  $10^6$  cellule.

### ***Espressione, purificazione della 5-LOX ricombinante umana proveniente da E. coli, e determinazione dell'attività residua della LOX in test cell-free***

La Trasformazione di E. coli BL21 con il plasmide pT3-5LO così come l'espressione e la purificazione della 5-LOX ricombinante sono stati condotti secondo modelli riportati in letteratura (Fisher *et al.*, 2003). La 5-LOX purificata è stata immediatamente impiegata per il saggio di attività inibitoria. Pertanto, 0,5  $\mu\text{g}$  di enzima purificato sono stati diluiti mediante PBS/EDTA (volume finale

di 1 ml) e pre-incubati con i derivati di interesse. Dopo 5-10 min a 4°C i campioni sono stati preriscaldati per 30s a 37°C. Fatto ciò, 2mM di CaCl<sub>2</sub> ed l'adeguato apporto di AA vengono addizionati ai campioni per permettere la formazione dei prodotti della 5-LOX. Dopo il tempo di 10min a 37°C la reazione è stoppata ed addizionata di 1ml di metanolo raffreddato in ghiaccio, permettendo l'analisi dei metaboliti mediante HPLC.

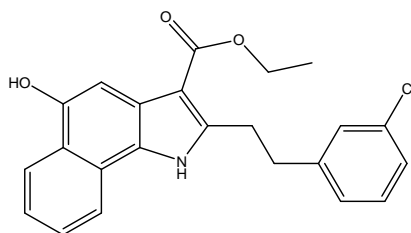
***Determinazione dell'attività residua delle COX-1 e COX-2 isolate***

L'inibizione dell'attività di forme isolate di COX-1 ovine e di COX-2 umane è stata condotta secondo la procedura riportata in letteratura (*Koeberle et al., 2008*)

#### 4.2 SINTESI e VALUTAZIONE BIOLOGICA DI COMPOSTI A NUCLEO *Etil 5-Idrossi benzo[g]indol-3-Carbossilato*

##### 4.2.1. PRESUPPOSTI SCIENTIFICI E SCOPO DELLO STUDIO

Una delle strategie farmacologiche più considerate negli ultimi tempi è rappresentata dall'inibizione della 5-LOX e del *pathway* delle COXs, mirata a sviluppare una terapia antinfiammatoria più efficace, riducendo l'incidenza e la gravità degli effetti collaterali derivanti dai precedenti approcci terapeutici (Doiron *et al.*, 2009). Tale inibizione può essere ottenuta sia sfruttando un singolo composto con una doppia azione sia combinando un inibitore della 5-LOX, con un inibitore delle COXs. È stata recentemente affermata l'applicazione combinata dell'inibitore COXs *Naprossene 2-Metansulfonil-etil estere* e l'inibitore 5-LOX *Zileuton*. Tuttavia, la possibilità di ottenere un unico prodotto con una duplice azione si è dimostrata più interessante. Sulla scia di queste allettanti intenzioni, Lo stesso gruppo di ricerca che aveva sintetizzato e dimostrato l'attività inibitoria nei confronti della 5-LOX di derivati a nucleo indolico, ha pubblicato, nel 2009, un lavoro che riporta la sintesi e la valutazione biologica di derivati benzoindolici strutturalmente correlati ai precedenti indoli. Tale studio ha mostrato che l'estensione della porzione aromatica dell'indolo, mediante l'introduzione di un nucleo fenilico in posizione 6,7, risultava essere estremamente vantaggiosa in termini di attività inibitoria, nell'ordine del nanomolare. Nello specifico il derivato *etil-5-idrossibenzo[g]indol-2-(3-clorofenilettil)-3-carbossilato (11m)* possedeva una  $IC_{50}$  in test cellulare (condotti su PMNL) e in sistema *cell-free* rispettivamente dell'ordine di  $0.49 \mu M$  e  $0.031 \mu M$ .



$IC_{50}$  (pure LOX) =  $0.031 \pm 0.01$   
 $IC_{50}$  (PMNL) =  $0.49 \pm 0.15$

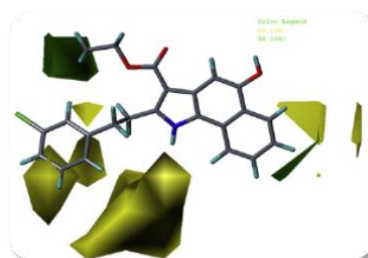
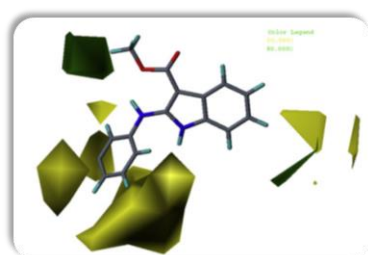
Figura 4.5 Composto 11m

Questa importante osservazione è stata confermata e giustificata mediante studi computazionali 3D-QSAR CoMFA e CoMSIA condotti sia su derivati a nucleo etil-5-idrossindol-3-carbossilato che su

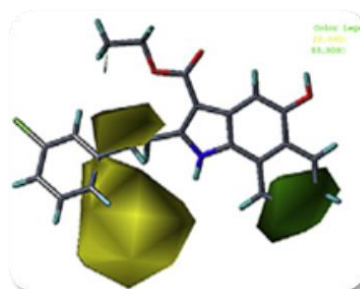
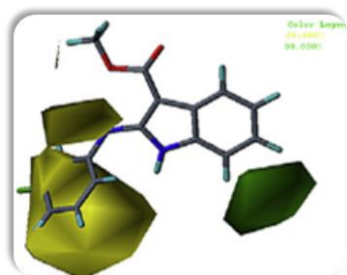
derivati a nucleo etil-5-idrossibenzo[g]Indol-3-carbossilato. Un sunto di tali studi è qui di seguito riportato:

in termini di *Steric Counter Map* entrambi i modelli CoMFA e CoMSIA suggeriscono che in prossimità delle regioni colorate di verde (posizioni 6-7 dell'anello indolico e posizione 3) la presenza di gruppi ingombrati stericamente aumenterebbe l'attività inibitoria grazie ad un maggiore *fitting* molecola-enzima. Quanto predetto è stato poi validato da studi di Docking data la corrispondenza di tali regioni con amminoacidi quali Leu<sup>420</sup>, Phe<sup>459</sup>, Leu<sup>368</sup> ed Ile<sup>415</sup>. Diversamente, per le regioni colorate di giallo si afferma esattamente il contrario (come si evidenzia dalle figure la presenza di un gruppo anilico o benzilico legato alla posizione 2 dell'anello indolico porterebbe ad un'interazione con la regione colorata di giallo presente a tal livello. Secondo tale studio, questo problema verrebbe bypassato mediante l'introduzione in 2 di alcuni gruppi quali una porzione fenil-etilica).

#### Modelli CoMFA

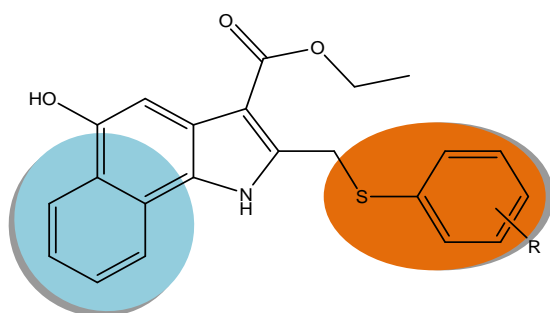


#### Modelli CoMSIA



Studi successivi hanno messo in evidenza che il composto **11m** è in grado di bloccare la formazione dei leucotrieni anche nel sangue umano con una  $IC_{50}$  di  $0.83 \mu M$ . Studi in vivo hanno, inoltre, confermato la sua reale attività inibitoria in quanto è stata osservata una riduzione della sintesi di  $LTB_4$  negli essudati pleurici murini indotti da carragenina (Karg *et al.*, 2009) Il composto 11m e i suoi derivati hanno anche mostrato attività inibitoria a carico della **mPGES-1umana** con una  $IC_{50}$  di  $0.6 \mu M$  sull'enzima tal quale e  $2 \mu M$  su cellule A549, risultando scarsamente attivi nei confronti delle COX-1/2. (Koeberle *et al.*, 2009)

Partendo da tali presupposti, il mio lavoro è stato indirizzato all'ottimizzazione delle caratteristiche strutturali dei composti indolici della prima serie al fine di ottenere derivati più potenti. L'estensione della porzione aromatica ha portato allo sviluppo di una nuova libreria di composti a nucleo **etil benzo[g]indol-3-carbossilato** in cui sono stati inseriti in posizione 2 dei gruppi feniltimetilici variamente sostituiti. La scelta dei sostituenti (-Cl, -CH<sub>3</sub> e -CF<sub>3</sub>) si è basata sui risultati ottenuti precedentemente per i composti indolici.



**R=**

**IVa** 2,3,6 -CH<sub>3</sub>

**IVb** 2-CF<sub>3</sub>

**IVc** 2,6-Cl

**IVd** 2-CH<sub>3</sub>

**IVe** 3,5-Cl

**IVf** 3,5-CH<sub>3</sub>

**IVg** 2,3-Cl

**IVh** 2-Cl

**IVi** 3,4-Cl

**IVl** 3-Cl

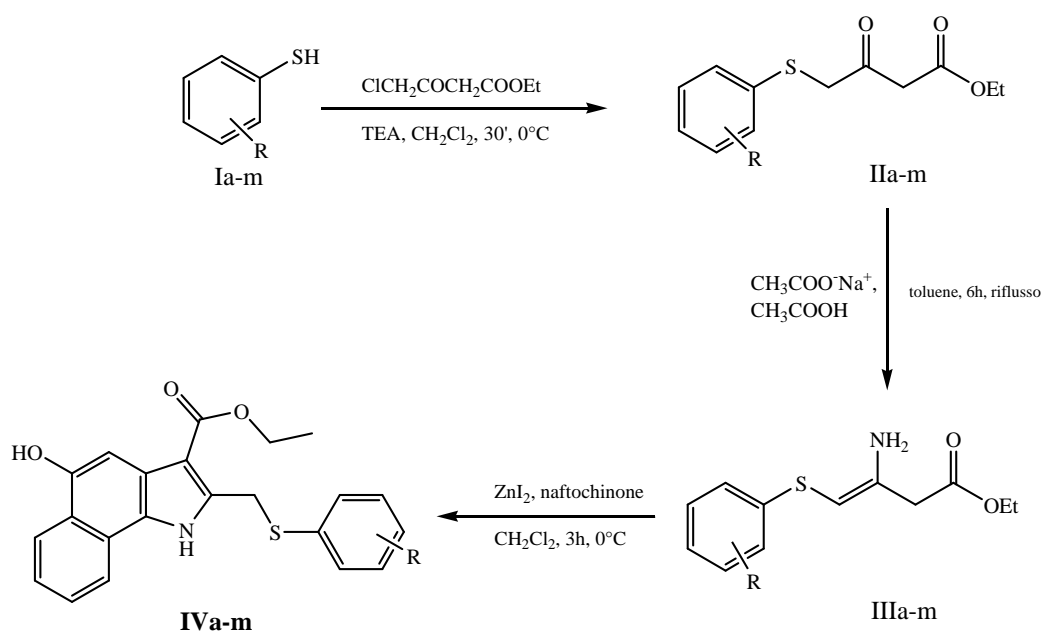
**IVm** 2,6-CH<sub>3</sub>



#### 4.2.2. PARTE CHIMICA

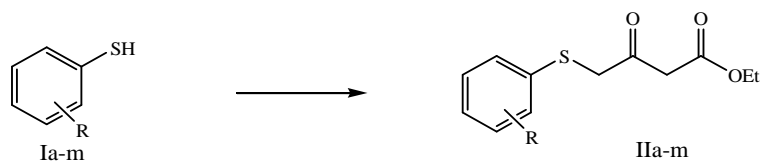
I composti desiderati **IVa-m** sono stati ottenuti seguendo uno schema di sintesi costituito da tre passaggi chiave. Ciascuno è stato ottimizzato allo scopo di migliorare le rese complessive e rendere più agevoli i processi di purificazione. (Schema 4.4)

Schema 4.4



##### Step 1: Sintesi dei $\beta$ -chetoesteri

Il primo *step* riguarda la formazione dei  $\beta$ -chetoesteri **IIa-m**. Tale reazione consiste nell'attacco nucleofilo dell'atomo di zolfo del tiofenolo al carbonio legante l'alogeno dell'etil 4-cloroacetoacetato. La scelta delle condizioni sperimentali è scaturita dall'applicazione di differenti protocolli sintetici allo scopo di migliorare le rese. La reazione è stata messa a punto utilizzando il 2,4,6-trimetiltiofenolo (**Ia**) come prodotto di partenza. Le condizioni sperimentali, con le rispettive rese, sono riportate nella seguente tabella.



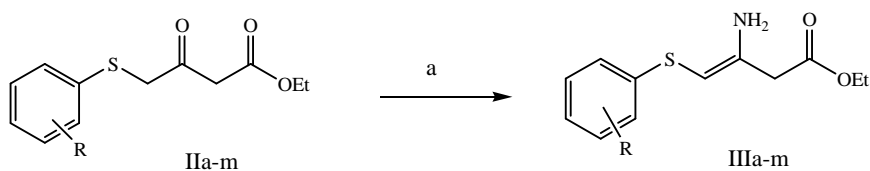
| Protocollo Sperimentale | Etil 4-cloroacetoacetato (n. eq.) | 2,4,6-trimetiltiofenolo (Ia) (n. eq) | Base          | Condizioni                                 | Resa <sup>a</sup> |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------------|-------------------|
| 1                       | 1.0                               | 1.1                                  | KOH (1.2 eq.) | MeOH, 6h, t.a.                             | 60%               |
| 2                       | 1.0                               | 1.1                                  | TEA (1.5 eq.) | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 45', 0°C | 25%               |
| 3                       | 1.0                               | 1.03                                 | TEA (1.05eq.) | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 30', 0°C | 86%               |

<sup>a</sup> Calcolate dopo purificazione mediante flash cromatografia

Come si può osservare, le condizioni di reazione del metodo 3 permettono di ottenere il composto desiderato con una resa molto elevata. Probabilmente ciò è legato all'utilizzo della trietilammina (TEA) che, diversamente dall'idrossido di potassio (KOH), risulta essere solubile nel solvente di reazione e alla riduzione degli equivalenti di tiofenolo che rendono più agevole la purificazione su colonna.

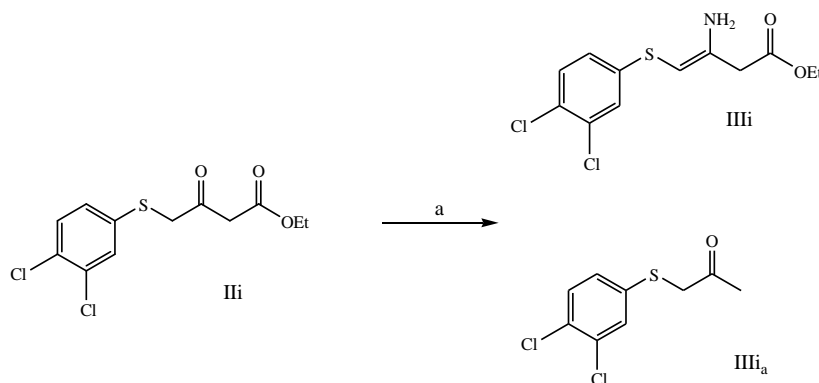
### Step 2: Sintesi dei $\beta$ -enammino esteri

La conversione dei  $\beta$ -chetoesteri nei corrispettivi  $\beta$ -enammino esteri viene favorita dall'ambiente acido dell'acido acetico. Esso protona l'ossigeno del carbonile rendendo quest'ultimo più sensibile all'attacco nucleofilo dell'azoto. L'utilizzo di condizioni azeotropiche per l'allontanare l'acqua, che si forma durante il decorso della reazione, consente di ottenere l'enammina desiderata con buone rese.



**Reagenti e condizioni:** a)  $\text{CH}_3\text{COO}^-\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , toluene, 6h, riflusso

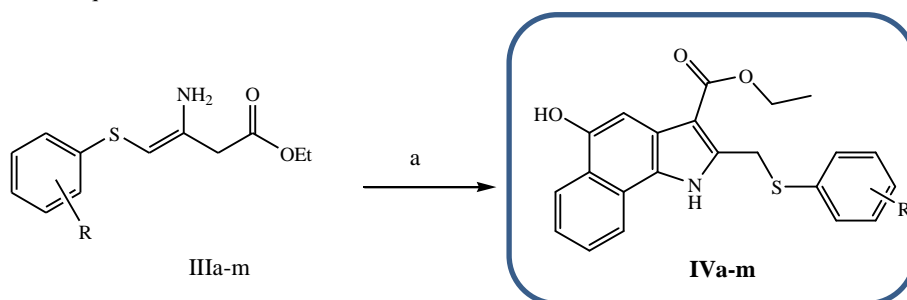
Allo scopo di ridurre i tempi di reazione si è pensato di applicare un procedura sintetica riportata in letteratura per un substrato analogo, che prevedeva l'utilizzo delle microonde. Tale metodica è stata utilizzata per la sintesi del (*Z*)-3-ammino-4-(3,4-diclorofeniltio)-but-2-enoato di etile (**IIIi**). La miscela ottenuta è risultata essere molto complessa in quanto presentava, su TLC, *spots* con *R<sub>f</sub>* molto simili. Dopo purificazione mediante *flash* cromatografia sono stati isolati tre composti che, in seguito a caratterizzazione mediante <sup>1</sup>H-NMR, risultavano essere il β-chetoestere di partenza (35%), il β-enammino estere desiderato (**IIIi**) (30%) e un prodotto di degradazione (**IIIi<sub>a</sub>**) (10%). Per tale motivo ho deciso di escludere questa procedura sperimentale e operare secondo riscaldamento convenzionale, in quanto, anche se i tempi risultavano essere più lunghi, la purificazione era più semplice e permetteva di ottenere i composti desiderati con rese più alte.



**Reagenti e condizioni:** a)  $\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+$ , EtOH, MW, 15', 160°C

**Step 3: Sintesi degli etil 5-idrossi-benzo[g]indoli-3-carbossilati**

I composti finali 5-idrossi-benzo[g]indoli sono stati sintetizzati mediante la reazione di Nenitzescu, in presenza di quantità catalitiche di  $\text{ZnI}_2$ .



**Reagenti e condizioni:** a)  $\text{ZnI}_2$ , 1,4-naftochinone,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 3h, 0°C

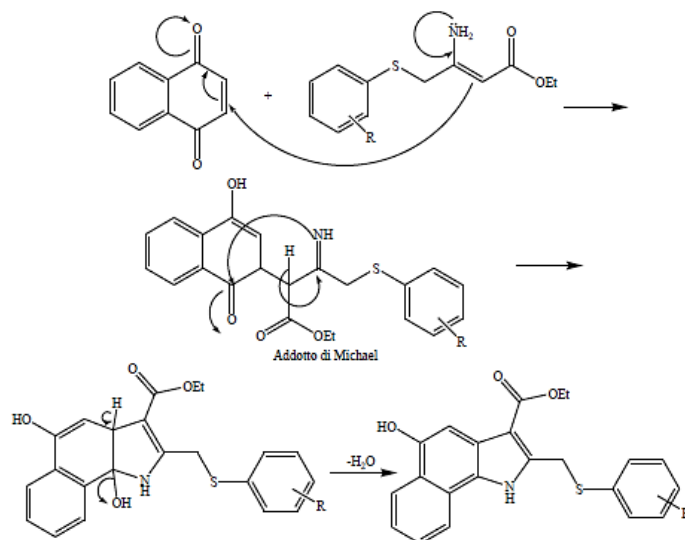
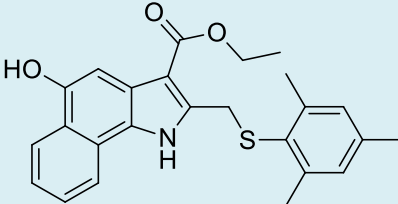
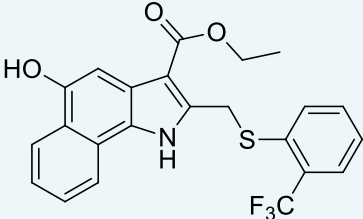
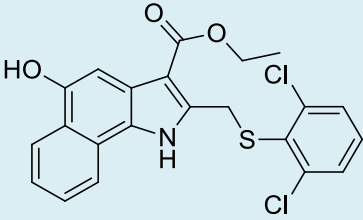
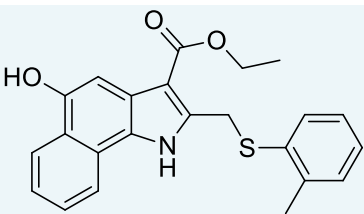
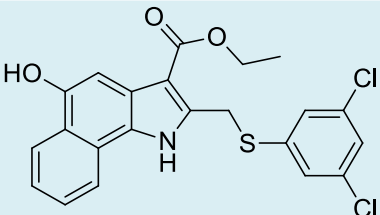
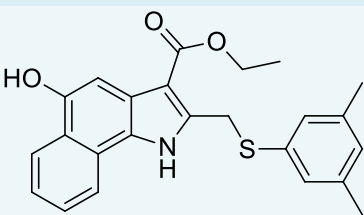
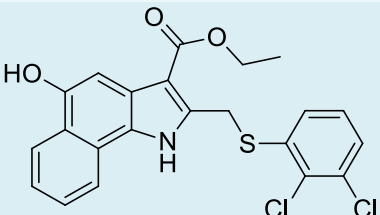



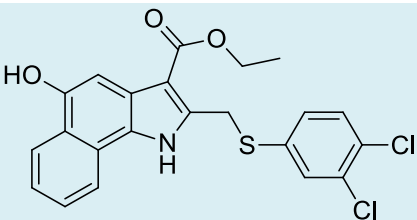
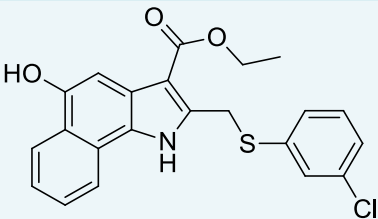
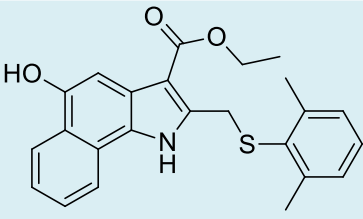
Figura 4.7 Meccanismo della reazione di Nenitzescu

#### 4.2.3 PARTE BIOLOGICA e CONCLUSIONI

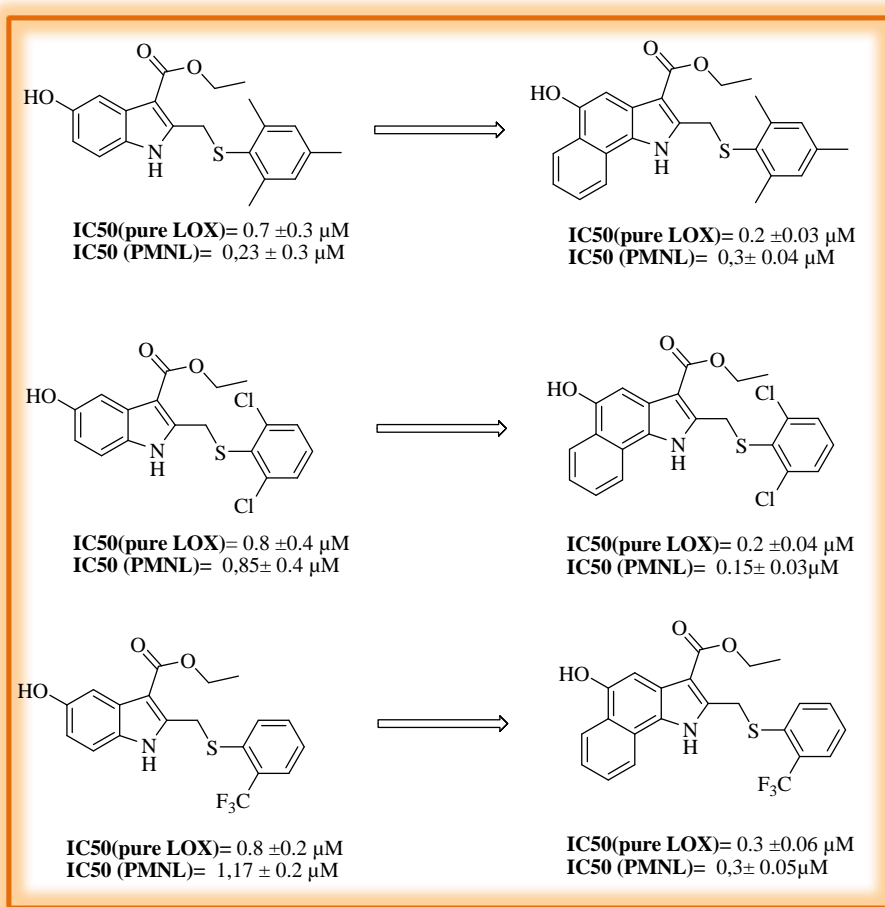
Ancora una volta, i *tests* biologici sono stati condotti presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli studi di Jena, Germania, sotto la supervisione del Prof. Oliver Werz. Nello specifico, i test hanno permesso di identificare la capacità inibitoria delle molecole saggiate in *maniera indiretta*, determinando la percentuale di formazione dei leucotrieni (LTB<sub>4</sub>, HPETE, ecc.) prodotti dall'enzima sia in test cellulari condotti su cellule di polimorfonucleati (PMNL) opportunamente stimolate, che in test *cell-free* su enzima purificato da lisati cellulari di *E.coli*, come descritto in precedenza.

| Nome | Struttura                                                                           | 5-LO<br>PMNL<br>IC <sub>50</sub> [μM] | 5-LO<br>purificata<br>IC <sub>50</sub> [μM] |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| VIa  |   | 0.3 ± 0.03                            | 0.2 ± 0.04                                  |
| IVb  |  | 0.3 ± 0.06                            | 0.3 ± 0.05                                  |
| IVc  |  | 0.2 ± 0.04                            | 0.15 ± 0.03                                 |

|            |                                                                                     |                |                |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| <b>IVd</b> |    | $0.3 \pm 0.05$ | $0.4 \pm 0.09$ |
| <b>IVe</b> |    | $0.2 \pm 0.08$ | $0.2 \pm 0.06$ |
| <b>IVf</b> |   | $0.3 \pm 0.1$  | >1             |
| <b>IVg</b> |  | $0.6 \pm 0.05$ | >1             |
| <b>IVh</b> |  | $0.2 \pm 0.1$  | $0.8 \pm 0.12$ |

|            |                                                                                    |                |                |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------|
| <b>IVi</b> |   | $0.3 \pm 0.15$ | $0.9 \pm 0.10$ |
| <b>IVl</b> |   | $0.3 \pm 0.05$ | >1             |
| <b>IVm</b> |  | $0.2 \pm 0.04$ | >1             |

I risultati delle indagini biologiche hanno permesso di confermare l'importanza dell'estensione della porzione aromatica, evidenziando come la sostituzione del nucleo indolico con quello benzo[g]indolico porti ad un significativo incremento dell'attività inibitoria soprattutto a carico dell'enzima tal quale.



Sono attualmente in corso i dati relativi all'attività inibitoria a carico della mPGES-1.



#### 4.2.4 PARTE SPERIMENTALE

##### Sezione Chimica

##### *Materiali e metodi*

Tutti i reagenti sono di grado analitico e acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano-Italia). La purificazione mediante flash cromatografia è stata effettuata utilizzando gel di silice Carlo Erba 60 (230 ÷ 400 mesh; Carlo Erba, Milano, Italia). La TLC è stata effettuata utilizzando piastre rivestite con gel di silice 60F 254 nm acquistate dalla Merck (Darmstadt, Germania). Gli spettri <sup>1</sup>H e quelli <sup>13</sup>C sono stati effettuati su un AC Bruker 300. I *Chemical shifts* sono riportati in ppm. Le abbreviazioni usate sono le seguenti: s, singoletto; d, doppietto; dd doppio doppietto; m multipletto, t tripletto, q quadrupletto, bs, segnale ampio. Gli spettri di massa sono stati effettuati con uno strumento Finnigan a trappola ionica LCQ Deca. I punti di fusione sono stati eseguiti da uno strumento Stuart SMP30.

##### **Procedura generale per la sintesi di 4-(tioarilossi)acetoacetato di etile IIa-m**

Una soluzione di 4-cloroacetoacetato (500 mg, 3.28 mmol, 1 eq.), Et<sub>3</sub>N (348 mg, 3.44 mmol, 1.05 eq.) ed il relativo tiofenolo **Ia-m** (1.03 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6.5 mL) viene agitata a 0°C per 30 min. La miscela di reazione viene diluita con EtOAc e lavata con una soluzione acquosa di NaOH (1 M), acido cloridrico (1 M) e brine. La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e concentrata. Il residuo ottenuto è stato, poi, purificato mediante cromatografia su colonna di silice utilizzando come miscela eluente Esano/Etil acetato 9:1 fornendo il composto desiderato.

##### **4-(mesiltio)-3-ossobutanoato di etile (II2a)**

Resa: 86%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.20 (s, 3H), 2.45 (s, 6H), 3.58 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 6.87 (s, 2H).

##### **4-(2-(trifluorometil)feniltio)-3-ossobutanoato di etile (IIb)**

Resa: 30%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.58 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.43 (t, 1H, *J* = 7.88 Hz), 7.52 (m, 2H), 7.77 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz).

##### **4-(2,6-diclorofeniltio)-3-ossobutanoato di etile (IIc)**

Resa: 88%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.42 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.80 (s, 2H), 3.85 (s, 2H), 4.27 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.34 (t, 1H, *J* = 7.88 Hz), 7.45 (d, 2H, *J* = 7.88 Hz).

**4-(*o*-toliltilio)-3-ossobutanoato di etile (II*d*)**

Resa: 79%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.42 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.47 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 4.12 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.08-7.21 (m 4H).

**4-(3,5-diclorofeniltio)-3-ossobutanoato di etile (II*e*)**

Resa: 62%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.30 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.64 (s, 2H), 3.90 (s, 2H), 4.22 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.25 (s 1H), 7.28 (s, 2H).

**4-(3,5-dimetilfeniltio)-3-ossobutanoato di etile (II*f*)**

Resa: 92%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.28 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.29 (s, 6H), 3.65 (s, 2H), 3.80 (s, 2H), 4.20 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 6.88 (s 1H), 6.98 (s, 2H).

**4-(2,3-diclorofeniltio)-3-ossobutanoato di etile (II*g*)**

Resa: 86%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.29 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.67 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 4.21 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.19 (m, 2H, ), 7.34 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz)

**4-(2-clorofeniltio)-3-ossobutanoato di etile (II*h*)**

Resa: 68%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.29 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.67 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 4.21 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.18-7.24 (m, 2H), 7.34 (dd, 1H, *J* = 8.99, 1.2 Hz), 7.40 (dd, 1H, *J* = 8.99, 1.2 Hz).

**4-(3,4-diclorofeniltio)-3-ossobutanoato di etile (II*i*)**

Resa: 96%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.35 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.61 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 4.22 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.19 (dd, 1H, *J* = 8.25, 2.4 Hz), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.25 Hz), 7.45 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz).

**4-(3-clorofeniltio)-3-ossobutanoato di etile (II*l*)**

Resa: 81%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.29 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.61 (s, 2H), 3.82 (s, 2H), 4.22 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.32 (br, 3H), 7.34 (s, 1H).

**4-(2,6-dimetilfeniltio)-3-ossobutanoato di etile (II*m*)**

Resa: 85%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.29 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.59 (s, 6H), 3.53 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 4.18 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 7.09-7.19 (m, 3H).

**Procedura generale per la sintesi di 4-(tioarilossi)enamminoestere di etile III a-m (Karg et al., 2009)**

3.0 mmol dello specifico β-chetoestere (IIa-m) vengono sciolte in 10 mL di toluene anidro. Alla soluzione vengono aggiunti acetato d'ammonio (1.16 g, 15.0 mmol) e poche gocce di acido acetico. La miscela di reazione viene mantenuta a reflusso per 6 h in condizioni azeotropiche. Dopo aver raffreddato a temperatura ambiente, la miscela viene lavata con una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub>. La risultante fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrata e concentrata fornendo un residuo purificato mediante *flash* cromatografia su gel di silice (Esano/ Etil acetato 9:1).

**(E<sub>Z</sub>) 3-ammino-4-(mesitilto)but-2-enoato di etile (IIIa)**

Resa: 58%. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 1.20 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.28 (s, 3H), 2.52 (s, 6H), 3.22 (s, 2H), 4.05 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.13 (s, 1H), 4.65 (br, NH<sub>2</sub>), 6.98 (s, 2H).

**(Z) 3-ammino-4-(2-(trifluorometil)feniltio)-but-2-enoato di etile (IIIb)**

Resa: 66%. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) = 1.30 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.67 (s, 2H), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.50 (s, 1H), 7.38 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.54 (t, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.62 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz), 7.69 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz).

**(Z)-3-ammino-4-(2,6-diclorofeniltio) -2-enoato di etile (IIIc)**

Resa: 73%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.22 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.63 (s, 2H), 4.08 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.50 (s, 1H), 7.37 (t, 1H, *J* = 7.88 Hz), 7.48 (d, 2H, *J* = 7.88 Hz).

**(Z)-3-ammino-4-(o-toliltio)-but-2-enoato di etile (III d)**

Resa: 87%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.23 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.38 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 4.12 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.67 (s, 1H), 7.08-7.22 (m, 4H).

**(Z)-3-ammino-4-(3,5-diclorofeniltio)- 2-enoato di etile (IIIe)**

Resa: 59%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.24 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.62 (s, 2H), 4.13 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.70 (s, 1H), 7.21 (d, 3H, *J* = 1.9 Hz).

**(Z)-3-ammino-4-(3,5-dimetilfeniltio)-but-2-enoato di etile (III f)**

Resa: 53%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.27 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.29 (s, 6H), 3.60 (s, 2H), 4.16 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.65 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.98 (s, 2H).

**(Z)-3-ammino-4-(2,3-diclorofeniltio)-but-2-enoato di etile (IIIg)**

Resa: 73%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.28 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.70 (s, 2H), 4.13 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.73 (s, 1H), 7.15-7.22 (m, 2H), 7.34 (dd, 1H, *J* = 2.4, 6.9 Hz).

**(Z)-3-ammino-4-(2-clorofeniltio)-but-2-enoato di etile (IIIh)**

Resa: 67%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.27 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.69 (s, 2H), 4.15 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.70 (s, 1H), 7.18 (td, 1H, *J* = 1.5, 7.2 Hz), 7.24 (td, 1H, *J* = 1.5, 7.2 Hz), 7.33 (dd, 1H, *J* = 1.5, 7.2 Hz), 7.40 (dd, 1H, *J* = 1.5, 7.2 Hz).

**(Z)-3-ammino-4-(3,4-diclorofeniltio)-but-2-enoato di etile (IIIi)**

Resa: 62%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.27 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.59 (s, 2H), 4.14 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.64 (s, 1H), 7.18 (dd, 1H, *J* = 2.1, 8.4 Hz), 7.38 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.45 (s, 1H).

**(Z)-3-ammino-4-(3-clorofeniltio)-but-2-enoato di etile (IIIj)**

Resa: 45%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.28 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 3.63 (s, 2H), 4.14 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.67 (s, 1H), 7.20-7.25 (m, 3H), 7.34 (s, 1H).

**(Z)-3-ammino-4-(2,6-dimetilfeniltio)-but-2-enoato di etile (IIIk)**

Resa: 68%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) = 1.28 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.55 (s, 6H), 3.28 (s, 2H), 4.14 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.43 (s, 1H), 7.09-7.19 (m, 3H).

**Procedura generale per la sintesi di 5-idrossi-1H-benzo[g]indol-3-carbossilati di etile IVa-m (Karg et al, 2009)**

Ad una soluzione di 1,4-naftochinone (1.0 mmol) in 3 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, viene aggiunto ZnI<sub>2</sub> (32.0 mg, 0.1 mmol) e la miscela risultante viene riscaldata a temperatura di ebollizione. Una soluzione di enamminoestere **IIIa-m**, (1.0 mmol), in 2 mL di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> viene aggiunta goccia a goccia in agitazione magnetica per 5-10 min. Dopo aver mantenuto la miscela a refluxo per 20 min, la soluzione risultante viene raffreddata a 0-5 °C per 2-3 h. Il precipitato cristallino viene filtrato e lavato con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ed esano.

**5-idrossi-2-((mesitiltio)metil)-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVa)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.28. Resa: 27%. P.f. 178.5°C dec. <sup>1</sup>H NMR (Aceton- *d*7) δ (ppm) = 1.32 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.20 (s, 3H), 2.25 (s, 6H), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.44 (s, 2H), 6.87 (s, 2H), 7.45 (t, 1H, *J* = 7.88 Hz), 7.53 (t, 1H, *J* = 7.88 Hz), 7.65 (s, 1H), 8.15 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 8.29 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 8.67 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*6) δ (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 19.2, (*o,m*-CH<sub>3</sub>), 24.9 (*p*-CH<sub>3</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), 131.5 (C-1'), 133.4 (C-5), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 418.09 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>3</sub>S C, 71.57; H, 6.01; N, 3.34; O, 11.44; S, 7.64 Trovato C, 70.59; H, 6.12; N, 3.25; O, 11.37; S, 7.56

**2-((2-(trifluorometil)feniltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVb)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.18. Resa: 28%. P.f. 197.0°C dec. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*6) δ (ppm) = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 4.30 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.82 (s, 2H), 7.43 (t, 1H, *J* = 7.88 Hz), 7.50 (s, 1H), 7.52-7.70 (m, 4H), 7.77 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 8.19 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 8.30 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 9.69 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*6) δ (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 119.2 (CF<sub>3</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-3', C-4', C-5', C-6'), 131.5 (C-1'), 129.8 (C-2'), 133.4 (C-5), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 444.04 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>23</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>S C, 62.01; H, 4.07; F, 12.79; N, 3.14; O, 10.78; S, 7.20 Trovato C, 61.56; H, 4.03; F, 12.65; N, 2.79; O, 11.68; S, 7.37

**2-((2,6-diclorofeniltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVc)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.18. Resa: 35%. P.f. 191.8°C dec. <sup>1</sup>H NMR (Aceton- *d*7) δ (ppm) = 1.33 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 4.17 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.70 (s, 2H), 7.32-7.55 (m, 4H), 7.64 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 8.29 (d, 1H, *J* = 7.88 Hz), 8.64 (s, 1H, OH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*6) δ (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, , C-3', C-4', C-5'), 130.3 (C-2'-C-6'), 131.5 (C-1'), 133.4 (C-5), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 444.02 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S C, 59.20; H, 3.84; Cl, 15.89; N, 3.14; O, 10.75; S, 7.18 Trovato C, 60.27; H, 3.59; Cl, 16.07; N, 3.82; O, 11.25; S, 7.87

**2-((*o*-toliltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVd)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.24. Resa: 56%. P.f. 184.5°C dec. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*6) δ (ppm) = 1.37 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.22 (s, 3H), 4.26 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.70 (s, 2H), 6.83-6.94 (m, 4H), 7.42 (t,

1H,  $J = 7.88$  Hz), 7.52 (s, 1H), 7.57 (t, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 8.15 (d, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 8.30 (d, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 9.69 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). 13C NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 19.2, (*o*-CH<sub>3</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), 131.5 (C-1'), 133.4 (C-5), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 390.13 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>3</sub>S C, 70.56; H, 5.41; N, 3.58; O, 12.26; S, 8.19 Trovato C, 71.48; H, 6.31; N, 4.23; O, 11.59; S, 7.37

**2-((3,5-diclorofeniltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVe)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.26. Resa: 17%. P.f. 203.0°C dec. 1H NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1.37 (t, 3H,  $J = 7.34$  Hz), 4.30 (q, 2H,  $J = 7.34$  Hz), 4.82 (s, 2H), 7.41-7.47 (m, 3H), 7.52 (s, 1H), 7.57 (t, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 8.17 (d, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 8.28 (d, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 9.69 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). 13C NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-2', C-4', C-6'), 131.5 (C-1'), 133.4 (C-5), 135.6 (C-3'-C-5'), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 445.92 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S C, 59.20; H, 3.84; Cl, 15.89; N, 3.14; O, 10.75; S, 7.18 Trovato C, 60.21; H, 4.03; Cl, 14.84; N, 2.89; O, 10.60; S, 7.23

**2-((3,5-dimetilfeniltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVf)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.28. Resa: 37%. P.f. 158.3°C dec. 1H NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1.35 (t, 3H,  $J = 7.34$  Hz), 2.20 (s, 6H), 4.26 (q, 2H,  $J = 7.34$  Hz), 4.71 (s, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.98 (s, 2H), 7.42 (t, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 7.52 (s, 1H), 7.57 (t, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 8.17 (d, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 8.31 (d, 1H,  $J = 7.88$  Hz), 9.69 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). 13C NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 24.2 (*m*-CH<sub>3</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-2', C-4', C-6'), 131.5 (C-1'), 133.4 (C-5), 138.5 (C-3',C-5'), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 404.10 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>S C, 71.09; H, 5.72; N, 3.45; O, 11.84; S, 7.91 Trovato C, 70.89; H, 6.92; N, 2.98; O, 11.24; S, 7.37

**2-((2,3-diclorofeniltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVg)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.22. Resa: 29%. P.f. 184.1°C dec. 1H NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 1.33 (t, 3H,  $J = 7.34$  Hz), 4.26 (q, 2H,  $J = 7.34$  Hz), 4.71 (s, 2H), 7.38 (t, 1H,  $J = 6.30$  Hz), 7.47 (t, 1H,  $J = 6.30$  Hz), 7.53 (s, 1H), 7.55-7.60 (m, 3H), 8.16 (d, 1H,  $J = 7.80$  Hz), 8.27 (d, 1H,  $J = 7.80$  Hz), 9.69 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). 13C NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b),

126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-4', C-5', C-6'), 137.5 (C-1'), 132.3 (C-2'-C-3'), 133.4 (C-5), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 446.05 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S C, 59.20; H, 3.84; Cl, 15.89; N, 3.14; O, 10.75; S, 7.18 Trovato C, 58.73; H, 3.24; Cl, 15.19; N, 2.86; O, 10.05; S, 7.03

**2-((2-clorofeniltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVh)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.24. Resa: 21%. P.f. 209.0°C dec. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 1.33 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 4.26 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.71 (s, 2H), 7.22 (t, 1H, *J* = 6.30 Hz), 7.35 (t, 1H, *J* = 6.30 Hz), 7.42 (d, 1H, *J* = 8.10 Hz), 7.49 (d, 1H, *J* = 8.10 Hz), 7.53 (s, 1H), 7.55-7.60 (m, 2H), 8.16 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz), 9.69 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-3', C-4', C-5', C-6'), 131.5 (C-1'), 132.3 (C-2'), 133.4 (C-5), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 410.01 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>3</sub>S C, 64.15; H, 4.40; Cl, 8.61; N, 3.40; O, 11.65; S, 7.78 Trovato C, 63.75; H, 3.84; Cl, 8.15; N, 3.07; O, 11.25; S, 7.48

**2-((3,4-diclorofeniltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVi)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.26. Resa: 16%. P.f. 183.5°C dec. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 1.35 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 4.28 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.77 (s, 2H), 7.32 (d, 1H *J* = 6.63Hz), 7.43 (t, 1H, *J* = 6.61 Hz), 7.48-7.52 (m, 3H), 7.64 (s, 1H), 8.16 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz), 9.69 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-2', C-5', C-6'), 129.8 (C-4'), 131.5 (C-1'), 133.4 (C-5), 133.6 (C-3'), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 445.94 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S C, 59.20; H, 3.84; Cl, 15.89; N, 3.14; O, 10.75; S, 7.18 Trovato C, 58.70; H, 3.54; Cl, 15.37; N, 3.02; O, 10.25; S, 7.07

**2-((3-clorofeniltio)metil)-5-idrossi-1H-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVl)**

Rf (esano/etil acetato 8:2) = 0.28. Resa: 4%. P.f. 167.5°C dec. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 1.35 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 4.28 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.77 (s, 2H), 7.25-7.32 (m, 3H), 7.40-7.47 (m, 2H), 7.51 (s, 1H), 7.55 (t, 1H, *J* = 6.61 Hz), 8.16 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz), 9.69 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-2', C-4', C-5', C-6'), 131.5 (C-1'), 133.4 (C-5), 134.5 (C-3'), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 410.06 [M-]. Anal. Calcolato. per C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>3</sub>S C,

64.15; H, 4.40; Cl, 8.61; N, 3.40; O, 11.65; S, 7.78. Trovato C, 63.10; H, 4.45; Cl, 8.53; N, 3.32; O, 11.54; S, 7.62.

**2-((2,6-dimetilfenil)metil)-5-idrossi-1*H*-benzo[g]indolo-3-carbossilato di etile (IVm)**

R<sub>f</sub> (esano/etil acetato 8:2) = 0.30. Resa: 37%. P.f. 197.5°C dec. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 1.26 (t, 3H, *J* = 7.34 Hz), 2.29 (s, 6H), 4.08 (q, 2H, *J* = 7.34 Hz), 4.40 (s, 2H) 7.02-7.18 (m, 3H), 7.42 (t, 1H, *J* = 6.61 Hz), 7.47 (s, 1H), 7.54 (t, 1H, *J* = 6.61 Hz), 8.16 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz), 8.27 (d, 1H, *J* = 7.80 Hz), 9.64 (s, 1H, OH), 12.39 (s, 1H, NH). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) = 14.4, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 19.2, (*o,m*-CH<sub>3</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>S), 59.9, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 100.1 (C-3), 121.4 (C-5a), 121.7 (C-9), 121.8 (C-4), 122.7 (C-3a), 125.1 (C-9b), 126.5 (C-9a), 126.8-127.6 (C-6, C-7, C-8, C-2', C-3', C-4', C-5', C-6'), 131.5 (C-1'), 133.4 (C-5), 143.8 (C-2), 165.5 (C=O). MS-ESI (m/z): 404.14 [M-]. Anal. Calcolato per C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>3</sub>S C, 71.09; H, 5.72; N, 3.45; O, 11.84; S, 7.91 Trovato C, 70.89; H, 5.22; N, 3.05; O, 10.82; S, 7.37



### **Sezione biologica**

#### ***Cellule***

I PMNL umani sono stati isolati da concentrati di leucociti provenienti dall'ospedale St. Markus (Francoforte, Germania). In breve, è stata prelevata un'aliquota di sangue venoso da donatori adulti sani ed è stata sottoposta a centrifugazione a 4000g per 20 minuti a 20°C per recuperarne i leucociti concentrati. I PMNL sono stati, poi, rapidamente isolati per sedimentazione con destrano, sottoposti a centrifugazione su cuscinetti di Nycoprep (laboratori PAA, Linz, Austria) seguita dalla lisi ipotonica degli eritrociti. I PMNL ( $7.5 \cdot 10^6$  cellule/mL; purezza > 96-97%) sono stati, infine, risospesi in una soluzione salina, contenente un tampone fosfato, a pH 7.4 (PBS) e poi è stato aggiunto 1 mL di glucosio.

#### ***Determinazione della formazione dei prodotti della 5-Lipossigenasi in cellule intatte***

Per le analisi in cellule intatte, un quantitativo di  $10^7$  PMNL è stato risospeso in 1 mL di PBS addizionato con 1 mg/mL di glucosio e 1 mM di  $\text{CaCl}_2$ . Dopo la preincubazione con i composti indicati (a 37 °C), la formazione dei prodotti della 5-LOX è stata avviata dall'aggiunta di 2,5  $\mu\text{M}$  dello ionoforo A23187 con o senza AA 20  $\mu\text{M}$ , come indicato. Dopo 10 min a 37 °C, la reazione è stata bloccata con 1 mL di metanolo, e 30  $\mu\text{L}$  1 N HCl, 200 ng di prostaglandina B1 e 500  $\mu\text{L}$  di PBS sono stati ulteriormente addizionati. I metaboliti della 5-LOX formati sono stati estratti e analizzati mediante HPLC e la loro quantità è espressa in ng di prodotto per  $10^6$  cellule. Tra quelli identificati ricordiamo LTB4 e i suoi *all-trans* isomeri: l'acido 5(S),12(S)-diidrossi-6-10-*trans*-8,14-*cis*-eicosatetraenoico (**5(S),12(S)-DiHETE**), e l'acido 5(S)-idro(pero)ssi-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraenoico (**5-H(p)ETE**). I Cisteinil-LT (LTC4, D4 e E4) non sono stati rilevati e prodotti di ossidazione di LTB4 non sono stati determinati.

#### ***Espressione, purificazione della 5-LOX ricombinante umana proveniente da E. coli, e determinazione dell'attività residua della LOX in test cell-free***

La Trasformazione di E. coli BL21 con il plasmide pT3-5LO così come l'espressione e la purificazione della 5-LOX ricombinante sono stati condotti secondo modelli riportati in letteratura. La 5-LOX purificata è stata immediatamente impiegata per il saggio di attività inibitoria. Pertanto, 0.5  $\mu\text{g}$  di enzima purificato sono stati diluiti mediante PBS/EDTA (volume finale di 1 ml) e pre-incubati con i derivati di interesse. Dopo 5-10 min a 4°C i campioni sono stati pre-riscaldati per 30s a 37°C. Fatto ciò, 2mM di  $\text{CaCl}_2$  ed l'adeguato apporto di AA vengono addizionati ai campioni per permettere la formazione dei prodotti della 5-LOX. Dopo il tempo di 10min a 37°C la reazione è stoppata ed

addizionata di 1ml di metanolo raffreddato in ghiaccio, permettendo l'analisi dei metaboliti mediante HPLC



**CAPITOLO V**

**PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI DERIVATI A NUCLEO  
CATECOLICO**

## 5.1 PRESUPPOSTI SCIENTIFICI E SCOPO DELLO STUDIO

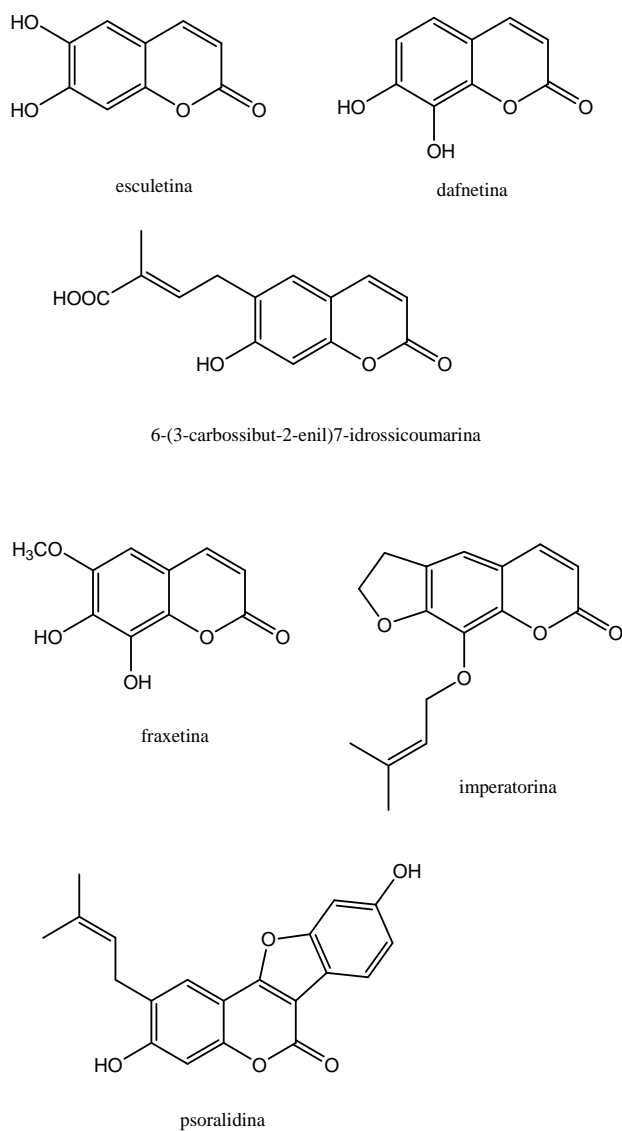
### 5.1.1. INIBITORI DELLA 5-LIPOSSIGENASI DI ORIGINE VEGETALE

Dal 1980 fino ad oggi sono state condotte numerose indagini su estratti vegetali allo scopo di rivelare la presenza di potenziali inibitori dei prodotti della 5-LOX. In molti di questi studi, i composti derivati dalle piante sono stati testati per valutarne l'efficacia nel bloccare la sintesi dei LTs in cellule isolate da organi animali o umani. Nel 1981, è stato pubblicato uno studio sul derivato polifenolico **NDGA** (acido nordiidroguaiaretico), estratto dalla pianta messicana *Larrea divaricata*, come primo inibitore della 5-LOX di origine vegetale (Bokoch, Reed et al., 1981). Più tardi sono stati isolati altri composti dalla pianta cinese *Artemisia Rubris*, si tratta di **acido caffeico**, **eupatilina** e **4-dimetileupatilina** che inibiscono l'attività della 5-LOX sia direttamente sull'enzima purificato che in saggi effettuati su cellule di mastocitoma (Koshihara et al., 1983). Nello stesso anno anche **l'esculetina**, presente in molte piante, è stata identificata come inibitore della 5-LOX (Neichi et al., 1983). Tutti i composti sopra citati possiedono un duplice meccanismo d'azione in quanto, oltre ad essere antiossidanti, sono in grado di chelare il ferro e bloccare così il ciclo catalitico dell'enzima. Un'altra classe di inibitori della 5-LOX di origine vegetale comprende composti carenti di proprietà riducenti che interferiscono con la formazione dei LTs in quanto la loro struttura mima quella degli acidi grassi. Rientrano in questo gruppo i triterpeni pentaciclici che inibiscono l'attività della 5-LOX competendo con il substrato (AA) per il legame al sito dell'enzima.

#### *Cumarine*

Le cumarine comprendono una classe di composti fenolici che hanno in comune il nucleo 1,2-benzopirone (Egan et al., 1990) (Fig. 5.1). Le molteplici possibili sostituzioni e coniugazioni sulla struttura di base offrono una grande varietà di derivati distinti, e queste modificazioni determinano le proprietà farmacologiche delle rispettive cumarine (Fylaktakidou et al., 2004). Sebbene la cumarina in se stessa e la 7-idrossicumarina non inibiscono la 5-LOX, la **6,7-diidrossicumarina (esculetina)** è stata a lungo riconosciuta come un inibitore dell'enzima in questione (Neichi et al., 1983). Per quel che riguarda le SAR in generale, le cumarine che presentano la porzione orto-diidrossi come **l'esculetina**, **la 4-metilesculetina** e **la fraxetina** sopprimono la formazione dei LTs con valori di  $IC_{50}$  compresi tra 1,46 e 10  $\mu$ M in saggi cellulari (Kimura et al., 1985). Come nel caso dei polifenoli, anche per questi composti si pensa che l'effetto inibitorio sulla biosintesi dei LTs sia la risultante di un duplice meccanismo d'azione, pertanto le cumarine sarebbero in grado di chelare il ferro del sito-attivo oltre ad esercitare un'azione antiossidante (Hoult et al., 1994). La **6-(3-carbossibut-2-enil)-7-idrossicumarina** da *Peucedanum ostruthium*, caratterizzata da una sola funzione ossidrilica, due residui prenilati e un gruppo carbossilico, è il più potente derivato cumarinico ( $IC_{50}=0,25\mu$ M in

PMNL) finora conosciuto. Esso, inoltre, si è mostrato efficiente nel contrastare l'edema sulla zampa del ratto indotto dalla carragenina, quando somministrato per via orale con un valore di  $ED_{50}=0,03\text{mg/kg}$  (Hiermann *et al.*, 1998). I derivati cumarinici che mancano di gruppi fenolici (es. **ostolo**, **imperatorina**) inibiscono anch'essi la biosintesi dei LTs ma risultano meno efficienti, con valori di  $IC_{50}$  superiori a  $10\mu\text{M}$  (Abad *et al.*, 2001). Va sottolineato, però, che le cumarine, al contrario dei flavonoidi e degli altri polifenoli, sono poco selettive verso la 5-LOX e inibiscono fortemente anche altri enzimi coinvolti nella cascata dell'AA come la  $PLA_2$  e le COXs.

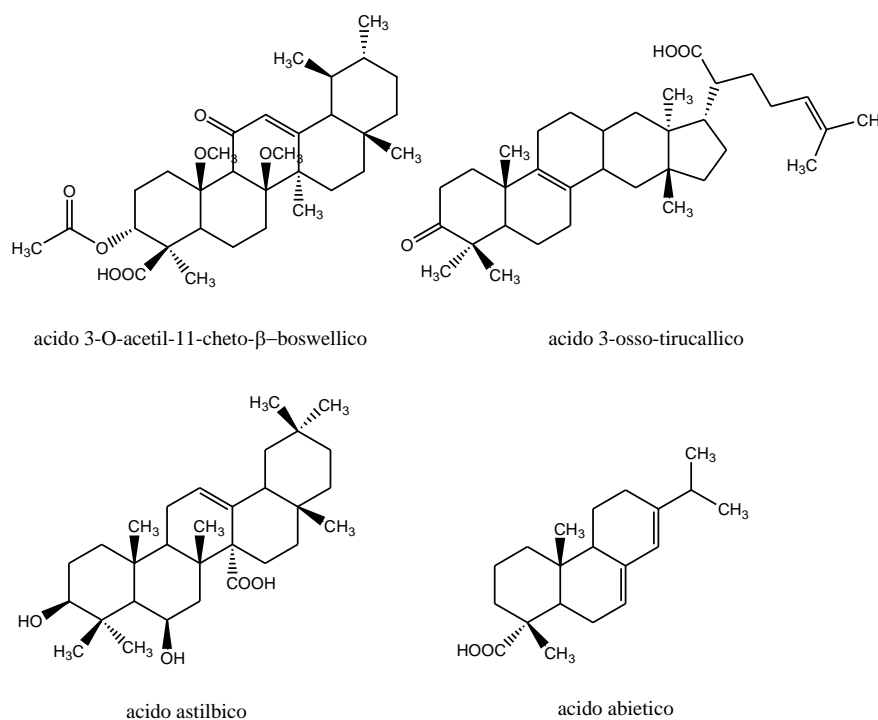


**Figura 5.1:** *Cumarine che inibiscono la 5-LOX*

### ***Triterpeni pentaciclici***

In generale i triterpeni, costituiti da sei unità isopreniche, rappresentano la struttura base di un grande numero di composti biologicamente attivi in cui sono inclusi ormoni steroidei, vitamina D, glicosidi cardioattivi, alcaloidi steroidei, acidi biliari e saponine. I triterpeni pentaciclici (PTs) sono ampiamente distribuiti in molte piante, in particolare gli acidi boswellici (BAs), ottenuti dalla pianta *Boswellia serrata*, sono stati usati come rimedi antiinfiammatori nella medicina popolare (Ammon *et al.*, 2006). Differentemente da molti altri composti naturali che bloccano l'attività della 5-LOX operando un'azione chelante o riducente, i PTs sembrano interferire con il legame dell'acido grasso (AA) al sito dell'enzima (Sailer *et al.*, 1998) (Fig. 5.2). I PTs maggiormente riconosciuti come inibitori della 5-LOX sono gli acidi boswellici e tra questi uno dei più interessanti è **AKBA (acido 3-O-acetil-11-cheto- $\beta$ -boswellico)** con un valori di  $IC_{50}=1,5-15\mu M$  in cellule intatte (Altmann *et al.*, 2004). Studi condotti, usando l'enzima isolato, hanno mostrato che AKBA è un inibitore diretto della 5-LOX di tipo non-redox con valori di  $IC_{50}=8-50\mu M$  (Werz *et al.*, 1997). Questi risultati così differenti ottenuti negli studi sull'enzima purificato possono essere dovuti alle differenti condizioni sperimentali o al tipo di cellula sottoposta all'analisi. Interessante si mostra anche l'**acido 3-ossotirucallico**, anch'esso presente nella *B. serrata*, che è risultato essere il più efficiente sull'enzima libero ( $IC_{50}=3\mu M$ ), mentre in cellule intatte il valore di  $IC_{50}$  è significativamente più alto e corrisponde a  $15\mu M$  (Boden *et al.*, 2001). Un altro PT interessante è l'**acido astilbico** ( $IC_{50}=2,1\mu M$  in analisi cellulare), che si è rilevato equipotente ad AKBA. Sfortunatamente, gli esperimenti per valutarne l'efficacia come inibitore diretto della 5-LOX non sono stati ancora eseguiti (Moon *et al.*, 2005). Per quel che riguarda il diterpene tricyclico **acido abietico** si è visto che è in grado di inibire la 5-LOX della soia ( $IC_{50}=29,5\mu M$ ) ma gli effetti sulla 5-LOX nei mammiferi devono ancora essere determinati (Ulus *et al.*, 2002).

Per quel che riguarda il meccanismo d'azione di questi composti, si pensa che in realtà AKBA interagisca con su un sito di legame allosterico presente sulla 5-LOX, selettivo per vari triterpeni pentaciclici, (Sailer *et al.*, 1998). Certamente il chetone in posizione 11 e la funzione carbossilica in posizione 4 sono gruppi che giocano un ruolo essenziale per l'attività inibitoria sulla 5-LOX (Sailer *et al.*, 1996). Sebbene studi precedenti abbiano dimostrato una selettività degli acidi boswellici per la 5-LOX, recentemente si è visto che AKBA potenzialmente è in grado di sopprimere anche la formazione dei prodotti della 12-LOX e ciò è stato dimostrato sia in sistemi cellulari sia in analisi *cell-free* (Poeckel *et al.*, 2006). Sebbene la 5-LOX possieda un sito di legame specifico per i PTs, e gli acidi boswellici così come l'acido 3-osso-tirucallico inibiscano efficacemente la catalisi enzimatica, è noto che i PTs sono coinvolti in molti *pathways* di trasduzione del segnale e hanno effetti su molti effettori (Poeckel *et al.*, 2006).



**Figura 5.2:** Triterpeni pentaciclici inibitori della 5-LOX

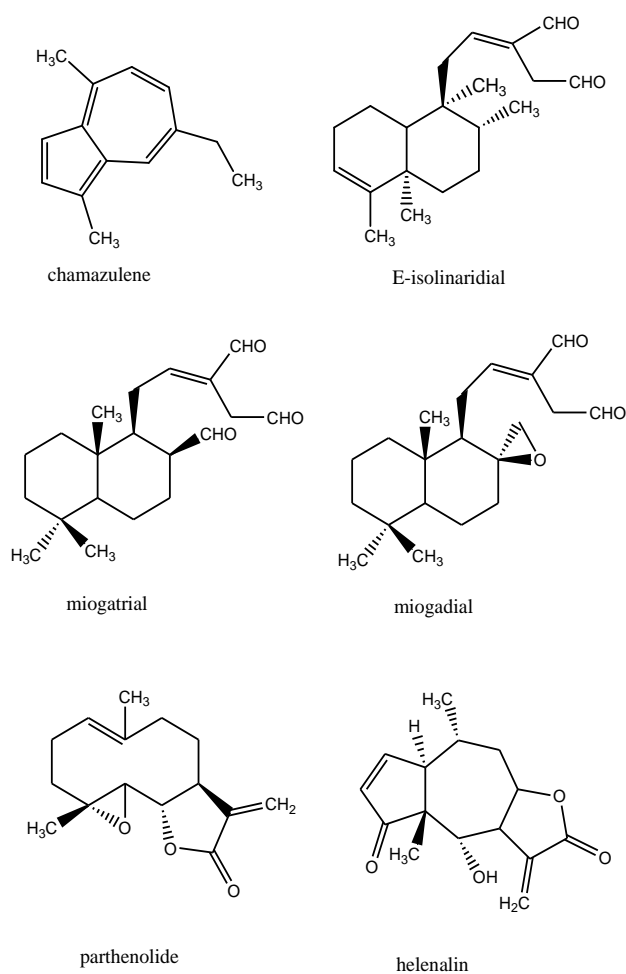
### Sesquiterpeni

Si conoscono più di 3000 sesquiterpeni, costituiti da tre unità isopreniche, e molti di loro si trovano come policicli, presentanti funzioni lattoniche, aldeidiche o chetoniche. Questi composti sono stati a lungo considerati agenti antiinfiammatori essendo attivi *in vitro* e *in vivo* (Zhang *et al.*, 2005)(Fig. 5.3). Il **camazulene**, presente in *Chamomilla recutita*, è stato usato per il trattamento dei disturbi infiammatori della cute e dell'intestino in quanto il suo meccanismo d'azione sembrava essere imputabile alla neutralizzazione dei radicali liberi e al blocco della perossidazione dei lipidi *in vitro* (Rekka *et al.*, 1996). Inoltre, è stato osservato che esso inibisce la formazione del LTB<sub>4</sub> in cellule intatte (IC<sub>50</sub>=15μM) e sull'enzima libero (IC<sub>50</sub>=10μM) (Safayhi *et al.*, 1994). Il più potente sesquiterpene riportato è l'**E-isolinariidiale**, un composto dialdeidico presente in *Linaria saxatilis var. glutinosa*, che agisce direttamente sull'enzima con un valore di IC<sub>50</sub>=0.2μM così come in

neutrofili intatti con una IC<sub>50</sub>=0,42μM (Benrezzouk *et al.*, 1999). Altri due composti **miogadiale** e **miogatriale** inibiscono la 5-LOX in analisi *cell-free* con IC<sub>50</sub>=4μM e 7,5μM rispettivamente (Abe *et al.*, 2006). Si pensa che i gruppi aldeidici di questi composti possano formare addotti con tioli o funzioni amminiche primarie che sono essenziali per l'attività catalitica dell'enzima (Feisst *et al.*,



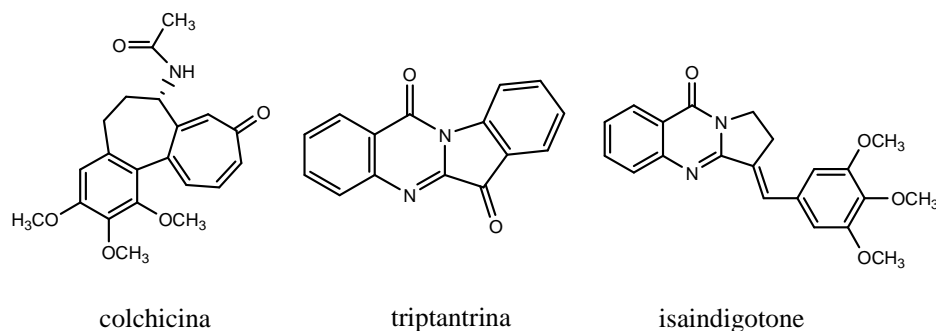
2005). Tra i sesquiterpeni lattonici **elenalina** e **partenolide** sono noti inibitori della 5-LOX (*Schmidt et al., 2001*). Questi composti di solito agiscono formando legami covalenti con i gruppi tiolici di residui di cisteina presenti nell'enzima target. In generale i composti sesquiterpenici interferiscono con la biosintesi dei LTs grazie alle loro proprietà antiossidanti, ma anche tramite un attacco diretto sulla 5-LOX, tuttavia molti di loro non sono selettivi e possono interagire anche con altri targets coinvolti nel processo infiammatorio.



**Figura 5.3:** Sesquiterpeni inibitori della 5-LOX

### Alcaloidi

Sebbene vi sia un'evidenza sostanziale degli effetti antiinfiammatori degli alcaloidi *in vivo*, solo pochi studi sono riusciti a dimostrare la soppressione della biosintesi dei leucotrieni (Fig. 5.4). Tra questi composti va senz'altro citata la **colchicina**, che è stata per lungo tempo usata per il trattamento della gotta e dell'artrite reumatoide (Ben-Chetrit *et al.*, 1998). Negli anni '80 fu dimostrata per la prima volta la capacità della colchicina di inibire la formazione del LTB<sub>4</sub> in neutrofili, determinando una riduzione del numero dei microtubuli (Reibman *et al.*, 1986). Tuttavia gli studiosi escludevano che la soppressione della biosintesi dei leucotrieni fosse dovuta ad un'azione diretta sulla 5-LOX, solo esperimenti su cellule intatte fornirono dati utili. Pertanto, le molteplici azioni degli alcaloidi sarebbero rivolte preferenzialmente ad altre proteine coinvolte nell'attivazione della 5-LOX (Muller *et al.*, 1996). Oltre alla famosa colchicina meritano di essere citati due alcaloidi strutturalmente correlati: **triptantrina** e **isaindigotone**. In entrambe le strutture si evidenzia la presenza di un *core* chinazolinone. Essi rappresentano potenti soppressori dell'attività della 5-LOX con IC<sub>50</sub>=0,15 e 10 μM in tests effettuati su neutrofili intatti (Molina *et al.*, 2001).



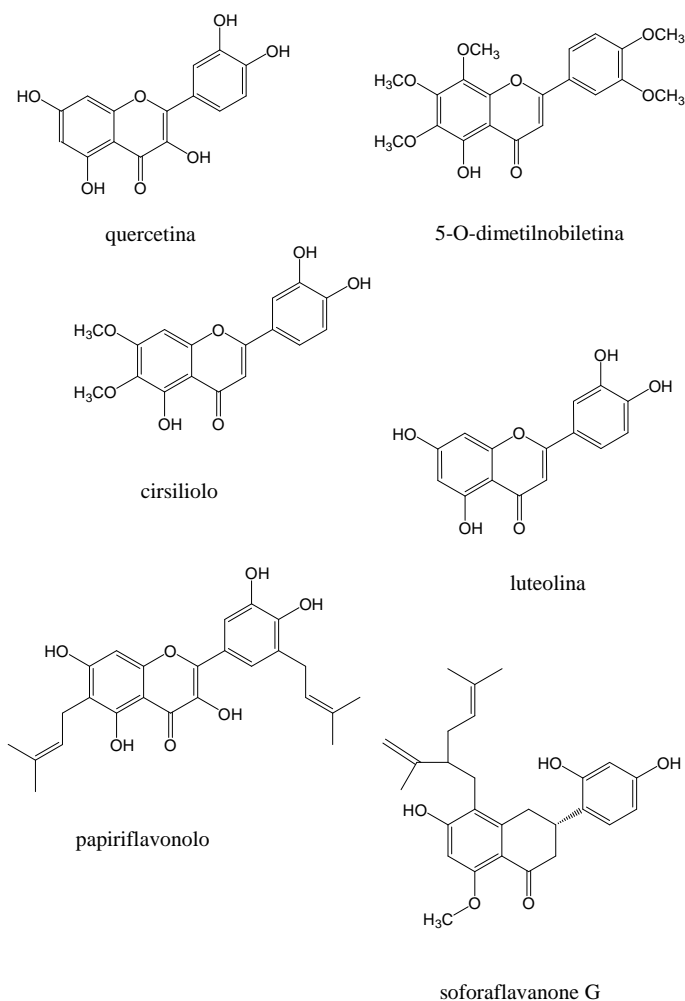
Fig

ura 5.4: Alcaloidi inibitori della 5-LOX

### Flavonoidi

I flavonoidi sono largamente distribuiti nella specie *Kingdom* (sorgente anche di altri polifenoli e cumarine) e sono stati identificati più di 4000 derivati (Kim *et al.*, 2004). Da studi *in vitro* e *in vivo* sono emerse diverse attività di questi composti: antitumorale, antivirale, antimicrobica, antitrombotica, immunomodulante ed antiinfiammatoria. I flavonoidi si sono mostrati idonei a

contrastare l'infiammazione acuta e cronica in vari modelli animali e somministrati oralmente si sono rivelati in grado di ridurre l'edema che compare sulla zampa del topo, indotto dalla carragenina (Hiermann *et al.*, 1998). Essi costituiscono una delle principali classi di composti derivati dalle piante capaci di interferire con la biosintesi dei prodotti della 5-LOX (Fig. 5.5). Tuttavia va sottolineata la scarsa selettività di molti di questi verso l'enzima, pertanto non è sempre chiaro se la ridotta formazione dei LTs sia dovuta all'inibizione diretta della 5-LOX o all'inibizione della PLA<sub>2</sub> o della FLAP. Il composto più attivo sull'enzima appare essere il **soforaflavanone G**, un flavanolo prenilato contenuto in *Sophora flavescens*, con valori di IC<sub>50</sub>=0,09-0,25μM (Chang *et al.*, 2001). La **luteolina** si è rivelata molto potente in sistemi cellulari con un valore di IC<sub>50</sub>=0,1μM ma non ci sono dati validi riguardo alla sua efficacia sull'enzima. Tra i composti che hanno fornito dati interessanti in tutti e due i tests vanno citati: la **quercetina** (IC<sub>50</sub>=3,2μM in cellula e 0,3-25μM sulla 5-LOX purificata), la **5-O-dimetinobiletina** (IC<sub>50</sub>=0,35μM in cellula e 0,25μM sulla 5-LOX purificata), **cirsiliolo** (IC<sub>50</sub>=0,4μM in cellula e 0,1μM sulla 5-LOX purificata), **papiriflavonolo** (IC<sub>50</sub>=0,64μM in cellula e 7μM sulla 5-LOX purificata).



**Figura 5.5:** Flavonoidi inibitori della 5-LOX

Le relazioni struttura-attività (SAR) relative a questa classe di composti denotano che:

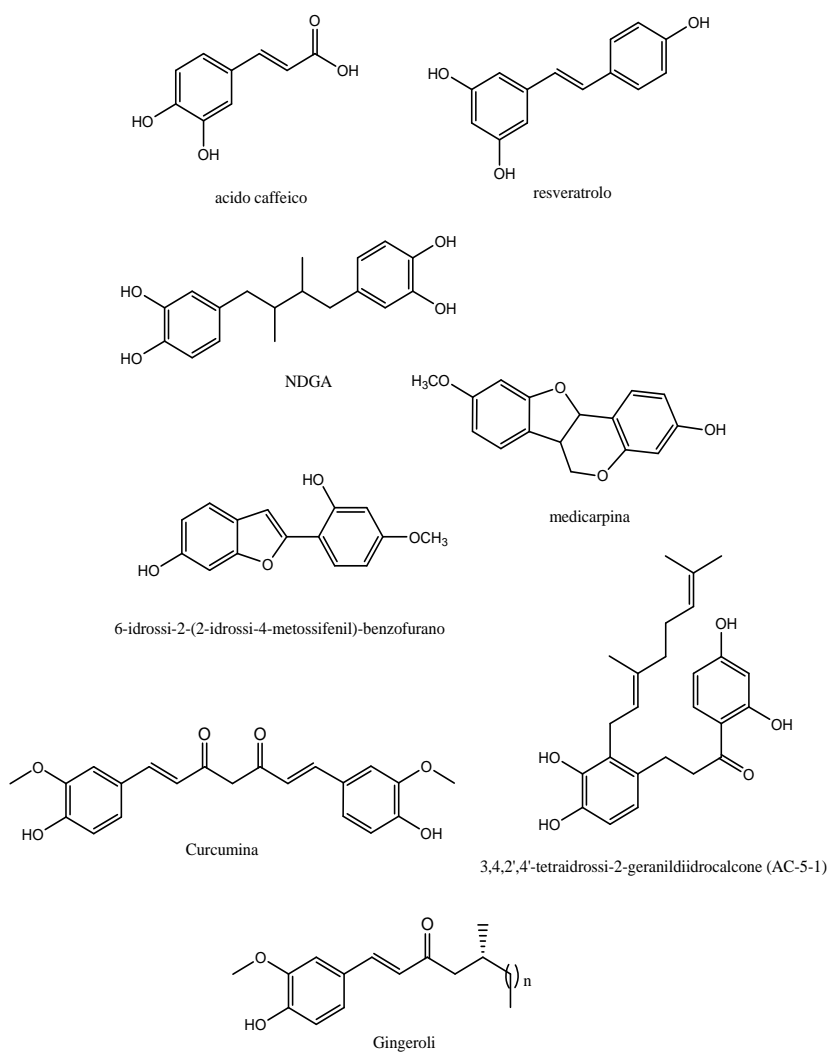
1. I composti che presentano due ossidrili nelle posizioni 3' e 4' dell'anello C si dimostrano essere più interessanti rispetto ai derivati mono e tri-idrossilati in termini di efficacia in sistemi cellulari. Ciò si può constatare mettendo a confronto un derivato di-idrossilato (cirsioliolo con  $IC_{50}=0,4\mu M$ ) con uno mono-idrossilato (xantomicrolo con  $IC_{50}=29,2\mu M$ ) e tri-idrossilato (miricetina con  $IC_{50}=13\mu M$ ).

2. La sostituzione di gruppi ossidrilici con funzioni metossiliche sugli anelli A e C non comporta una riduzione della potenza, infatti la 5-O-dimetilnobiletina, che abbiamo già visto essere molto potente sia in sistemi cellulari che sull'enzima libero, presenta su entrambi gli anelli diversi metossili.
3. La presenza di un'unità zuccherina nel composto miricetina-3-O- $\beta$ -D-glicuronide ( $IC_{50}=0,1\mu M$ ) lo rende più efficiente del corrispondente aglicone, probabilmente a causa di un favorevole *uptake* cellulare del glicoside che sfrutta trasportatori specifici.
4. L'incremento delle caratteristiche lipofile, favorendo l'attraversamento delle membrane cellulari, ci porta ad ottenere, nei tests cellulari, risultati migliori di quelli ricavati da analisi condotte direttamente sull'enzima. A tal proposito notiamo che il papiriflavonolo, a differenza di altri, è più potente in cellule intatte che sull'enzima tal quale. Ciò è dovuto presumibilmente alla maggiore lipofilia conferita dai due residui prenilati che caratterizzano la molecola.

#### **Altri polifenoli**

Insieme ai flavonoidi, i polifenoli costituiscono una sorgente ricca di inibitori della sintesi dei prodotti della 5-LOX (Fig. 5.6). Questi composti variano enormemente nella struttura e di conseguenza nella loro efficacia. Sebbene sembri che un incremento della lipofilia (dovuto a estese catene alchiliche) e del numero di gruppi fenolici governi la potenza, in realtà confrontando le strutture così differenti di questi composti, le SAR risultano poco chiare (Wagner *et al.*, 1989). Per alcuni di questi, la potenza nell'inibizione della 5-LOX è correlata alla loro capacità di neutralizzare i radicali liberi o sopprimere la perossidazione dei lipidi (Laughton *et al.*, 1991). Tuttavia anche composti carenti di proprietà antiossidanti mostrano di essere altamente efficienti (Feisst *et al.*, 2005). Un recente studio finalizzato ad indagare sulle caratteristiche di legame di inibitori tipici della 5-LOX, quali **NDGA**, **acido caffeico** ed **esculetina**, ha rivelato che questi composti, in aggiunta all'azione antiossidante, possiedono la capacità di legare l'enzima (Zhang *et al.*, 2006). Ad ogni modo resta il fatto che, essendo i vari polifenoli strutturalmente e chimicamente molto differenti tra loro, è molto difficile dedurre con precisione le SAR e il meccanismo d'azione per questa classe di composti. Tra i composti che mostrano una buona potenza nell'inibire la 5-LOX vanno citati: **iperforina** ( $IC_{50}=1,2\mu M$  in cellula e  $0,09\mu M$  sulla 5-LOX purificata); **mirtucommulone** ( $IC_{50}=1,8\mu M$  in cellula e  $5\mu M$  sulla 5-LOX purificata); **medicarpina** ( $IC_{50}=0,5$  in cellula) e **6-idrossi-2-(2-idrossi-4-metossifenil)-benzofurano** ( $IC_{50}=0,05\mu M$  in cellula e  $0,08\mu M$  sulla 5-LOX purificata); **3,4,2',4'-tetraidrossi-2-**

**geranildiidrocalcone** ( $IC_{50}=1\mu M$  in cellula e  $0,05\mu M$  sulla 5-LOX purificata); **curcumina** ( $IC_{50}=2,7\mu M$  in cellula e  $0,7-30\mu M$  sulla 5-LOX purificata) e **gingeroli** ( $IC_{50}=0,004-3\mu M$  in cellula). Infine, va citato il **resveratrolo** di cui è stata dimostrata la capacità di inibire la biosintesi dei LTs in cellule di PMNL con un valore di  $IC_{50}=1,37-8,9\mu M$  (Kimura *et al.*, 1995).

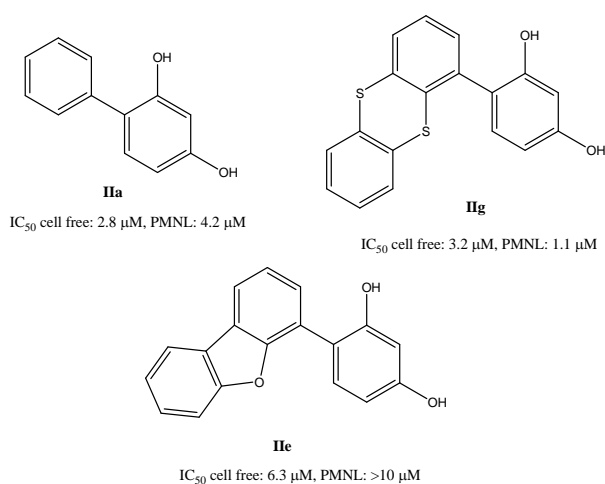


**Figura 5.6:** Polifenoli inibitori della 5-LOX

### 5.1.2 SCOPO DELLO STUDIO

Quanto riportato nel precedente paragrafo mostra come i composti polifenolici occupino una posizione di rilievo nell'inibire l'attività della 5-LOX.

Sulla base di ciò, il gruppo di ricerca della Seconda Università degli studi di Napoli del dipartimento di Medicina Sperimentale, sotto la supervisione della Prof. Filosa e del Prof. De Rosa, si è interessato, negli ultimi anni, ad un progetto che ha come finalità l'ottenimento di nuovi composti a struttura polifenolica capaci di inibire efficientemente la 5-lipossigenasi. A tal proposito è stato messo in evidenza che alcuni derivati, presentanti un nucleo resorcinolico legato ad anelli aromatici ed eteroaromatici (**Fig. 5.7**), sono in grado di interferire con il metabolismo dell'acido arachidonico, inibendo la sintesi dei leucotrieni sia in cellule di polimorfonucleati che in sistemi *cell-free*, utilizzando l'enzima purificato ottenuto mediante la tecnica del DNA ricombinante.



**Figura 5.7:** Strutture e IC<sub>50</sub> di composti polifenolici di sintesi

Il mio lavoro nasce, pertanto, come completamento di tale progetto e prosegue nella sintesi di una nuova serie di derivati di natura polifenolici (**4a-4i**) (Fig. 5.8) presentanti un nucleo catecolico a cui sono stati legati (in posizione **4**) differenti sostituenti aromatici ed eteroaromatici (a due o a tre termini), al fine di implementare gli studi di correlazione struttura attività. In tal modo, è stato possibile valutare sia il ruolo del nucleo polifenolico (*resorcinolico o catecolico*) nell'attività inibitoria della 5-LOX che l'importanza del sostituente nel determinare una maggiore o minore potenza d'inibizione.

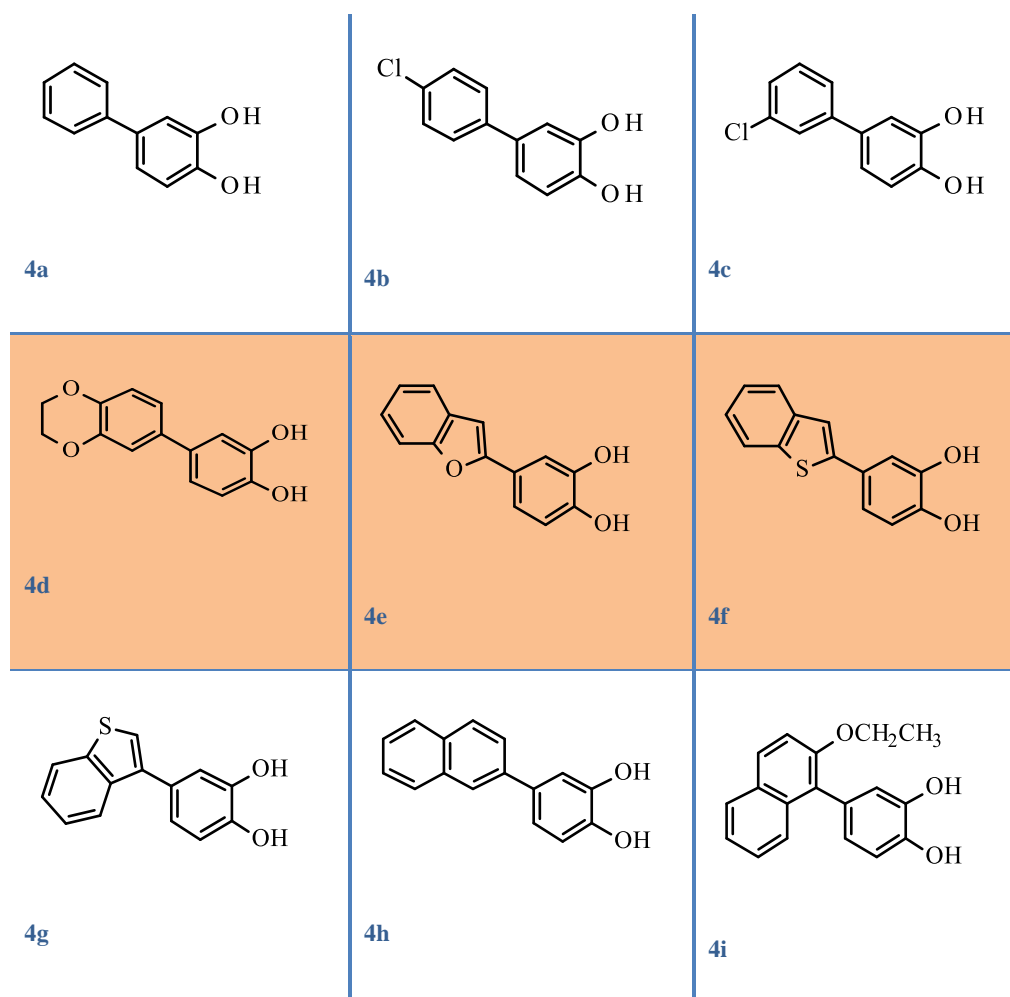


Figura 5.8: Strutture dei composti catecolici sintetizzati

Tutti i composti sintetizzati sono stati caratterizzati mediante tecniche NMR e Massa e successivamente inviati al gruppo di ricerca del prof. Oliver Werz per valutarne la capacità inibitoria a carico della 5-LOX.

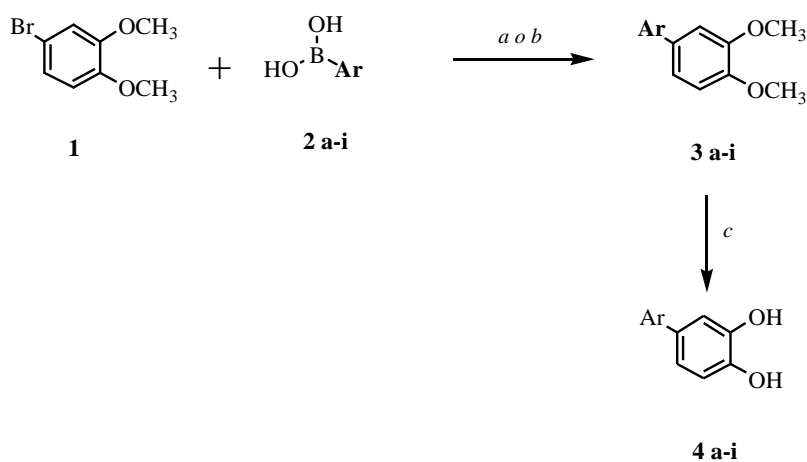
È da precisare il fatto che tale indagine rappresenta un progetto *on-going*, attualmente in fase di sviluppo, pertanto le informazioni ottenute fin'ora sono solo di natura parziale. Soltanto il proseguo della ricerca direzionata in tal senso permetterà una piena conoscenza delle relazioni struttura-attività.



## 5.2 PARTE CHIMICA

I composti desiderati **4a-i** (Fig. 5.8) sono stati ottenuti sfruttando il seguente approccio sintetico (Schema 5.1) costituito essenzialmente da due soli passaggi chiave. Ciascuno di essi è stato, poi, ottimizzato allo scopo di migliorare le rese complessive e rendere più agevoli i processi di purificazione.

Schema 5.1

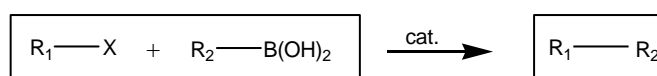


**Reagenti e condizioni:** (a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ , Etanolo, MW; (b)  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$ , Etanolo, MW  
(c)  $\text{BBr}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-15^\circ\text{C}$  a temperature ambiente

**Step 1:** Sintesi dei derivati 1-aril-3,4-dimetossi benzenici

Il primo step sintetico riguarda la formazione dei derivati **3a-i** mediante reazione di Suzuki.

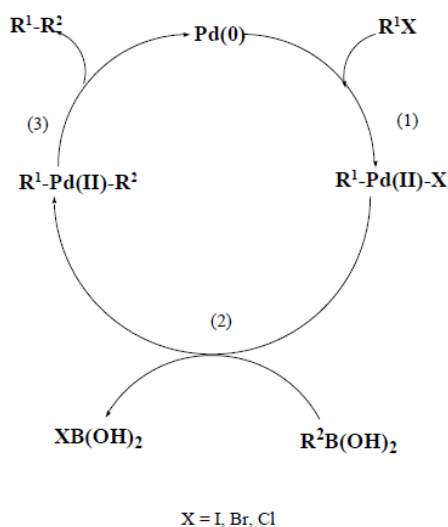
La reazione di Suzuki-Miyaura, detta anche più semplicemente reazione di Suzuki, è una reazione di *cross-coupling* tra un composto organoboronic, spesso un acido boronico, ed un elettrofilo organico, in presenza di un catalizzatore, usualmente a base di palladio (schema 5.2).



R<sub>1</sub> = arile, vinile, alchile, alchenile;  
R<sub>2</sub> = arile, vinile;  
X = I, Br, Cl, OTf.

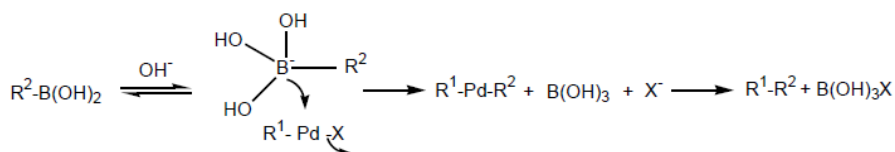
**Schema 5.2** Reazione di Suzuki-Miyaura

È una delle reazioni più versatili e utilizzate per la formazione selettiva di legami carbonio-carbonio, in particolare per la formazione di derivati biarilici. L'impiego dei reagenti organoboronic è una caratteristica principale di questa reazione e uno dei suoi punti di forza è proprio da ricercarsi nella natura di questi reagenti. Essi, infatti, si preparano con relativa semplicità mediante reazione di idroborazione, presentano un'elevata stabilità all'aria e all'umidità, buona stabilità termica e soprattutto bassa tossicità. Infine, cosa molto importante, hanno elevata tollerabilità verso un ampio numero di gruppi funzionali. Come elettrofili organici si possono utilizzare alogenuri vinilici, arilici o benzilici, o anche i triflati seppure meno usati per l'elevato costo della loro sintesi. La reazione di Suzuki-Miyaura prevede una sequenza di tre passaggi: addizione ossidativa, transmetallazione ed eliminazione riduttiva (Schema 5.3).



**Schema 5.3** Ciclo catalitico della reazione di Suzuki

Il primo e l'ultimo *step* sono ben noti; per quanto riguarda invece lo stadio di transmetalazione si è visto che la presenza di una base favorisce la velocità della reazione stessa. Le basi più frequentemente impiegate sono sali inorganici come carbonati, fosfati o idrossidi sia in fase organica che in fase acquosa, più raro è l'uso di basi organiche come alcolati, ammine e carbossilati



**Schema 5.4** Funzione della base nel meccanismo della reazione di Suzuki-Miyaura

Il principio su cui si basa la reazione, palladio-catalizzata, per la formazione di legamicarbonio-carbonio è la formazione di intermedi in cui entrambi i reagenti si coordinano al palladio mediante legami semplici Pd-C (addizione ossidativa). Quindi il ciclo catalitico prevede la formazione del legame C-C con ripristino dello stato di ossidazione iniziale del palladio (eliminazione riduttiva).

La capacità del palladio di ossidarsi e ridursi in modo rapido e reversibile nel corso della reazione di *cross-coupling* è di importanza chiave per l'efficienza del processo. Negli ultimi anni è stata studiata

un'ampia gamma di sistema catalitici a base di palladio, sono più di 700 i lavori scientifici negli ultimi dieci anni, solo per quanto riguarda la formazione di legami arile-arile.

Tradizionalmente la reazione di Suzuki è condotta utilizzando complessi di palladio con leganti fosfinici, per la loro elevata efficienza. Le fosfine, impiegate come leganti, svolgono due funzioni: da una lato, per la loro elevata basicità, favoriscono lo stadio di addizione ossidativa, dall'altro stabilizzando il Pd(0) in soluzione ne prevengono la precipitazione. I complessi di Pd(II) contenenti leganti fosfinici altamente ingombrati, come le trialchilfosfine e le trifenilfosfine, riescono, infatti, a catalizzare il *cross-coupling* di arilalogenuri attivati.

Va, inoltre, aggiunto che da una ventina di anni a questa parte i processi sintetici descritti hanno subito un'evoluzione esponenziale mediante lo sviluppo di reazione in sistemi *microwaves*: l'esposizione dell'ambiente di reazione alle microonde permette, infatti, di usufruire di una estesa serie di vantaggi, uno fra tutti la notevole riduzione dei tempi di reazione rispetto alle metodiche di riscaldamento convenzionale.

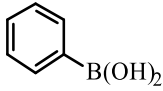
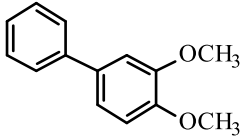
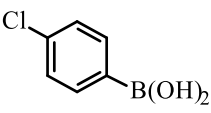
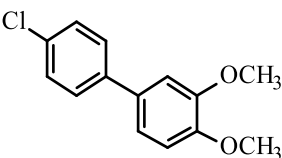
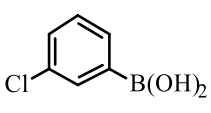
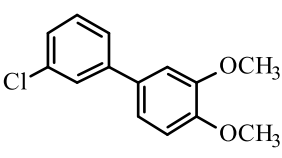
Pertanto, sulla base di queste informazioni, si è proceduti alla messa a punto dello schema sintetico impiegando:

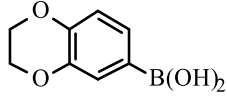
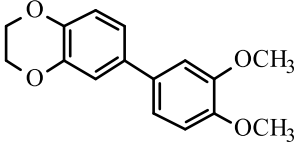
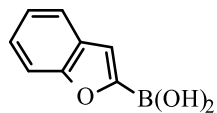
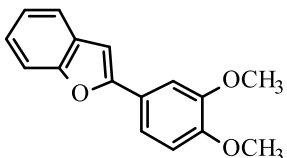
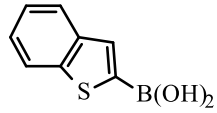
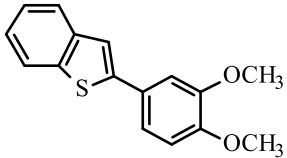
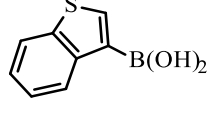
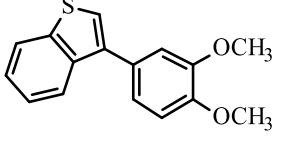
- 9 differenti acidi aril boronici (**2a-i**) tutti commercialmente reperibili;
- 4-bromo-1,2 dimetossibenzene come alogenuro arilico;
- PdCl<sub>2</sub>(*dppf*) come catalizzatore;
- una base, quale carbonato di potassio anidro;
- Etanolo come solvente.

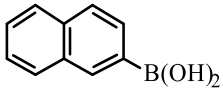
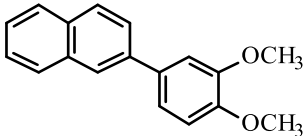
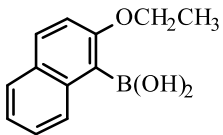
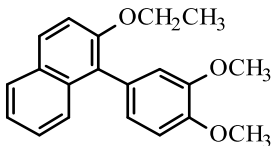
Le miscele di reazioni così ottenute sono state irradiate alle MW per un arco temporale di 25 minuti ad una temperatura di 110°C mediante l'utilizzo di un sistema Microwaves Initiator +, Biotage®

Se per alcuni dei prodotti desiderati la metodica riportata ha permesso di ottenere rese sintetiche sufficientemente esaustive dopo purificazione per altri non è stato così. Questi ultimi presentavano, infatti, rese complessive basse all'incirca del 40%.

Tabella 5.1

|          | Ar-B(OH) <sub>2</sub>                                                               | Prodotto                                                                            | Tempo<br>[min] | Temp.<br>[°C] | Resa<br>[%]     |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------|---------------|-----------------|
| <b>1</b> |    |    | 25             | 110           | 90 <sup>a</sup> |
|          | <b>2a</b>                                                                           | <b>3a</b>                                                                           |                |               |                 |
| <b>2</b> |   |   | 15             | 150           | 83 <sup>b</sup> |
|          | <b>2b</b>                                                                           | <b>3b</b>                                                                           |                |               |                 |
| <b>3</b> |  |  | 15             | 150           | 78 <sup>b</sup> |
|          | <b>2c</b>                                                                           | <b>3c</b>                                                                           |                |               |                 |

|                 |                                                                                     |                                                                                     |           |            |                       |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|-----------------------|
| <p><b>4</b></p> |    |    | <p>25</p> | <p>110</p> | <p>60<sup>a</sup></p> |
|                 | <p><b>2d</b></p>                                                                    | <p><b>3d</b></p>                                                                    |           |            |                       |
| <p><b>5</b></p> |    |    | <p>25</p> | <p>110</p> | <p>70<sup>a</sup></p> |
|                 | <p><b>2e</b></p>                                                                    | <p><b>3e</b></p>                                                                    |           |            |                       |
| <p><b>6</b></p> |  |  | <p>25</p> | <p>110</p> | <p>80<sup>b</sup></p> |
|                 | <p><b>2f</b></p>                                                                    | <p><b>3f</b></p>                                                                    |           |            |                       |
| <p><b>7</b></p> |  |  | <p>15</p> | <p>150</p> | <p>88<sup>b</sup></p> |
|                 | <p><b>2g</b></p>                                                                    | <p><b>3g</b></p>                                                                    |           |            |                       |

|                 |                                                                                                    |                                                                                                    |           |            |                       |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|-----------------------|
| <p><b>8</b></p> |  <p><b>2h</b></p> |  <p><b>3h</b></p> | <p>15</p> | <p>150</p> | <p>65<sup>b</sup></p> |
| <p><b>9</b></p> |  <p><b>2i</b></p> |  <p><b>3i</b></p> | <p>15</p> | <p>150</p> | <p>73<sup>a</sup></p> |

<sup>a</sup> Ottenuti usando la procedura sintetica a. <sup>b</sup> Ottenuti usando la procedura sintetica b.

Al fine di implementare la resa della reazione e di ridurre ulteriormente il tempo, la strategia è stata quella di variare i parametri più facilmente accessibili quali il catalizzatore impiegato, la base e la temperatura di reazione. In tal senso per i composti **3b,3c,3f, 3g, 3h** le condizioni sintetiche hanno previsto l'impiego di

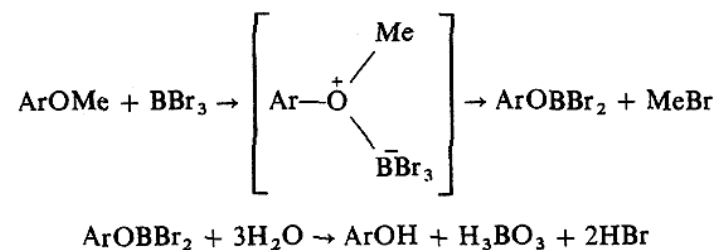
- Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> come base;
- Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub> come catalizzatore.

Le miscele di reazioni, così ottenute, sono state irradiate alle MW per un arco temporale di 15 minuti ad una temperatura di 150°C ottenendo dopo processi di purificazione un incremento significativo delle rese di reazione 60-90% (tabella **5.1**).

**Step 2: Sintesi dei derivati catecolici**

Partendo dai derivati 3,4-dimetossilati precedentemente ottenuti si è proceduti, poi, alla reazione di deprotezione dei gruppi ossidrilici mediante l'utilizzo di tribromuro di Boro, BBr<sub>3</sub>. La reazione prevede la formazione di un complesso tra il BBr<sub>3</sub> e l'ossigeno eteroatomico del gruppo metossilico

che va incontro a successiva rottura per aggiunta di H<sub>2</sub>O favorendo il rilascio del corrispettivo fenolo, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> e HBr. (Schema 5.5)

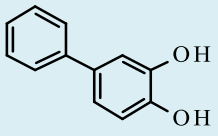
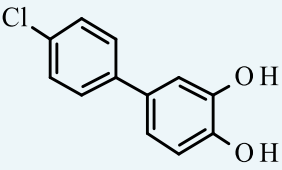
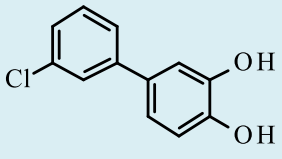


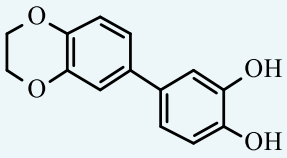
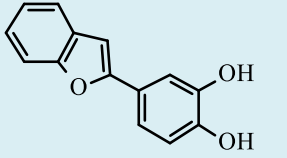
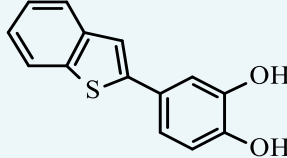
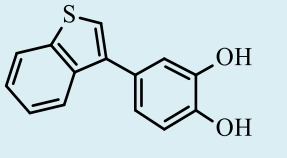
Schema 5.5 Deprotezione con BBr<sub>3</sub>

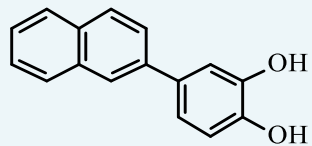
Le reazioni hanno previsto l'utilizzo di un solvente anidro quale CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in cui è stato sciolto il substrato (3a-0). L'aggiunta del BBr<sub>3</sub> è stata, poi, effettuata ad una temperatura di -15°C a cui è seguita una fase di riscaldamento a temperatura ambiente. Si noti che i tempi di reazione variano da composto a composto così come le diverse rese (tabella 5.2).



Tabella 5.2

| Prodotto                                                                                         | tempo<br>[h] | Resa<br>[%] |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|-------------|
| <br><b>4a</b>   | 3            | 65          |
| <br><b>4b</b> | 2.5          | 60          |
| <br><b>4c</b> | 6            | 55          |

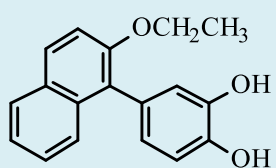
|                                                                                                  |    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| <br><b>4d</b>   | 8  | 75 |
| <br><b>4e</b>   | 16 | 65 |
| <br><b>4f</b> | 17 | 45 |
| <br><b>4g</b> | 15 | 35 |



2

62

**4h**



17

35

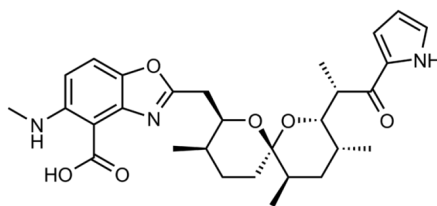
**4i**

### 5.3 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' BIOLOGICA E STUDI DI ATTIVITA' ANTIOSSIDANTE

I *tests* biologici sono stati condotti presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli studi di Jena, Germania, sotto la supervisione del Prof. Oliver Werz.

Nello specifico, i test hanno permesso di identificare la capacità inibitoria delle molecole saggiate in *maniera indiretta*, determinando la percentuale di formazione dei leucotrieni (LTB<sub>4</sub>, HPETE, ecc.) prodotti dall'enzima.

Cellule di polimorfonucleati (PMNL), vengono opportunamente trattate con l'aggiunta di 2.5  $\mu$ M di **Calcimina** (A23187, uno ionoforo del Ca<sup>2+</sup>) (Fig. 5.9), che mimando lo stimolo infiammatorio è in grado di stimolare la produzione di leucotrieni (Werz, O. 2002), promuovendo l'attivazione della cPLA<sub>2</sub> responsabile del rilascio dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana.

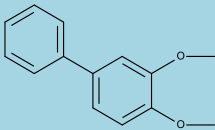
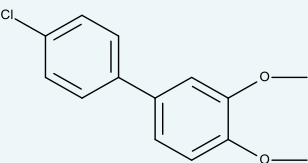
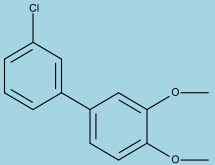
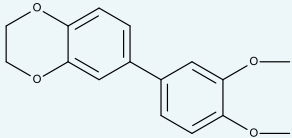


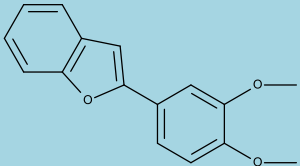
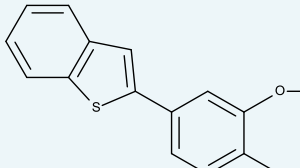
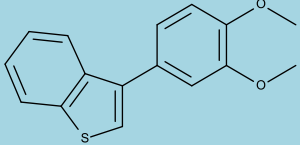
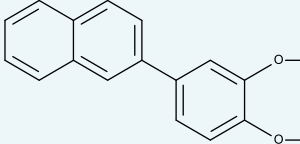
**Figura 5.9** Struttura della Calcimicina

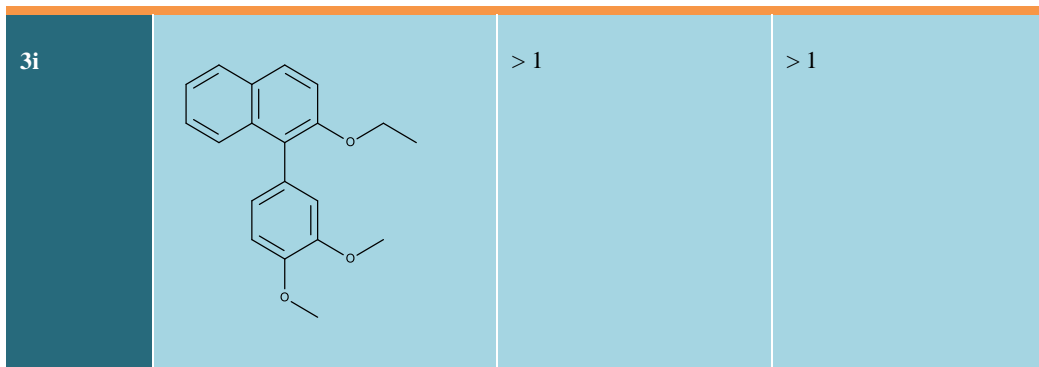
In questo tipo di saggio, la riduzione della produzione dei leucotrieni, oltre che all'inibizione della 5-LOX, potrebbe essere legata anche all'inibizione di altri enzimi coinvolti nel *pathway*, quali FLAP e/o cPLA<sub>2</sub>. Per escludere quest'ultimo evento il saggio viene condotto anche in presenza di acido arachidonico esogeno (20  $\mu$ M).

È stato, altresì, condotto un test *cell-free* su lisati cellulari di E.coli esprimenti la 5-LOX ricombinante, con lo scopo di confermare l'attività inibitoria a carico dell'enzima.

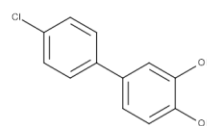
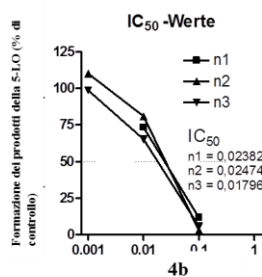
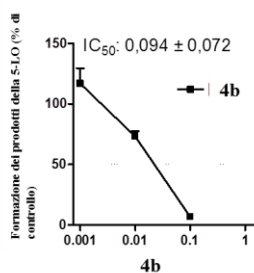
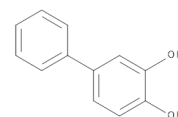
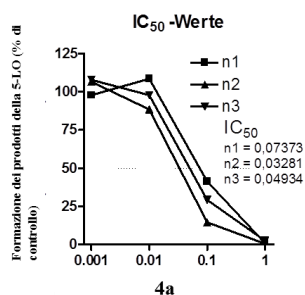
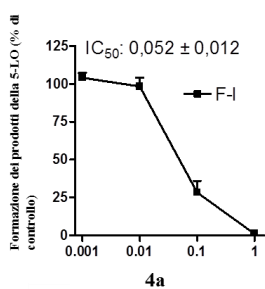
La prima indagine si è focalizzata sulla serie degli intermedi veratrolici **3a-i** determinando i valori di inibizione in entrambi i saggi cellulari.

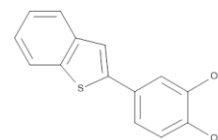
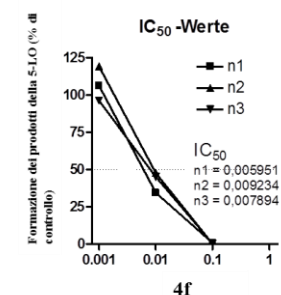
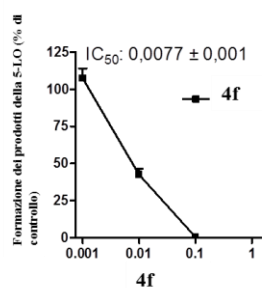
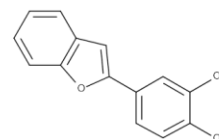
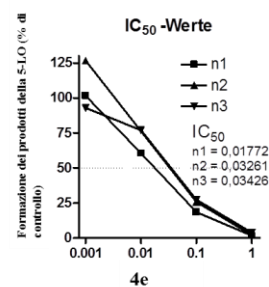
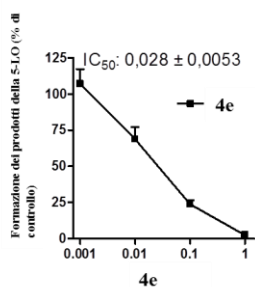
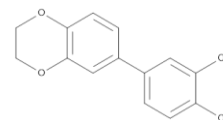
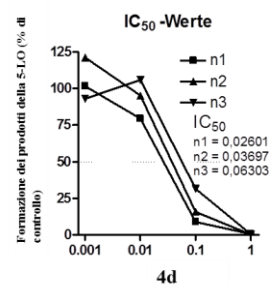
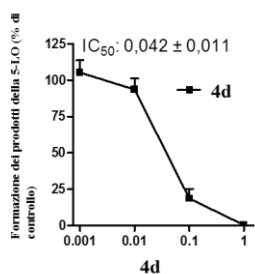
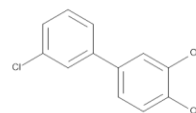
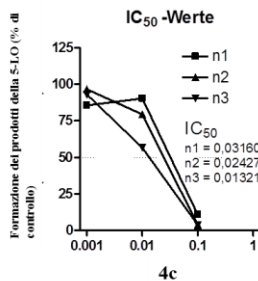
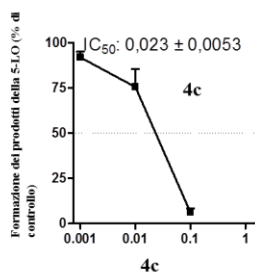
| NOME | STRUTTURA                                                                           | IC <sub>50</sub> (PMNL)  | IC <sub>50</sub> (μM PMNL) |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|----------------------------|
|      |                                                                                     | A231787 2.5 μM+ 20 μM AA | A231787 2.5 μM             |
| 3a   |    | > 1                      | > 1                        |
| 3b   |   | > 1                      | > 1                        |
| 3c   |  | > 1                      | > 1                        |
| 3d   |  | > 1                      | > 1                        |

|    |                                                                                     |     |     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 3e |    | > 1 | > 1 |
| 3f |    | > 1 | > 1 |
| 3g |  | > 1 | > 1 |
| 3h |  | > 1 | > 1 |

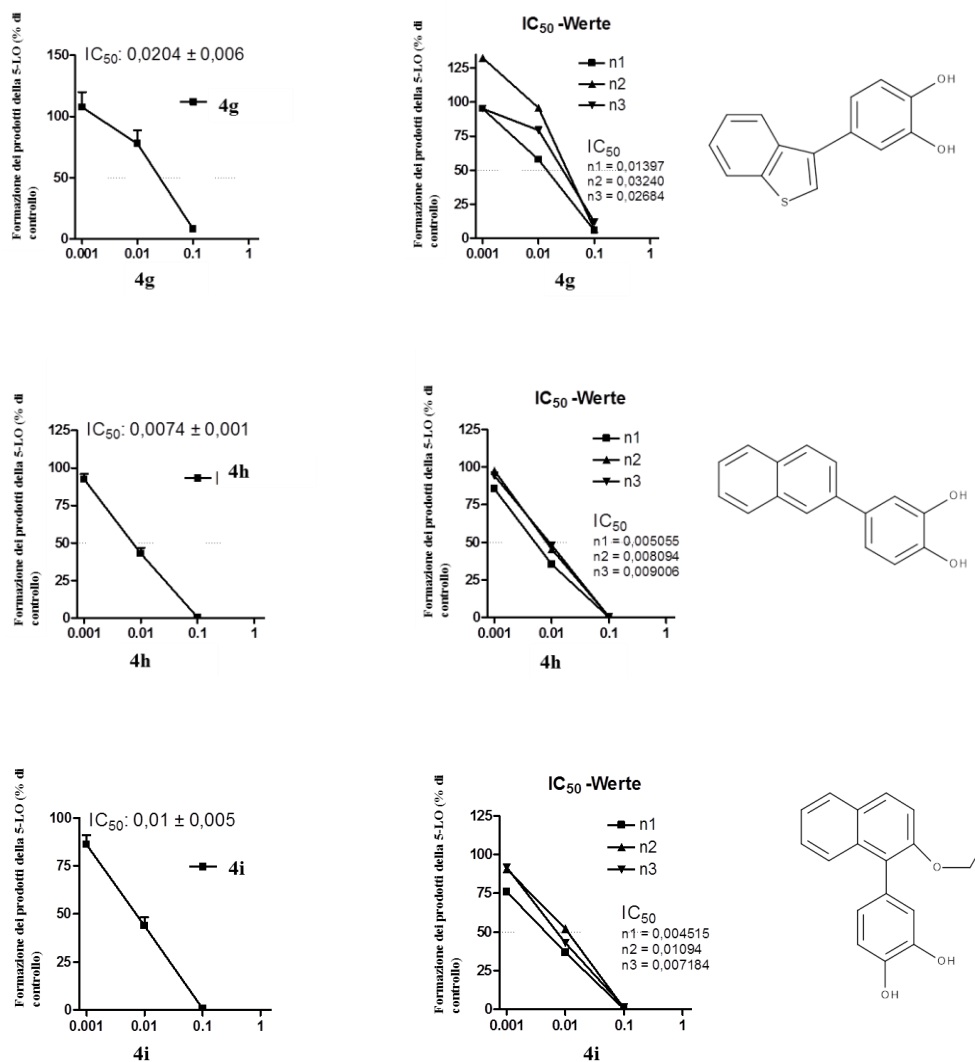


Nessuno dei composti della serie veratrolica si è dimostrato in grado di espletare un'adeguata attività inibitoria a carico dell'enzima. Si è pertanto giunti alla conclusione che il nucleo catecolico sia fondamentale ai fini dell'attività. Tesi confermata dai dati relativi ai test cellulari e *cell-free* condotti sulla serie **4a-i** dei quali vengono mostrati i grafici relativi all'attività inibitoria in test *cell-free* ed una successiva tabella comprendente anche i dati del test su *PMNL*.



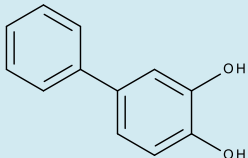
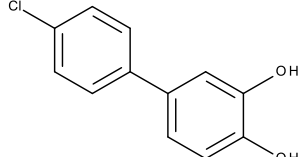
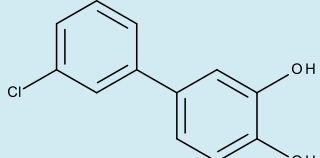
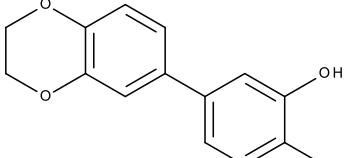
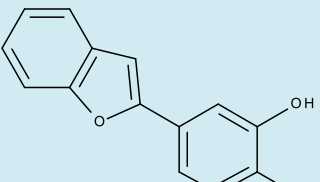
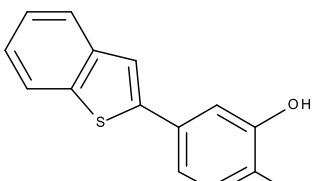


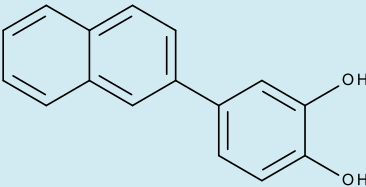
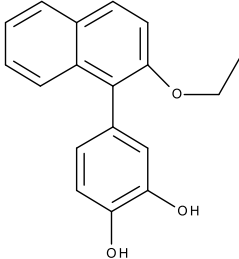




**Figura 5.10** Grafici relativi all'attività inibitoria della molecole della serie 4a-j riportanti la percentuale di formazione dei prodotti enzimatici della 5-LOX in funzione della concentrazione di prodotto impiegata (espressa in  $\mu\text{M}$ )

**Tabella 5.3**

| NOME      | STRUTTURA                                                                           | IC <sub>50</sub><br>Cell<br>free | IC <sub>50</sub> (PMNL)<br>A231787 2.5<br>μM+ 20 μM AA | IC <sub>50</sub> ( μM<br>PMNL)<br>A231787<br>2.5 μM |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>4a</b> |    | 0.052 ±<br>0.01                  | 0.920 ±<br>0.001                                       | 0.427                                               |
| <b>4b</b> |    | 0.0936 ±<br>0.007                | 0.444 ±<br>0.006                                       | 0.299                                               |
| <b>4c</b> |   | 0.0936±<br>0.0053                | 0.335±<br>0.01                                         | 0.231                                               |
| <b>4d</b> |  | 0.0420<br>± 0.011                | 0.498±<br>0.02                                         | 0.264                                               |
| <b>4e</b> |  | 0.0282±<br>0.0053                | 0.398±<br>0.05                                         | 1.4867                                              |
| <b>4g</b> |  | 0.0077±<br>0.006                 | 0.153±<br>0.006                                        | 0.179                                               |

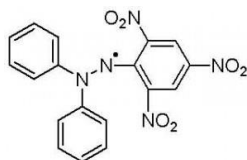
|                                                                                                    |                          |                         |              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------|
| <p><b>4h</b></p>  | <p>0.0074±<br/>0.001</p> | <p>0.322±<br/>0.015</p> | <p>0.251</p> |
| <p><b>4i</b></p>  | <p>0.0103±<br/>0.005</p> | <p>0.403±<br/>0.05</p>  | <p>0.287</p> |

Dai saggi preliminari condotti si evince come la maggior parte dei composti sintetizzati espleta una potente azione inibitoria a carico dell'enzima tal quale con valori di IC<sub>50</sub> compresi fra 7nM (composto **4g** e **4h**) e 94nM (composto **4b** e **4c**). Per quanto concerne gli altri derivati catecolici sintetizzati i valori di IC<sub>50</sub> calcolati variano tra 200 e 500 nM. Si deve pertanto constatare come l'introduzione del nucleo catecolico rispetto al nucleo resorcinolico sia vantaggiosa ai fini dell'attività.

Per quanto concerne, invece, la natura del sostituente arilico in posizione 4 del nucleo catecolico, non è possibile giungere ad una completa SAR tenendo conto del fatto che gli studi (sia di sintesi che di valutazione dell'attività biologica) sono attualmente in corso.

I composti sintetizzati sono stati sottoposti anche a test di attività antiossidante FRAP e DPPH presso il CNR di Avellino, sotto la supervisione della professoressa Filomena Nazzaro.

Il test DPPH prevede l'impiego del 2,2-difenil-1-picrilidrazile (**DPPH**)



è un radicale azotato molto stabile e disponibile in commercio, caratterizzato da un'intensa colorazione rosso porpora, che decolora quando viene ridotto in presenza di una molecola dotata di capacità antiossidante. Mediante misurazione spettrofotometrica a 517 nm della variazione di

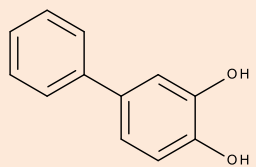
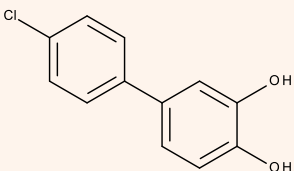
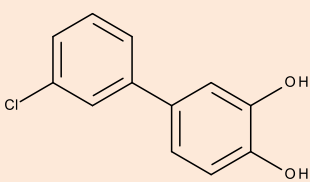
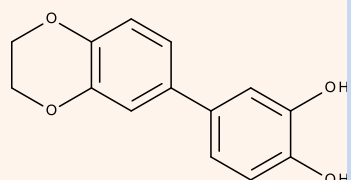
assorbanza della soluzione di DPPH dopo reazione con un composto antiossidante, è possibile quantificare la capacità riducente della sostanza in esame sia che essa agisca con trasferimento di idrogeno che per cessione di elettroni. Il risultato viene generalmente espresso come EC50, cioè la quantità di antiossidante in grado di ridurre del 50% la concentrazione iniziale di DPPH

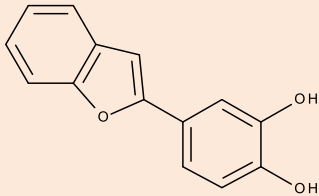
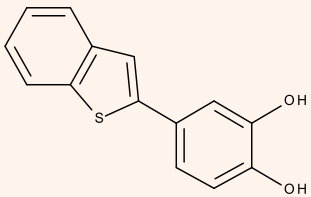
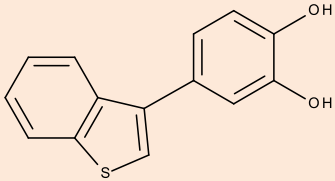
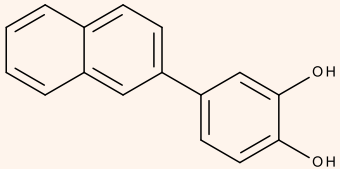
**Più è basso il valore dato, maggiore è la potenza antiossidante del prodotto.**

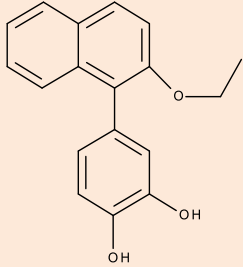
Il test **FRAP** misura la capacità riducente degli antiossidanti nei confronti degli ioni Ferro. Si tratta di un metodo basato sul trasferimento di elettroni, in cui gli ioni ferro passano da Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>. In determinate condizioni di pH (3,6) e in presenza di TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), tali ioni formano dei complessi con caratteristiche diverse, in particolare il derivato ridotto (Fe<sup>2+</sup>-TPTZ) assume una colorazione blu che presenta un assorbimento massimo a 593 nm misurabile per via spettrofotometrica. Questo saggio è in grado di misurare solamente l'abilità riducente del composto in esame nei confronti dello ione ferrico.

**Più è alto il valore dato, maggiore è la potenza riducente del prodotto**

Tabella 5.4

| NOME | STRUTTURA                                                                           | DPPH<br>(mM/mL) | DS       | FRAP<br>(mM/L) | DS       |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------|----------------|----------|
| 4a   |    | 0.464517        | 0,063717 | 0.186335       | 0,029813 |
| 4b   |   | 0.647905        | 0,15457  | 0,563665       | 0,094720 |
| 4c   |  | 0.741275        | 0,169629 | 0.613975       | 0,082298 |
| 4d   |  | 0.710231        | 0,146584 | 0.070497       | 0,012112 |

|           |                                                                                     |          |          |          |          |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
| <b>4e</b> |    | 0,494058 | 0,072771 | 0,457143 | 0,049689 |
| <b>4f</b> |    | 0,694966 | 0,127552 | 0,343789 | 0,058696 |
| <b>4g</b> |  | 0,79079  | 0,046762 | 0,650311 | 0,086335 |
| <b>4h</b> |  | 0,53484  | 0,120114 | 0,369255 | 0,156211 |

|    |                                                                                   |         |         |          |          |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|----------|----------|
| 4i |  | 0.36894 | 0,01918 | 0,974224 | 0,159938 |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------|---------|---------|----------|----------|

Pur dimostrandosi composti particolarmente promettenti va precisato che i derivati sono attualmente associati a fenomeni di *tossicità cellulare*, da test condotti presso il Dipartimento di medicina Sperimentale della SUN. Da dati preliminari si evince che per alcuni dei composti testati si è evidenziata una certa tossicità. Si attendono, pertanto, i risultati di questi ultimi test al fine di optare per opportune modifiche strutturali che arginino questa possibile problematica.

## 5.4 PARTE SPERIMENTALE

### Sezione Chimica

#### *Materiali e metodi*

Tutti i reagenti sono di grado analitico e acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano- Italia). Tutti gli esperimenti di irradiazione alle microonde sono stati effettuati in un apparato Microwave Initiator + Biotage®. Le reazioni sono state condotte in tubi di vetro vessel da 10 mL, sigillati con tappo di Teflon, esposti a temperature di 250 °C e a una pressione interna di 20 bar. Dopo il periodo di irraggiamento il recipiente di reazione è stato raffreddato rapidamente a temperatura ambiente mediante un getto di aria compressa. La purificazione mediante Flash cromatografia è stata eseguita utilizzando gel di silice Carlo Erba 60 (230-400 mesh; Carlo Erba, Milano, Italia). Le TLC sono state effettuate utilizzando piastre rivestite con gel di silice 60 F254 acquistati dalla Merck ( Darmstadt, Germania). Le rese delle reazioni si riferiscono ai prodotti puri cromatograficamente e spettroscopicamente. Gli spettri NMR sull' <sup>1</sup>H sono stati effettuati su un AC 300 Bruker. I *chemical shifts* sono riportati in ppm rispetto al tetrametilsilano.

#### **Procedura generale per la sintesi, palladio-catalizzata, dei derivati 1-aril-3,4 dimetossibenzenici (3a, 3d, 3e, 3i,) metodo a**

4-bromo-1,2 dimetossibenzene **1** (0.100g, 1.0 equiv.), acido arilboronico (1.2 equiv.) e PdCl<sub>2</sub> (dppf) (5%mol) sono stati disciolti in etanolo al 96% in una vessel di reazione di 10 mL contenente un magnete per l'agitazione. Successivamente è stato aggiunto K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.0 equiv.) e la vessel è stata sigillata ermeticamente con un tappo in Teflon®. La miscela è stata irradiata per 25 minuti ad una temperatura preselezionata di 110°C e con una potenza di irradiazione di 60 W. Dopo la reazione, la vessel è stata raffreddata a 50 °C mediante un getto di aria compressa.

La miscela grezza è stata quencheda mediante l'aggiunta di una miscela di etil acetato e acqua (13 mL di ognuno). Le due fasi sono state separate e la fase acquosa è stata estratta più volte con etil acetato (3x 13mL). Le fasi organiche riunite sono state anidricate con sodio solfato anidro, filtrate e poi concentrate al rotavapor. I grezzi di reazione sono stati purificati mediante flash cromatografia su gel di silice.

#### ***1-fenil- 3,4 dimetossibenzene (3a)***



Il composto **3a** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2 dimetossibenzene **1** (1.0equiv.) e dall'acido fenil boronico **2a** (1.2 equiv.). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (da 90: 10 a 70:30)]. Resa: 90%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 3.94 (s, 3H); 4.00 (s, 3H); 7.0 (d, 1 H, J = 7.9 Hz), 7.2 (m, 3H), 7.4 (m, 2H), 7.6(d, 2 H, J = 7.9 Hz).

**2,3-diidro-6-(3,4-dimetossifenil)benzo[b][1,4]diossina (3d)**

Il composto **3d** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2 dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido 2,3-diidrossibenzo[b][1,4]diossina 6 boronico **2d** (1.2 equiv). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)]. Resa: 60% <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ (ppm) = 3.98 (s, 3H), 3.99 (s, 3H), 4.25-4.45 (m, 4H), 6.99- 7.01( m, 2H), 7.11-7.19 (m , 4H)

**2-(3,4-dimetossifenil)benzofurano (3e)**

Il composto **3e** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido benzofuran-2-boronico **2e** (1.2 equiv.). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)]. Resa: 70%

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 3.94 (s, 3H), 4.00 (s, 3H), 6.92 (s, 1H), 6.95 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.21-7.24 (m, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.44 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.51 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.55 (d, 1H, J = 7.9 Hz).

**2-etossi-1-(3,4 dimetossifenil)naftalene (3i)**

Il composto **3i** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido etossi naftalene 1 -boronico **2i** (1.3 equiv.). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 73%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 1.4(t, 3H, J = 7.34 Hz), 3.9(s, 3H), 4.0(s, 3H), 4.2(q, 2H, J=7.34 Hz), 6.92-7.03 (m, 3H), 7.30-7.50 (m, 3H), 7.6(m, 1H), 7.8-8.02 (m, 2H)

**4-(1,2-dimetossifenil)benzo[b]tiofene (3n)**

Il composto **3n** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido dibenzotiofene 2-2 boronico **2n** (1.2 equiv.). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 73% <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 4.00 (s, 6H), 7.0 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.4 (m, 1H), 7.4-7.6 (m, 4H), 7.9 (m, 1H), 8.1 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 8.2 (m, 1H).

**1-(4-Dibenzofuranil)-3,4-dimetossibenzene (3o)**

Il composto **3o** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2-dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido **2o** (1.2 equiv.) 4-dibenzofuran boronico. Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 78%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 3.83 (s, 3H), 3.91 (s, 3H), 6.92 (d, 1H, J=8.1 Hz), 7.22 (m, 1H), 7.4-7.55 (m, 4H), 7.8 (m, 1H), 7.98 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 8.2 (m, 1H).

**Procedura generale per la sintesi, palladio-catalizzata, dei derivati 1-aril-3,4 dimetossibenzenici (3b, 3c, 3f, 3g, 3h) metodo b**

4-bromo-1,2 dimetossibenzene **1** (0.100g, 1.0 equiv.), acido arilboronico (1.2 equiv.) e tetrakis (trifenilfosfina)palladio(0) (5% mol) sono stati disciolti in etanolo al 96% (2mL) in una vessel di 10 mL contenenti un magnete per l'agitazione. Successivamente è stato aggiunto Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.0 equiv.) e la vessel è stata sigillata ermeticamente con un tappo di Teflon®. La miscela è stata irradiata per 15 minuti ad una temperatura prelezionata di 150°C e con una potenza di irradiazione di 100 W. Dopo la reazione, la vessel è stata raffreddata a 50 °C mediante un getto di gas.

La miscela grezza è stata quencheda mediante l'aggiunta di una miscela di etil acetato e acqua (13 mL di ognuno). Le due fasi sono state separate e la fase acquosa è stata estratta più volte con etil acetato (3x 13mL). Le fasi organiche riunite sono state anidificate con sodio solfato anidro, filtrate e poi concentrate al rotavapor. I grezzi di reazione sono stati purificati mediante flash cromatografia su gel di silice.

**1-(4-clorofenil)-3,4-dimetossibenzene (3b)** Il composto **3b** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido 4 clorofenil boronico **2b** (1.3 equiv.). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 83%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 3.9(s, 3H), 4.0 (s, 3H), 6.9 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.0(s, 1H), 7.1 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.4 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 7.5 (d, 2H, J = 8.1 Hz).

**1-(3-clorofenil)-3,4-dimetossibenzene (3c)**

Il composto **3c** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido 3 clorofenil boronico **2c** (1.3 equiv.).

Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa : 78%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) =3.9 (s, 3H), 4.0 (s, 3H), 6.9 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.01 (s, 1H), 7.2 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.3 (s, 1H), 7.4 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.45(d,1H, J = 8.1 Hz), 7.6 (s,1H).

#### **2-(3,4-dimetossifenil)benzo[b]tiofene (3f)**

Il composto **3f** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido benzo[b]tiofene2-boronicico **2f**(1.2 equiv.). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)]. Resa:61% <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) =3.9 (s,3H), 4.0 (s, 3H), 6.9 (d, 1H J = 8.1 Hz), 7.3 (m,4H), 7.5(s,1H), 7.6 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.8 (d, 1H, J = 7.9 Hz).

#### **3-(3,4-dimetossifenil)benzo[b]tiofene (3g)**

Il composto **3g** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido benzo[b]tiofene-3-boronicico **2g** (1.3 equiv.). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 88%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 3.9(s,3H), 4.0(s,3H), 6.9 (d, 1H J = 8.1 Hz), 7.3 (m, 2H), 7.35- 7.54 (m,3H), 7.82-8.10 (m, 2H).

#### **2-(3,4-dimetossifenil) naftalene (3h)**

Il composto **3h** è stato sintetizzato dal 4-bromo-1,2dimetossibenzene **1** (1.0 equiv.) e dall'acido naftalene2 -boronicico **2h** (1.3 equiv.). Colonna cromatografica [eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 65%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) =3.9(s,3H), 4.0(s,3H), 6.9 (d, 1H J = 8.1 Hz), 7.3 (m, 2H), 7.35- 7.54 (m,3H), 7.82-8.10 (m, 3H) 7.89 (s, 1H).

#### **Procedura generale per la sintesi dei derivati 1-aril-3,4 benzenediolici: reazione di demetilazione in presenza di BBr<sub>3</sub> (4a-i)**

Ad una soluzione di derivati aril 3,4-dimetossibenzenici (1.0 equiv.) in diclorometano anidro (12 mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di BBr<sub>3</sub> in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (8.8 equiv.) per un ora a -15 °C. La miscela è stata portata a temperatura ambiente lentamente e mantenuta a questa temperatura per tempi differenti per i diversi composti (monitoraggio attraverso TLC) e quencheda con acqua ghiacciata (15mL). Il diclorometano è stato separato e la fase acquosa è stata lavata con dietil etere (15 mL x 2). La fase organica è stata poi anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e il solvente rimosso a pressione ridotta. Infine, i composti grezzi sono stati purificati mediante flash cromatografia su gel di silice.

***1-fenil-3,4-benzenediolo (4a)***

Tempo di reazione : 3 ore. Colonna cromatografica :[Eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 65%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) =3.1(s,1H), 5.0(s,1H), 6.9(d,1H, J=8.1 Hz), 6.95(d,1H J=8.1 Hz), 7.1(s,1H), 7.2(m,1H), 7.3(m,2H), 7.5(m,2H) <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 114.7, 117.8, 121.9,127.6, 127.7, 128.0, 128.1, 137.0, 147.0, 149.0

***1-(4-clorofenil)-3,4-benzenediolo (4b)***

Tempo di reazione : 2.5 ore. Colonna cromatografica :[Eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 60%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) =3.1(s,1H), 5.0(s,1H), 6.8(m,1H), 6.9(m,1H), 7.0(s,1H), 7.4(m,2H), 7.5(m,2H) <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 114.7, 119.0, 122.0, 130.0, 130.2, 130.5, 131.4, 131.8, 134.0, 135.5, 147.0, 148.0

***1-(3-clorofenil)-3,4-benzenediolo (4c)***

Tempo di reazione : 6 ore. Colonna cromatografica :[Eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 55%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) =2.0(s,2H), 6.9(d,1H J=8.1 Hz), 7.1(d,1H J=8.1 Hz), 7.2(s,1H), 7.3(d,1H J=8.1 Hz), 7.4(m,1H), 7.5(d, 1H J=8.1 Hz), 7.6(s, 1H) <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 115.0, 118.0, 121.0,126.0, 128.1, 128.9, 130.7, 131.0, 135.0, 139.0, 146.2, 148.0

***4-(2,3-diidrobenzo[b][1,4]diossin-6)benzene-1,2 diolo (4d)***

Tempo di reazione : 8 ore. Colonna cromatografica :[eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa 75%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) =4.2(s,4H), 6.7(d, 1H J=8.1 Hz), 6.8(m,2H), 7.0(m,3H) <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 65.0, 65.3, 113.0, 115.0, 121.0, 122.0, 127.0, 129.0,132.0, 133.0, 146.0, 146.9, 149.0, 151.0

***4-(benzofurano-2-)benzene-1,2 diolo (4e)***

Tempo di reazione : 16 ore. Colonna cromatografica :[eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 65%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 6.92 (s, 1H), 6.95 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.21-7.24 (m, 2H), 7.38 (s, 1H), 7.44 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.51 (d, 1H, J = 7.9 Hz), 7.55 (d, 1H, J = 7.9 Hz). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 103.0,111.0, 112.0, 115.8, 121.0, 122.0, 124.0, 125.0, 125.2, 125.4, 149.0, 151.0, 156.0, 157.0

***4-(benzo[b]tiofene -2-)benzene-1,2 diolo (4f)***

Tempo di reazione : 16 ore. Colonna cromatografica :[eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 45%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) =3.2(s,1H), 4.9(s,1H), 6.9(m,1H), 7.1(m,1H), 7.2(s,1H), 7.3(m,2H), 7.4(s, 1H), 7.6-8.0(m,2H)

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 113.0, 115.9, 120.0, 122.0, 123.0, 124.0, 125.9, 126.0, 127.5, 141.0, 142.0, 146.0, 150.3, 151.0

***4-(benzo[b]tiofene -3-)benzene-1,2 diolo (4g)***

Tempo di reazione : 15 ore. Colonna cromatografica :[eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 35%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 6.9 (d, 1H J = 8.1 Hz), 7.3 (m, 2H), 7.35- 7.54 (m,3H), 7.82-8.10 (m, 3H) 7.89 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 113.0, 116.0, 121.0, 123.0, 123.2, 124.3, 125.0, 125.6, 130.0, 139.0, 143.0, 144.0, 150.0, 152.0

***4-(naftalen-7-)benzene-1,2-diolo (4h)***

Tempo di reazione : 2 ore. Colonna cromatografica :[eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 62%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 6.9 (d, 1H J = 8.1 Hz), 7.3 (m, 2H), 7.35- 7.54 (m,3H), 7.82-8.10 (m, 3H) 7.89 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 113.5, 116.8, 123.0, 125.0, 126.2, 126.6, 126.7, 128.1, 128.4, 130.0, 132.0, 133.0, 134.5, 135.0, 148.6, 153.0

***4-(2 etossinaftalene-1-)benzene-1,2-diolo (4i)***

Tempo di reazione : 17 ore. Colonna cromatografica :[eluizione con esano/etilacetato (90:10)] Resa: 35%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) δ (ppm) = 1.4(t, 3H, J = 7.34 Hz), 4.2(q,2H, J=7.34 Hz), 6.92-7.03 (m,3H), 7.30-7.50 (m,3H), 7.6(m,1H), 7.8-8.02 (m,2H) <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 15.0, 66.0, 113.0, 118.0, 120.8, 122.0, 122.2, 125.0, 125.6, 127.0, 128.0, 128.9, 129.0, 130.1, 130.5, 130.8, 135.0, 149.0, 151.0, 159.0

**Sezione biologica**

***Culture cellulari***

I PMNL umani sono stati isolati da concentrati di leucociti ottenuti al St. Markus Hospital (Francoforte, Germania). In breve, un'aliquota di sangue venoso (prelevata da donatori adulti sani) è stata sottoposta a centrifugazione a 4000g per 20 minuti ad una temperatura di 20 °C per recuperare i leucociti concentrati. I PMNL sono stati, poi, prontamente isolati per sedimentazione con destrano,

centrifugazione (Laboratori PAA, Linz, Austria), e lisi ipotonica degli eritrociti. I PMNL ( $7.5 \cdot 10^6$  cellule/mL; purezza > 96-97%) sono stati infine risospesi in un "buffer" salino contenente fosfato con un pH 7,4 (PBS) seguiti dall'aggiunta 1 mg/ml di glucosio.

***Determinazione della formazione dei prodotti della 5-Lipossigenasi in cellule intatte***

Per le analisi in cellule intatte, un quantitativo di  $10^7$  PMNL è stato risospeso in 1 mL di PBS addizionato con 1 mg/mL di glucosio e 1 mM di  $\text{CaCl}_2$ . Dopo la preincubazione con i composti indicati (a  $37^\circ\text{C}$ ), la formazione dei prodotti della 5-LOX è stata avviata dall'aggiunta di  $2,5 \mu\text{M}$  dello ionoforo A23187 con o senza AA  $20 \mu\text{M}$ , come indicato. Dopo 10 min a  $37^\circ\text{C}$ , la reazione è stata bloccata con 1 mL di metanolo, e  $30 \mu\text{L}$  1 N HCl, 200 ng di prostaglandina B1 e  $500 \mu\text{L}$  di PBS sono stati ulteriormente addizionati. I metaboliti della 5-LOX formati sono stati estratti e analizzati mediante HPLC e la loro quantità è espressa in ng di prodotto per  $10^6$  cellule. Tra quelli identificati ricordiamo LTB4 e i suoi *all-trans* isomeri: l'acido 5(S),12(S)-diidrossi-6-10-*trans*-8,14-*cis*-eicosatetraenoico (**5(S),12(S)-DiHETE**), e l'acido 5(S)-idro(pero)ssi-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraenoico (**5-H(p)ETE**). I Cisteinil-LT (LTC4, D4 e E4) non sono stati rilevati e prodotti di ossidazione di LTB4 non sono stati determinati.

***Espressione, purificazione della 5-LOX ricombinante umana proveniente da E. coli, e determinazione dell'attività residua della LOX in test cell-free***

La Trasformazione di E. coli BL21 con il plasmide pT3-5LO così come l'espressione e la purificazione della 5-LOX ricombinante sono stati condotti secondo modelli riportati in letteratura (vedi ref 19 articolo indoli). La 5-LOX purificata è stata immediatamente impiegata per il saggio di attività inibitoria. Pertanto,  $0,5 \mu\text{g}$  di enzima purificato sono stati diluiti mediante PBS/EDTA (volume finale di 1 ml) e pre-incubati con i derivati di interesse. Dopo 5-10 min a  $4^\circ\text{C}$  i campioni sono stati pre-riscaldati per 30s a  $37^\circ\text{C}$ . Fatto ciò, 2mM di  $\text{CaCl}_2$  ed l'adeguato apporto di AA vengono addizionati ai campioni per permettere la formazione dei prodotti della 5-LOX. Dopo il tempo di 10min a  $37^\circ\text{C}$  la reazione è stoppata ed addizionata di 1ml di metanolo raffreddato in ghiaccio, permettendo l'analisi dei metaboliti mediante HPLC.



**CAPITOLO VI**

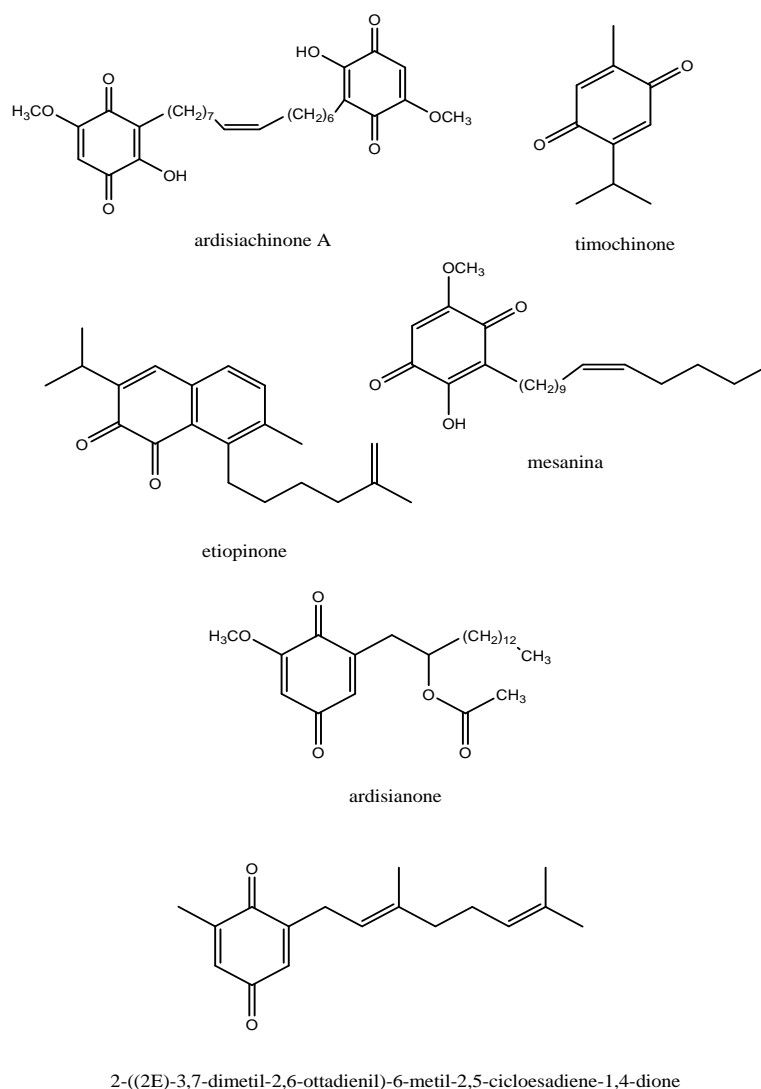
**PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI DERIVATI A NUCLEO  
CHINONICO**

## 6.1 PRESUPPOSTI SCIENTIFICI E SCOPO DELLO STUDIO

### 6.1.1 INIBITORI DELLA 5-LIPOSSIGENASI DI NATURA CHINONICA

I composti che possiedono il nucleo 1,4-benzochinone sono stati a lungo riportati come potenti inibitori della 5-lipossigenasi (Yoshimoto *et al.*, 1982) (**fig.6.1**). All'interno della cellula la funzione chinonica viene ridotta a idrochinone che ha la capacità di ridurre il ferro del sito attivo dell'enzima, suggerendo che sia appunto il carattere riducente di questi composti responsabile dell'inibizione della 5-LOX (Ohkawa *et al.*, 1991). Ad ogni modo va sottolineato che, come per gli altri composti naturali già discussi, la potenza dei chinoni non dipende soltanto dalle proprietà riducenti ma anche dalle loro caratteristiche lipofile, che influenzano l'attraversamento della membrana cellulare e di conseguenza il raggiungimento del target. I primi inibitori della 5-lipossigenasi a struttura chinonica provenivano dal rizoma della pianta *Ardisia japonica*, si tratta di ardisianone, ardisiachinone A, B, D, E, F e mesanina (Fukuyama *et al.*, 1993). **La mesanina**, si è rivelata un potente inibitore della 5-LOX ( $IC_{50}=0,7\mu M$  in studi cellulari). L'**ardisiachinone A**, al contrario, pur essendo il più potente derivato chinonico attivo nei confronti dell'enzima purificato ( $IC_{50}=0,2\mu M$ ), è risultato essere meno efficiente nel saggio cellulare ( $IC_{50}=5,56\mu M$ ) (Fukuishi *et al.*, 2001). Un composto che sembrerebbe molto interessante è il **2-((2E)-3,7-dimetil-2,6-ottadienil)-6-metil-2,5-cicloesadiene-1,4-dione** proveniente da *Atractylodes lancea* (Resch *et al.*, 2001) che mostra un valore di  $IC_{50}=0,2\mu M$  in cellule intatte, anche se mancano ancora dati validi provenienti dagli studi *cell-free*. Buoni risultati in tutti e due i sistemi di analisi sono stati ottenuti per il **timochinone**, estratto da *Nigella sativa*, un para-chinone che manca di residui lipofili pronunciati ( $IC_{50}=2,3\mu M$  in test in cellula e  $3\mu M$  sulla 5-LOX purificata) e l'orto-chinone **etiopinone** estratto dalla *Salvia aethiopsis* ( $IC_{50}=0,2\mu M$  in cellula e  $0,11\mu M$  sulla 5-LOX purificata). Entrambi i composti si sono rivelati in grado di sopprimere la 5-LOX in leucociti attivati con efficacia comparabile (Benrezzouk *et al.*, 2001). Analisi più dettagliate sull'azione del timochinone hanno messo in evidenza che, oltre ad inibire la 5-LOX, esso blocca anche l'attività della  $LTC_4$  sintasi, sebbene meno efficacemente (Mansour *et al.*, 2004). Per quanto riguarda l'etiopinone, questo inibisce la  $PLA_2$  sinoviale, ma non mostra effetti sugli enzimi COXs. Studi condotti nel topo sull'ardisiachinone A, hanno rivelato che esso è in grado di prevenire l'ischemia indotta dall'aumento dei livelli di  $LTB_4$  nel fegato (Matsui *et al.*, 2005).





**Figura 6.1** Inibitori chinonici della 5-LOX

Recenti studi in vitro condotti sulla struttura cristallografica della 5- LOX umana, suggeriscono che il *benzochinone primin* e il *timoidrochinone* ( $IC_{50} = 4.0$  e  $4.1 \mu M$  rispettivamente) mostrano un' attività comparabile a quella dello *zileuton* ( $IC_{50} = 4.1 \mu M$ ). (*K.Gong et al,2011*). Invece , per il naftochinone *shikonina* ( $IC_{50} = 24.3 \mu M$ ) è stata osservata una moderata attività, che diminuisce ulteriormente per l'antrachinone *emodina* e per il naftochinone *plumbagina* ( $IC_{50} = > 50 \mu M$ ) (**fig.6.2**). Ciò sta ad indicare che, nonostante il potenziale redox costituisca un fattore molto importante per l'attività dei chinoni, nel caso della 5- LOX la struttura delle molecole gioca un ruolo

vitale nell'inibizione. Da tali dati discende inoltre che il *benzochinone primin* si configura come un composto di rilevante interesse per lo sviluppo di nuovi inibitori della 5-LOX.

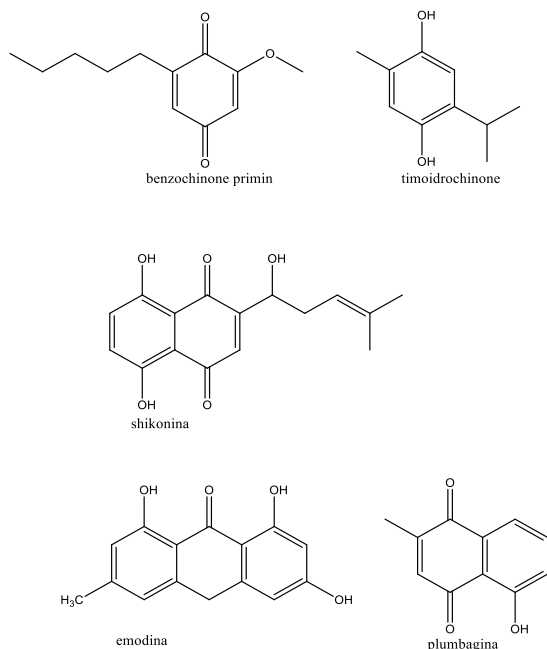


Figura 6.2 Composti chinonici come nuovi inibitori della 5-LOX

### 6.1.2 SCOPO DELLO STUDIO

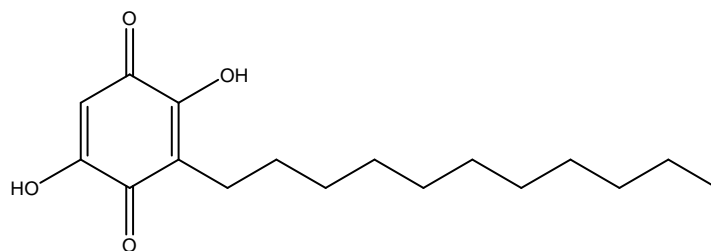
Quanto riportato nel precedente paragrafo mostra come i composti chinonici occupino una posizione di rilievo nell'inibire l'attività della 5-LOX.

Sulla base di ciò, il gruppo di ricerca a cui ho aderito presso i laboratori del CENTRO GRANDI APPARECCHIATURE della Seconda Università degli Studi di Napoli, sotto la supervisione del Prof. De Rosa e della Prof. Filosa, si è occupato negli ultimi anni, di un progetto che ha come finalità l'ottenimento di nuovi composti a struttura chinonica capaci di inibire efficientemente la 5-lipossigenasi.

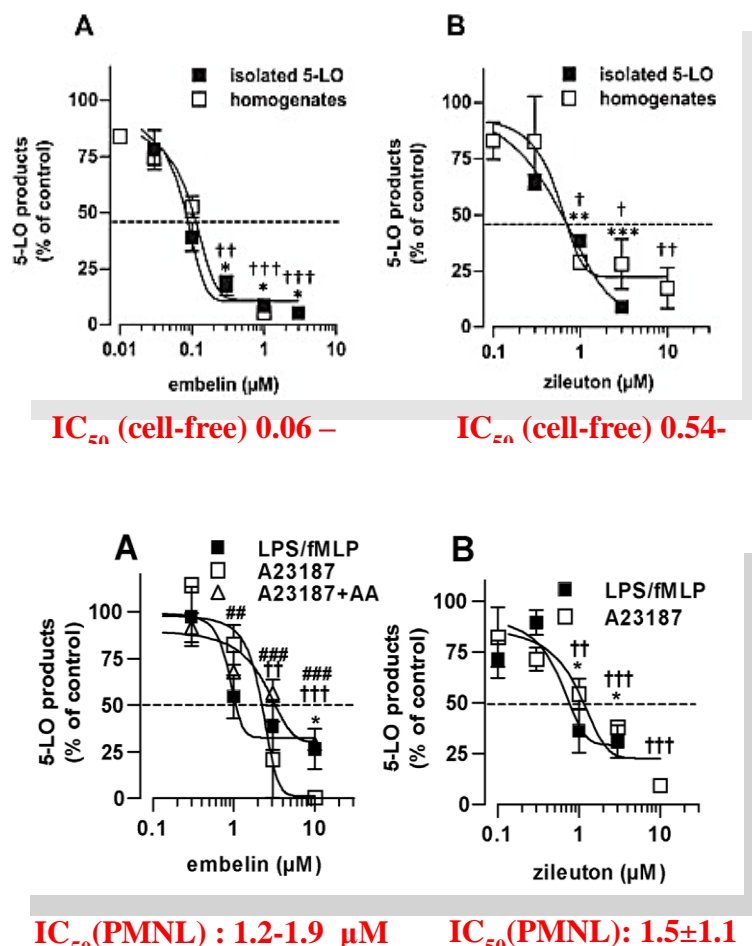
A tal proposito è stato messo in evidenza che l'*Embelina* (fig. 6.3), un composto naturale, estratto dalle piante di *Embelia ribes*, già noto per le sue proprietà antitumorali, antinfiammatorie e antimicrobiche, è in grado di interferire con il metabolismo dell'acido arachidonico, bloccando l'attività sia della 5-LOX che della mPGES-1 con IC<sub>50</sub> = 0.06 e 0.2 μM rispettivamente, senza

interferire con l'azione delle 12-,15LOX, della cPLA2 e delle COX (Schaible *et al.*, 2013, Filosa *et al.* 2013).

Strutturalmente l'embelina presenta un nucleo 2,5-diidrossibenzochinonico legato in posizione 3 ad una catena satura a 11 atomi di carbonio.



**Figura 6.3** *Struttura dell'Embelina*



**Figura 6.4.** Percentuale di formazione dei prodotti della cinque lipossigenasi a seguito della somministrazione di dosi crescenti di embelina sia in test cellulari su PMNL che su test cell-free. Vengono anche riportati i valori di IC<sub>50</sub> relativi ad entrambi i saggi. Da confrontare con l'inibitore commerciale zileuton.

È stato riscontrato inoltre che tale inibizione:

- È essenzialmente reversibile dopo *wash-out*
- Non diminuisce ad elevate concentrazioni di substrato

- Non è correlata alle già note proprietà antiossidanti dell'embelina.

È stato altresì riscontrato che il nucleo chinonico è indispensabile per l'attività ma che la somministrazione contemporanea di un agente riducente quale il DTT agli omogenati cellulari, non altera in alcun modo le proprietà inibitorie dell'Embelina, suggerendo un differente meccanismo d'azione rispetto a quello degli inibitori redox-type.

Studi di Docking hanno permesso, inoltre, di ottenere importanti informazioni circa le caratteristiche necessarie per ottenere un adeguato *fitting* inibitore-enzima. Nello specifico:

- ♣ Il nucleo idrossichinonico è coordinato con tre residui amminoacidi del sito attivo Gln<sup>363</sup>, Gln<sup>557</sup>, and Tyr<sup>181</sup>, mediante la formazione di legami ad idrogeno;
- ♣ Le due molecole d'acqua presenti nel sito attivo, mediano l'interazione tra l'embelina e i differenti residui amminoacidici. Più nel dettaglio, l'H<sub>2</sub>O855 media la formazione di un legame ad idrogeno tra l'Embelina e il residuo di Thr<sup>364</sup> della proteina, mentre H<sub>2</sub>O802 è posta tra Asn<sup>425</sup> e il ligando..
- ♣ Infine si osserva come l'Embelina un chelante del ferro coinvolto nella catalisi, ma che invece blocca il canale idrofobico necessario all'ingresso dell'acido arachidonico, grazie alla presenza della sua catena undecilenica. ( Fig. 6.5)

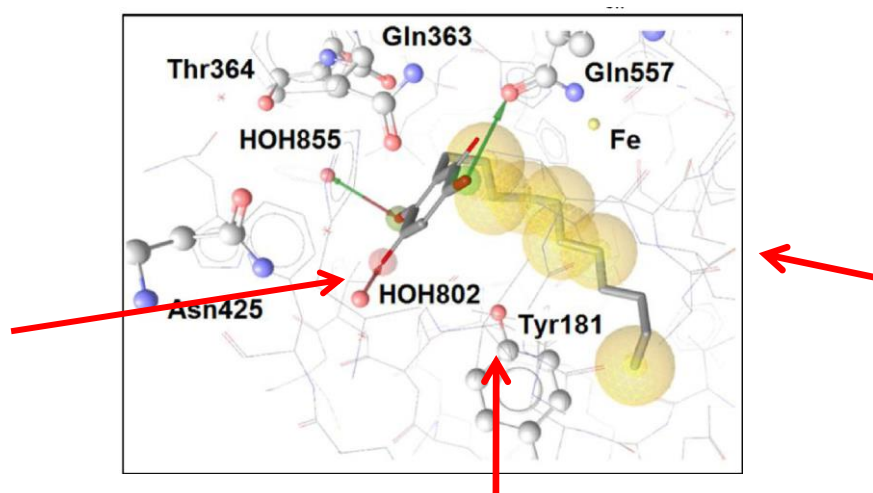
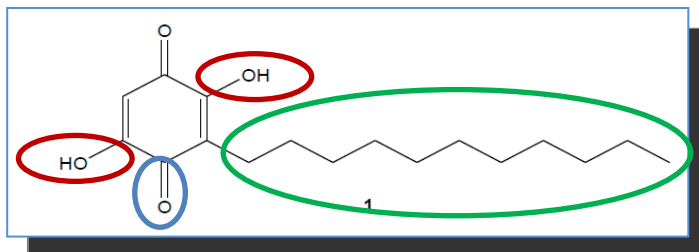


Figura 6.5 Studio di Docking relativo all'Embelina e al sito catalitico della 5-LO

La semplice struttura dell'Embelina e l'elevata potenza inibitoria con valori di  $IC_{50}$  nell'ordine del submicromolare ci ha stimolato a modificare ulteriormente la struttura e quindi a migliorare il potenziale inibitorio della molecola col fine ultimo di indagare in merito alle correlazioni struttura attività.

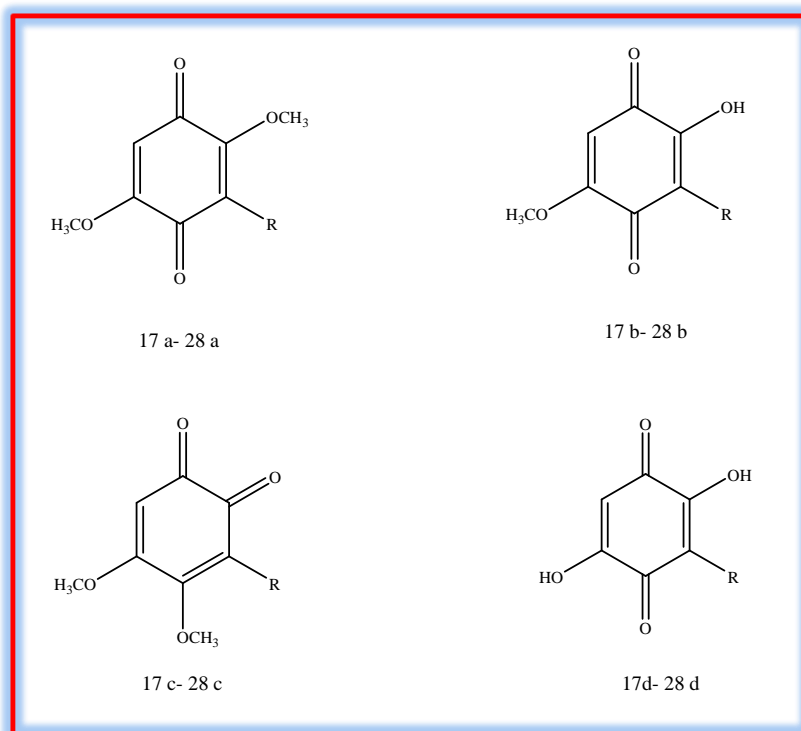
Nello specifico mi sono interessato di operare opportune modifiche strutturali qui di seguito elencate:

- ⊗ Modifiche a carico del nucleo para-chinonico ed introduzione di un nucleo ortoquinonico.  
Benché in letteratura si ritrovino pochi esempi di composti orto-chinonici inibitori della 5-LOX, uno tra questi, l'etiopinone, si è dimostrato essere estremamente potente sia nei confronti dell'enzima purificato che nel saggio condotto in cellula ;
- ⊗ Introduzione di gruppi metossilici e /o idrossilici a carico del nucleo benzochinonico. La ratio di questa diversa sostituzione è insita nella scelta di voler indagare sul ruolo rivestito dai gruppi metossilici o ossidrilici nell'attività inibitoria, vista la loro presenza quasi ubiquitaria nei chinoni di origine naturale
- ⊗ Allungamento ed accorciamento della catena undecilenica dell'embelina con l'introduzione di catene carboniose di lunghezza variabile, provviste in alcuni casi di un numero variabile di insaturazioni.



**$IC_{50}$  (cell-free) 90 nM**  
 **$IC_{50}$  (PMNL) 4,2  $\mu$ M**

Questo tipo di indagine ha portato alla sintesi di **48** differenti molecole, distinte in 4 serie, ognuna delle quali identificata da una precisa lettera alfabetica (**a,b,c,d**).



R=

| Composto     |            |
|--------------|------------|
| 17 (a,b,c,d) | n-butile   |
| 18 (a,b,c,d) | n-esile    |
| 19 (a,b,c,d) | n-ottile   |
| 20 (a,b,c,d) | n-decile   |
| 21 (a,b,c,d) | n-undecile |
| 22 (a,b,c,d) | n-dodecile |

|                              |                       |
|------------------------------|-----------------------|
| <b>23</b> ( <i>a,b,c,d</i> ) | <i>n</i> -tridecile   |
| <b>24</b> ( <i>a,b,c,d</i> ) | <i>n</i> -tetradecile |
| <b>25</b> ( <i>a,b,c,d</i> ) | <i>n</i> -pentadecile |
| <b>26</b> ( <i>a,b,c,d</i> ) | <i>n</i> -esadecile   |
| <b>27</b> ( <i>a,b,c,d</i> ) | geranile              |
| <b>28</b> ( <i>a,b,c,d</i> ) | farnesile             |

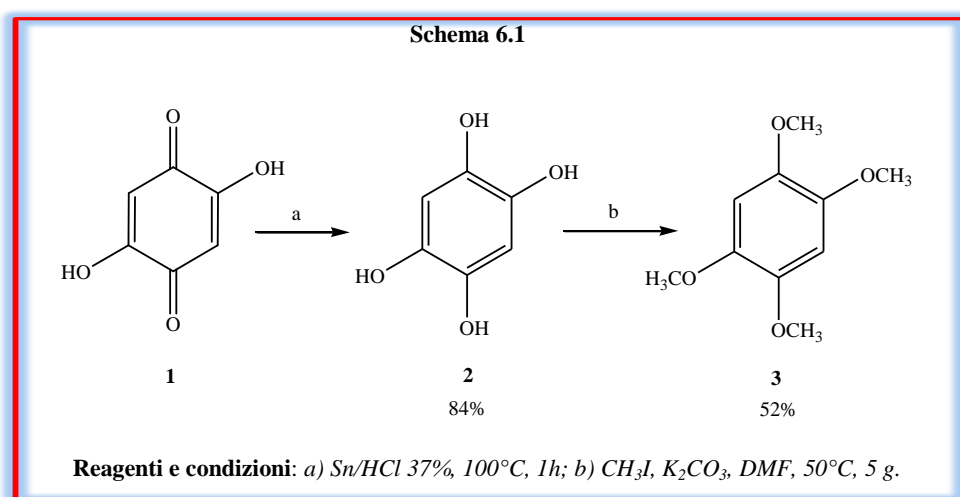
---

Tali composti sono stati caratterizzati mediante tecniche NMR e Massa e successivamente inviati presso il gruppo di ricerca del Prof. Oliver Werz dell'Università degli studi di Jena per valutare la loro capacità di inibire l'attività della 5-LOX



## 6.2 PARTE CHIMICA

La procedura sintetica seguita per ottenere i composti desiderati **17a- 28a**, **17b-28b**, **17c-28c** è riportata negli schemi seguenti. Come mostrato nello **Schema 6.1** la sintesi prevede l'utilizzo, come prodotto di partenza, del 2,5-diidrossi-1,4-benzochinone (**1**), il quale è stato sottoposto ad una reazione di riduzione mediante l'utilizzo di stagno metallico in ambiente acido per aggiunta di una soluzione di HCl al 37%. La reazione è stata mantenuta a 100°C per 1h, fornendo l'intermedio 1,2,4,5-tetraidrossibenzene (**2**) con una resa del 84%, in seguito a cristallizzazione da tetraidrofurano (*Weider et al. 1985*). La protezione dei gruppi ossidrilici è stata effettuata mediante l'utilizzo di iodometano in ambiente basico fornito per aggiunta di carbonato di potassio. La miscela è stata mantenuta per 5 giorni a 50°C in DMF (*Keegstra et al. 1996*), fornendo l'1,2,4,5-tetrametossibenzene (**3**), con una resa del 52% dopo purificazione mediante flash cromatografia.

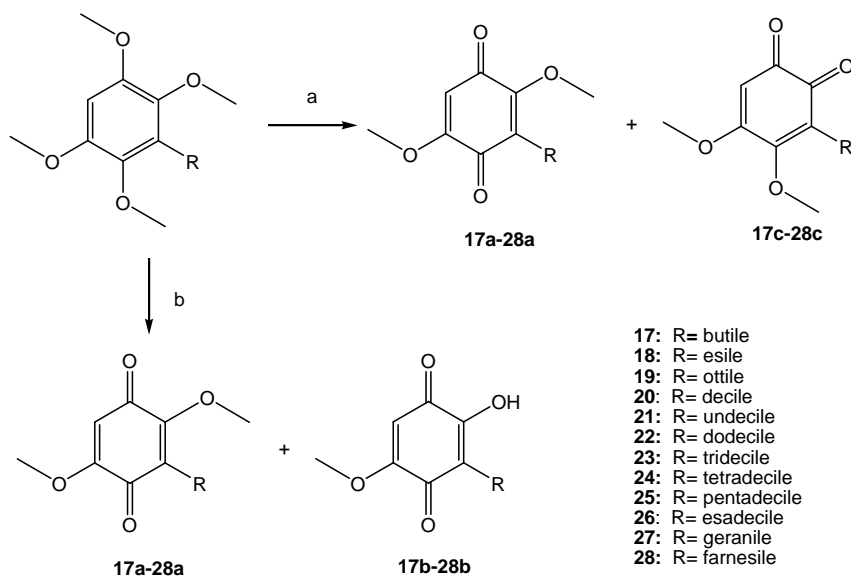


Il tetrametossibenzene rappresenta l'intermedio chiave per la sintesi dei composti finali. Esso infatti è stato sottoposto ad una reazione di *coupling* con diversi alogenuri alchilici. La reazione è stata condotta in THF per 12 h a temperatura ambiente ed ha previsto l'utilizzo di n-BuLi come base forte in grado di deprotonare il substrato (**Schema 6.1**). L'aggiunta dell'esametilfosforamide è fondamentale per accelerare la reazione di metallazione in quanto è in grado di complessare il litio e polarizzare ulteriormente il legame C-Li (*Mizuno et al. 2010*).



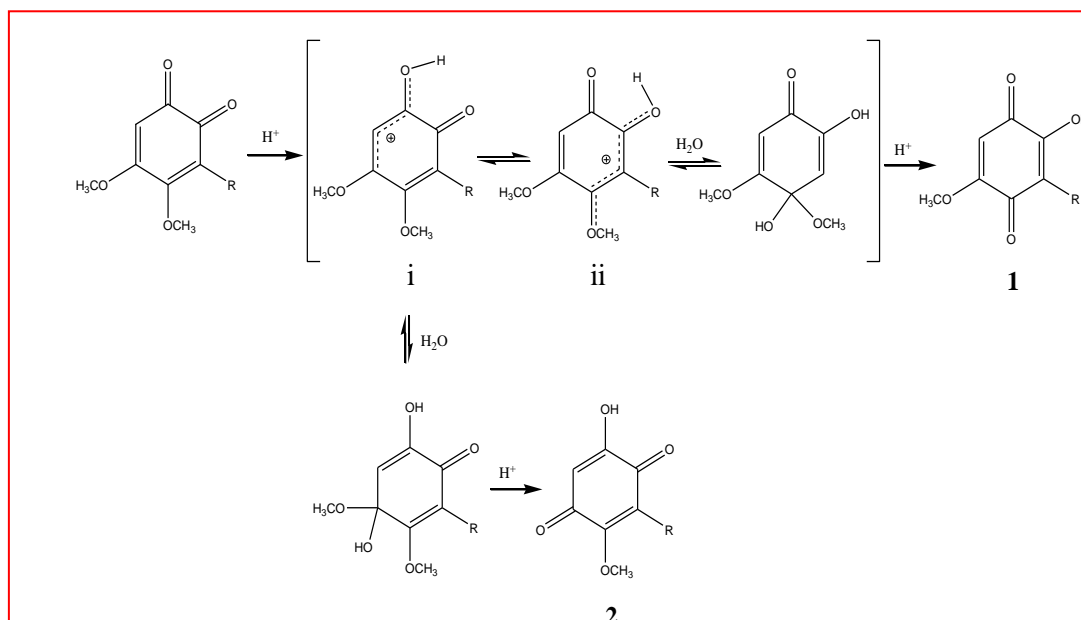
al sostituito R in posizione 3. L'idrolisi del risultante intermedio emiacetalico porta alla formazione del composto 2-idrossi-5-metossi-1,4-benzochinone (**1**). La trasformazione dell'intermedio carbocationico meno stabile (**i**) porta al composto (**2**) che non è stato osservato nella nostra reazione. (**Schema 6.3a**). (*Poigny et al.1988*)

Schema 6.3



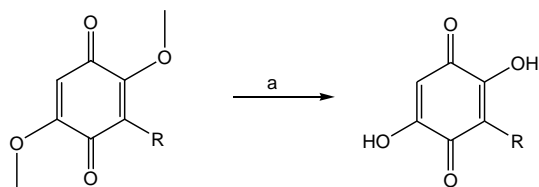
**Reagenti e condizioni:** a) CAN,  $CH_3CN:H_2O$  7:3,  $-10^\circ C$ , 10 min per ottenere 17a-28a e 17c-28c; b) CAN,  $CH_3CN:H_2O$  7:3, da  $-10^\circ C$  a temperatura ambiente, 2 h per ottenere 17a-28a e 17b-28b

Schema 6.3a



Il trattamento dei dimetossi-*para*-chinoni **17a-28a** con una soluzione basica di NaOH 2M, in etanolo (McErlean *et al.* 2007) ha permesso di ottenere l'idrolisi di entrambi i gruppi metossilici e fornire i composti desiderati **17d-28d** (Schema 6.4), con rese comprese tra il 78% e l'87% .

**Schema 4**



**17a-28a**

**17d:** R= butile  
**18d:** R= esile  
**19d:** R= ottile  
**20d:** R= decile  
**22d:** R= dodecile  
**23d:** R= tridecile  
**24d:** R= tetradecile  
**25d:** R= pentadecile  
**26d:** R= esadecile  
**27d:** R= geranile  
**28d:** R= farnesile

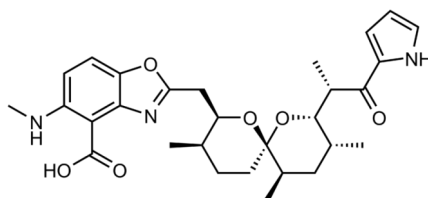
**Reagenti e condizioni:** a) NaOH 2M, EtOH, 80°C, 2h.

### 6.3 PARTE BIOLOGICA e CONCLUSIONI

I *tests* biologici sono stati condotti presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli studi di Jena, Germania, sotto la supervisione del Prof. Oliver Werz e della Dottoressa Anja Maria Schaible.

Nello specifico, i test hanno permesso di identificare la capacità inibitoria delle molecole saggate in *maniera indiretta*, determinando la percentuale di formazione dei leucotrieni (LTB<sub>4</sub>, HPETE, ecc.) prodotti dall'enzima.

Cellule di polimorfonucleati (PMNL), vengono opportunamente trattate con l'aggiunta di 2.5 μM di **Calcimima** (A23187, uno ionoforo del Ca<sup>2+</sup>) (**fig. 6.5**), che mimando lo stimolo infiammatorio è in grado di stimolare la produzione di leucotrieni (*Werz, O. 2002*), promuovendo l'attivazione della cPLA<sub>2</sub> responsabile del rilascio dell'acido arachidonico dai fosfolipidi di membrana.



**Figura 6.5** Struttura della Calcimicina

In questo tipo di saggio, la riduzione della produzione dei leucotrieni, oltre che all'inibizione della 5-LOX, potrebbe essere legata anche all'inibizione di altri enzimi coinvolti nel *pathway*, quali FLAP e/o cPLA<sub>2</sub>. Per escludere quest'ultimo evento il saggio viene condotto anche in presenza di acido arachidonico esogeno (20 μM). Inoltre, il test ha previsto l'impiego di Zileuton (composto 29) come riferimento.

È stato, altresì, condotto un test *cell-free* su lisati cellulari di *E.coli* esprimenti la 5-LOX ricombinante, con lo scopo di confermare l'attività inibitoria a carico dell'enzima.

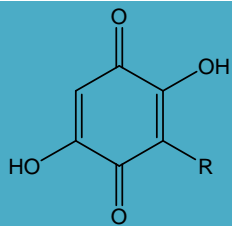
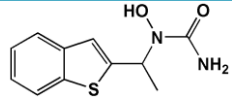
L'attenzione dell'indagine è stato posto su tre modifiche strutturali rispetto al lead compound rappresentato dall'Embelina: (I) introduzione di gruppi idrossilici liberi al nucleo benzochinone rispetto all'analogo metossilato, (II) la lunghezza del residuo n-alchilico in posizione 3, e (III) modifica del nucleo 1,4-chinonico a nucleo 1,2-benzo chinonico.

Partendo dal nucleo 2,5-diidrossi-1,4-benzochinone dell'*Embelina* è stata prima variata la lunghezza del residuo n-alchile in posizione 3 (che per l'*Embelina* è rappresentata da una catena a C11). A tal proposito sono stati introdotte catene lineari a , C-4, C-6, C-8, C-10, C-12, C-13, C-14, C-15 e residui C-16 n-alchilici o catene laterali isoprenoidi, rispettivamente, in posizione **3**, mantenendo fisso il nucleo 2,5-diidrossi-1,4 benzochinone ("**serie d** ", **Tabella 6.1**).



Tabella 6.1 . Effetti dei 2,5diidrossi-1,4-benzochinoni (“series d”) nell’inibire la 5-LO.

I dati sono espresso come media  $\pm$  S.E.M. , n=3,4

| Composti        |    | IC <sub>50</sub> [μM]<br>(percentuale di attività a 10 μM) |                         |                         |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                 |                                                                                     | PMNL                                                       |                         | cell-free               |
|                 |                                                                                     | A23187                                                     | A23187 + AA             | AA                      |
| <b>17d</b>      | <i>R = n-butile</i>                                                                 | > 10 μM<br>(93.5±4.4%)                                     | > 10 μM<br>(92.8±4.2%)  | > 10 μM<br>(65.4±14.2%) |
| <b>18d</b>      | <i>R = n-esile</i>                                                                  | > 10<br>(133.5±19.0%)                                      | > 10 μM<br>(79.9±6.6%)  | 4.0±1.1                 |
| <b>19d</b>      | <i>R = n-ottile</i>                                                                 | > 10 μM<br>(53.5±4.8%)                                     | > 10 μM<br>(80.07±8%)   | 0.38 ±0.04              |
| <b>20d</b>      | <i>R = n-decile</i>                                                                 | 2.0±0.3                                                    | 7.1±1.2                 | 0.18±0.01               |
| <b>Embelina</b> | <i>R = n-undecile</i>                                                               | 1.7±0.4                                                    | 3.5±0.5                 | 0.06±0.01               |
| <b>22d</b>      | <i>R = n-dodecile</i>                                                               | 4.6±1.3                                                    | 3.9±1                   | 0.17±0.03               |
| <b>23d</b>      | <i>R = n-tridecile</i>                                                              | 2.5±0.38                                                   | 4.7±0.2                 | 0.22±0.1                |
| <b>24d</b>      | <i>R = n-tetradecile</i>                                                            | 3.1±0.45                                                   | 5.1±0.6                 | 0.17±0.01               |
| <b>25d</b>      | <i>R = n-pentadecile</i>                                                            | 4.3±0.5                                                    | > 10 μM<br>(61.7±2.1%)  | 0.23±0.08               |
| <b>26d</b>      | <i>R = n-esadecile</i>                                                              | > 10 μM<br>(88.0±16.3%)                                    | > 10 μM<br>(80.5±5.7%)  | 0.19±0.04               |
| <b>27d</b>      | <i>R = geranile</i>                                                                 | > 10 μM<br>(114.3±4.5%)                                    | > 10 μM<br>(81.9±10.8%) | 1.8±0.2                 |
| <b>28d</b>      | <i>R = farnesile</i>                                                                | > 10 μM<br>(85.8± 3.9%)                                    | > 10 μM<br>(66.6± 2.8%) | 2.5± 1.4                |
| <b>Zileuton</b> |  | 0.9±0.3                                                    | 2.5±1.2                 | 0.59±0.10               |

Ad eccezione delle composto **17d** che presenta una catena C-4, tutti i derivati inibiscono l’attività delle 5-Lipossigenasi ne l test *cell-free* con valori di IC<sub>50</sub> nell’ordine di 0.17 - 4 μM. Alla concentrazione di 10 μM il composto **17d** è in grado di inibire l’attività della 5-LOX solo al 43.9%. Si noti che nessuno dei composti sintetizzati espleta un’attività migliore rispetto all’embelina. Pertanto, una relazione tra la lunghezza della catena n-alchilica e la possibile attività inibitoria dei

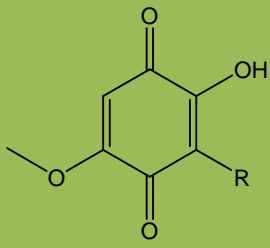
derivati 2,5-diidrossi-1,4-benzochinonici 3-sostituiti è evidente e nello specifico la catena undecilenica dell'Embelina sembra essere

I composti **20d**, **22d** e **26d** presentanti rispettivamente catene a C10-, C12- e C16 inibiscono l'attività della 5-LOX con valori di  $IC_{50}$  compresi tra 0.17 - 0.19  $\mu$ M mentre il composto che presenta la catena esilica in **3** è considerevolmente meno potente ( $IC_{50} = 4 \mu$ M). Per quanto riguarda i derivati prenilati mostrano una potenza inibitoria con valori di 1.8 e 2.5  $\mu$ M rispettivamente per il composto **27d** e **28d**.

La situazione risulta differente nel caso del test cellulare condotto su cellule di polimorfonucleati. In generale, si osserva che tutti i composti della serie *d* perdono potenza inibitoria in PMNL, infatti i composti con catene C4-, C6-, C8- (**17d**, **18d**, **19d**) o con catene C16- (**26d**, **27d**, **28d**) riducono solo moderatamente l'attività della 5-Lipossigenasi sia in assenza che in presenza di acido arachidonico esogeno ( $IC_{50} > 10 \mu$ M). I composti presentanti, invece, catene alchiliche a C10-, C12-, C13-, C-14- e C-15 **20d**, **22d**, **23d**, **24d**, e **25d** inibiscono l'attività della 5-LO in maniera efficiente con valori di  $IC_{50}$  pari a 2 e 4.6  $\mu$ M. In linea con quanto osservato per i composti della serie anche l'Embelina presenta un'aumento delle  $IC_{50}$  passando dal test *cell-free* a quello cellulare ( $IC_{50} = 1.7 \mu$ M). Si giunge pertanto alla conclusione che la presenza di due gruppi ossidrilici polari in posizione 2 e 5 dell'anello parachinonico conferisce alle molecole un'elevata idrofilicità, rendendo più difficoltoso il processo di attraversamento delle membrane biologiche delle cellule di PMNL. È stato, infatti, osservato che l'Embelina esiste nella forma monodeprotonata in un range di pH compreso tra 6.0 ed 8.0. In accordo con quanto osservato, è stato sia metilato uno solo dei due gruppi ossidrilici in posizione 5 ("serie **b**") che entrambi in posizione 2 e 5 ("a-series"), con lo scopo di incrementare l'*uptake* cellulare e permettere il raggiungimento della 5-LOX. Comparati con la serie *d* dei derivati 2,5-diidrossilati, i derivati 5-O-monometilati ("serie **b**") inibiscono la 5-LO in maniera meno efficiente nel test *cell-free*.

Tabella 6.2 . Effetti dei 2-idrossi-5-metossi-1,4-benzochinoni (“serie b”) nell’inibire la 5-LO.

I dati sono espresso come media  $\pm$  S.E.M. , n=3,4

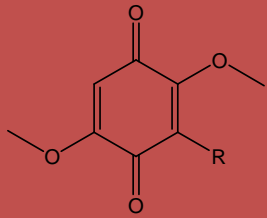
| No.        |  | IC50 [ $\mu$ M]<br>(percentuale di attività a 10 $\mu$ M) |                                    |                                    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|            |                                                                                   | PMNL                                                      |                                    | cell-free                          |
|            |                                                                                   | A23187                                                    | A23187+AA                          | AA                                 |
| <b>17b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -butile                                                       | > 10 $\mu$ M<br>(86.0 $\pm$ 6.0%)                         | > 10 $\mu$ M<br>(95.7 $\pm$ 7.3%)  | > 10 $\mu$ M<br>(70.5 $\pm$ 17.1%) |
| <b>18b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -esile                                                        | > 10 $\mu$ M<br>(68.9 $\pm$ 16.3%)                        | > 10 $\mu$ M<br>(64.1 $\pm$ 8.0%)  | > 10 $\mu$ M<br>(71.1 $\pm$ 5.3%)  |
| <b>19b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -ottile                                                       | > 10 $\mu$ M<br>(73.5 $\pm$ 8.6%)                         | > 10 $\mu$ M<br>(72.9 $\pm$ 11.7%) | 3.0 $\pm$ 0.4                      |
| <b>20b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -decile                                                       | 0.59 $\pm$ 0.1                                            | 2.7 $\pm$ 0.7                      | 4.3 $\pm$ 0.3                      |
| <b>21b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -undecile                                                     | 0.68 $\pm$ 0.1                                            | 1.3 $\pm$ 0.4                      | 3.8 $\pm$ 0.5                      |
| <b>22b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -dodecile                                                     | 0.56 $\pm$ 0.04                                           | 1.1 $\pm$ 0.2                      | 0.74 $\pm$ 0.1                     |
| <b>23b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -tridecile                                                    | 0.77 $\pm$ 0.26                                           | 2.3 $\pm$ 1.1                      | 0.92 $\pm$ 0.47                    |
| <b>24b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -tetradecile                                                  | 0.27 $\pm$ 0.04                                           | 0.49 $\pm$ 0.1                     | 0.42 $\pm$ 0.01                    |
| <b>25b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -pentadecile                                                  | 0.39 $\pm$ 0.14                                           | 0.86 $\pm$ 0.27                    | 0.27 $\pm$ 0.1                     |
| <b>26b</b> | <i>R</i> = <i>n</i> -esadecile                                                    | 1.0 $\pm$ 0.6                                             | 1.1 $\pm$ 0.8                      | > 10 $\mu$ M<br>(60.1 $\pm$ 8.7%)  |
| <b>27b</b> | <i>R</i> = <i>geranile</i>                                                        | 4.1 $\pm$ 1.1                                             | > 10 $\mu$ M<br>(65.9 $\pm$ 6.0%)  | > 10 $\mu$ M<br>(73.6 $\pm$ 8.0%)  |
| <b>28b</b> | <i>R</i> = <i>farnesile</i>                                                       | 1.9 $\pm$ 0.1                                             | 2.4 $\pm$ 0.8                      | 5.6 $\pm$ 0.1                      |

Nello specifico, i composti **18b**, **26b** e **27b** non sono in grado di inibire l’attività della 5-LOX se non a livelli superiori al 50% ad una concentrazione di 10  $\mu$ M mentre per i composti **20b** e **21b** si ha un incremento dei valori di IC50 tra le 22 e le 24 volte superiori (4.3 e 3.8  $\mu$ M) rispetto a corrispettivi derivati diidrossilati **20d** ed Embelina (0.18 e 0.06  $\mu$ M). Interessante è, invece, il fatto che la metilazione di entrambi i gruppi ossidrilici in posizione 2 e in posizione 5 (“serie a”, tabella 3)

incrementa in maniera significativa la potenza inibitoria, evidenziata dai valori di IC<sub>50</sub> compresi tra 0.21 e 3.3 µM molto simili a quelli della serie a nucleo 2,5-diidrossi 1,4 benzochinonico. Inoltre, il derivato **17a** a differenza del **17d** mostra una notevole attività inibitoria (IC<sub>50</sub> = 3.3 µM).

**Tabella6.3 . Effetti dei 2,5-dimetossi-1,4-benzochinoni (“serie a”) nell’inibire la 5-LO.**

I dati sono espresso come media ± S.E.M. , n=3,4

| No.        |  | IC <sub>50</sub> [µM]<br>(percentuale di attività a 10 µM) |           |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
|            |                                                                                   | PMNL                                                       |           | cell-free |
|            |                                                                                   | A23187                                                     | A23187+AA | AA        |
| <b>17a</b> | <i>R = n-butile</i>                                                               | 3.4±1.4                                                    | 7.9±1.0   | 3.3±0.9   |
| <b>18a</b> | <i>R = n-esile</i>                                                                | 0.32±0.2                                                   | 1.4±0.4   | 2.6±1.2   |
| <b>19a</b> | <i>R = n-ottile</i>                                                               | 0.32±0.01                                                  | 0.57±0.17 | 1.2±0.3   |
| <b>20a</b> | <i>R = n-decile</i>                                                               | 0.60±0.4                                                   | 1.7±0.9   | 1.8±0.7   |
| <b>21a</b> | <i>R = n-undecile</i>                                                             | 0.20±0.02                                                  | 0.59±0.1  | 0.93±0.1  |
| <b>22a</b> | <i>R = n-dodecile</i>                                                             | 0.63±0.4                                                   | 0.49±0.1  | 0.61±0.08 |
| <b>23a</b> | <i>R = n-tridecile</i>                                                            | 0.23±0.04                                                  | 0.31±0.05 | 0.26±0.01 |
| <b>24a</b> | <i>R = n-tetradecile</i>                                                          | 0.29±0.09                                                  | 1.4±0.8   | 0.21±0.03 |
| <b>25a</b> | <i>R = n-pentadecile</i>                                                          | 0.39±0.14                                                  | 0.86±0.27 | 0.27±0.1  |
| <b>26a</b> | <i>R = n-esadecile</i>                                                            | > 10 µM<br>(80.1±9.1%)                                     | 3.5±0.9   | 1.6±0.2   |
| <b>27a</b> | <i>R = geranile</i>                                                               | 0.45±0.2                                                   | 1.6±0.2   | 3.3±0.7   |
| <b>28a</b> | <i>R = farnesile</i>                                                              | 0.31±0.1                                                   | 1.2±0.2   | 1.7±0.7   |

Per quanto riguarda il test cellulare, l’attività inibitoria dei derivati O-metilati è incrementata, in particolare per i derivati dimetossilati della serie a.

I derivati monometossilati presentanti catene comprese tra C10- e C15 sono estremamente attivi nell’inibire la 5-LO con valori di IC<sub>50</sub> compresi fra 0.3 to 0.7 µM nei test condotti su cellule di PMNL stimulate con A23187.

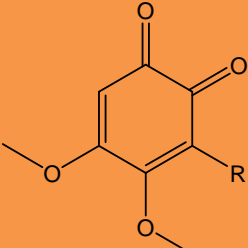
L’attività inibitoria, come detto, risulta notevolmente pronunciata nei derivati dimetossilati (“serie a”). In particolare, i composti della serie a presentanti catene alchiliche comprese fra 6 e 15, portano a valori di IC<sub>50</sub> compresi tra 0.2 ed 1.4 µM nel test cellulare condotto in presenza di A23187, valori che aumentano a seguito della somministrazione di acido arachidonico esogeno (**Tabella 3**). I derivati prenilati 27° e 28° mostrano un incremento significativo di attività con valori di IC<sub>50</sub>rispettivamente di 0.3 e 1.6 µM. In definitiva è possibile affermare che i composti presentanti catene C10-C16 in

posizione 3 di entrambi le serie a e b portano a valori di IC<sub>50</sub>, nel test cellulare, di circa 9 volte superiori rispetto a quelli del *lead* Embelina.

In ultima analisi, si è passati alla sostituzione del nucleo 1,4-benzochinonico con il nucleo 4,5-dimetossi-1,2-ortoquinonico (“serie c”, **Tabella 4**).

**Tabella 6.4 . Effetti dei 4,5-dimetossi-1,2-ortoquinoni (“serie c”) nell’inibire la 5-LO.**

I dati sono espresso come media ± S.E.M. , n=3,4

| No. |  | IC <sub>50</sub> [μM]<br>(percentuale di attività a 10 μM) |                        |                        |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------|
|     |                                                                                    | <i>cell-free</i>                                           |                        | <i>cell-free</i>       |
|     |                                                                                    | A23187                                                     | A23187+AA              | AA                     |
| 17c | <i>R</i> = <i>n</i> -butile                                                        | 2.2±0.8                                                    | 5.1±0.7                | > 10 μM<br>(82.9±2.7%) |
| 18c | <i>R</i> = <i>n</i> -esile                                                         | 0.33±0.1                                                   | 0.99±0.4               | 2.6±0.3                |
| 19c | <i>R</i> = <i>n</i> -ottile                                                        | 0.38±0.07                                                  | 0.82±0.38              | 0.33±0.05              |
| 20c | <i>R</i> = <i>n</i> -decile                                                        | 0.04±0.01                                                  | 0.07±0.01              | 0.13±0.01              |
| 21c | <i>R</i> = <i>n</i> -undecile                                                      | 0.06±0.01                                                  | 0.10±0.03              | 0.09±0.4               |
| 22c | <i>R</i> = <i>n</i> -dodecile                                                      | 0.029± 0.01                                                | 0.15±0.03              | 0.13±0.1               |
| 23c | <i>R</i> = <i>n</i> -tridecile                                                     | 0.12±0.01                                                  | 0.05±0.03              | 0.08±0.01              |
| 24c | <i>R</i> = <i>n</i> -tetradecile                                                   | 0.12±0.0                                                   | 0.09±0.02              | 0.04±0.02              |
| 25c | <i>R</i> = <i>n</i> -pentadecile                                                   | > 10 μM<br>(57.6±3.2%)                                     | > 10 μM<br>(66.8±3.5%) | 0.6±0.1                |
| 26c | <i>R</i> = <i>n</i> -esadecile                                                     | <sup>a</sup> n.d.                                          | n.d.                   | n.d.                   |
| 27c | <i>R</i> = <i>geranile</i>                                                         | 0.38±0.1                                                   | 0.39±0.1               | 0.60±0.1               |
| 28c | <i>R</i> = <i>farnesile</i>                                                        | 0.15±0.07                                                  | 0.10±0.01              | 0.30±0.1               |

L'introduzione del nucleo ortoquinonico porta a composti dotati di una potente attività inibitoria a carico della 5-LOX, soprattutto nel test cellulare. Difatti, ad eccezione che per il composto presentante una catena C-4 (**17c**), si nota per tutti i composti della serie valori di IC<sub>50</sub> dell'ordine del nM. Il composto 26c si è dimostrato poco solubile nel mezzo acquoso impiegato per il saggio e pertanto non è stato possibile testarne l'attività.

Una particolare menzione meritano i derivati con catene carboniose alchiliche comprese fra dieci e quattordici atomi (derivati **20c**, **21c**, **22c**, **23c** e **24c**) presentanti valori di IC<sub>50</sub> compresi fra 29 e

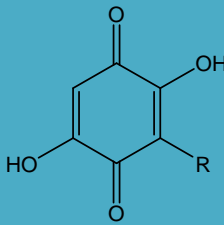
**150nM** in PMNL stimolati con A23187. In maniera molto simile a quanto avviene per i derivati della serie d, quella della serie c mostrano una certa equipotenza in tutti i saggi cellulari e cell-free.

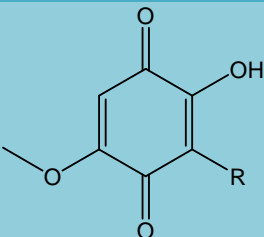
Si giunge pertanto alla conclusione che i composti della serie c sono i derivati più attivi fra le serie proposte con valori di IC50 paragonabili, se non migliori, a quelli dell'Embelina, nell'ordine del nanoMolare.

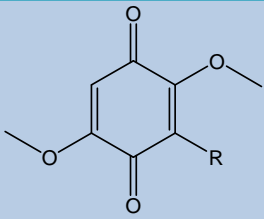
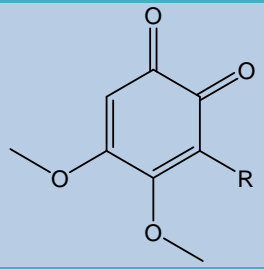
Con lo scopo di determinare una selettività d'azione a carico della 5-LOX, sono stati condotti test a carico di altre isoforme della stessa lipossigenasi, in particolare a carico della 12- e della 15-LOX. (Tabella 5). Ad eccezione del composto **18b** e **18c**, nessuno dei composti sintetizzati (ad una concentrazione di 10 µM) è in grado di ridurre significativamente la sintesi di 12-H(P)ETE o di 15-H(P)ETE in cellule di PMNL. Come riferimento per queste analisi viene impiegato il CDC (*cinnamyl-3,4-dihydroxyalpha-cyanocinnamate*) in grado di inibire la formazione dei composti indicati ad una concentrazione di 3 µM.

Inoltre, tenendo conto dell'attività inibitoria dell'Embelina a carico del mPGES-1 umana (IC50 = 0.21 µM) i composti sintetizzati sono stati testati anche in tal senso, utilizzando microsomi A549 stimolati da interleuchina 1β e come composto di riferimento il derivato MK886, ormai noto inibitore del mPGES-1. Purtroppo, anche in questo caso nessuno dei composti sintetizzati mostra una potenza inibitoria paragonabile a quella dell'Embelina. Basti pensare che il composto 19c, il più attivo della serie (IC50 = 0.8 µM) nell'inibire la m-PGES-1 resta comunque quattro volte meno attivo dell'Embelina.

**Tabella6.5 . Studi di attività a carico della 12, 15-LOX e dell'mPGES-1**

| Composti                                                                            |                     | 12-HETE<br>attività residua a<br>10 µM | 15-HETE<br>attività<br>residua a 10<br>µM | mPGES-1<br>IC <sub>50</sub> [µM]<br>(attività<br>residua a 10<br>µM ) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
|  |                     | <b>AA</b>                              | <b>A23187+AA</b>                          | <b>PGH<sub>2</sub></b>                                                |
| <b>17d</b>                                                                          | <i>R = n-butile</i> | 93.3±4.3%                              | 82.3±8.5%                                 | > 10 µM<br>(84.6±2.0%)                                                |
| <b>18d</b>                                                                          | <i>R = n-esile</i>  | 105.3±9.8%                             | 89.8±7.6%                                 | > 10 µM<br>(58.4± 9.1%)                                               |

|                                                                                    |                          |             |                  |                         |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------|------------------|-------------------------|
| <b>19d</b>                                                                         | <i>R = n-ottile</i>      | 75.7±11.3%  | 88.9±18.4%       | 0.8±0.2                 |
| <b>20d</b>                                                                         | <i>R = n-decile</i>      | 76.0± 8.7%  | 90.0± 12.2%      | 1.0±0.4                 |
| <b>2 (embelin)</b>                                                                 | <i>R = n-undecile</i>    | 74.9±11.3%  | 91.5±9.8%        | 0.21±0.1                |
| <b>22d</b>                                                                         | <i>R = n-dodecile</i>    | 90.6±3.1%   | 65.1±19.5%       | 3.1±0.4                 |
| <b>23d</b>                                                                         | <i>R = n-tridecile</i>   | 84.3±2.9%   | 123.6±11.7%      | 0.9±0.2                 |
| <b>24d</b>                                                                         | <i>R = n-tetradecile</i> | 101.2±10.5% | 138.9±12.1%      | 1.6±0.3                 |
| <b>25d</b>                                                                         | <i>R = n-pentadecile</i> | 87.7±17.8%  | 103.4±6.8%       | 2.1±0.4                 |
| <b>26d</b>                                                                         | <i>R = n-esadecile</i>   | 117.1±27.3% | 104.7±22.1%      | > 10 μM<br>(64.1±9.9%)  |
| <b>27d</b>                                                                         | <i>R = geranile</i>      | 80.5±9.2%   | 92.0±5.5%        | > 10 μM<br>(54.5±2.9%)  |
| <b>28d</b>                                                                         | <i>R = farnesile</i>     | 78.3±3.3%   | 95.2±6.2%        | > 10 μM<br>(58.8±5.6%)  |
|  |                          |             |                  |                         |
|                                                                                    |                          | <b>AA</b>   | <b>A23187+AA</b> | <b>PGH<sub>2</sub></b>  |
| <b>18b</b>                                                                         | <i>R = n-esile</i>       | 44.5±8.1%   | 65.8±14.6%       | > 10 μM<br>(91.4±0.2%)  |
| <b>19b</b>                                                                         | <i>R = n-ottile</i>      | 86.8±13.7%  | 104.9±27.1%      | > 10 μM<br>(81.4±11.2%) |
| <b>20b</b>                                                                         | <i>R = n-decile</i>      | 122.0±10.7% | 122.7±14.4%      | > 10 μM<br>(75.4±9.9%)  |
| <b>21b</b>                                                                         | <i>R = n-undecile</i>    | 138.4±10.8% | 131.2±20.5%      | 9.1±1.3                 |
| <b>22b</b>                                                                         | <i>R = n-dodecile</i>    | 148.3±19.7% | 115.6±4.5%       | 5.8±0.1                 |
| <b>23b</b>                                                                         | <i>R = n-tridecile</i>   | 73.2±15.7%  | 88.1±20.7%       | 6.1±1.2                 |
| <b>24b</b>                                                                         | <i>R = n-tetradecile</i> | 113.5±8.3%  | 115.8±8.8%       | > 10 μM<br>(52.1±2.9%)  |
| <b>25b</b>                                                                         | <i>R = n-pentadecile</i> | 92.8±3.7%   | 103.2±3.2%       | 9.3±0.8                 |
| <b>26b</b>                                                                         | <i>R = n-esadecile</i>   | 137.5±17.4% | 118.9±15.7%      | > 10 μM<br>(68.4±1.4%)  |
| <b>27b</b>                                                                         | <i>R = geranile</i>      | 100.8±22.4% | 111.5±10.3%      | > 10 μM<br>(100.6±7.4%) |
| <b>28b</b>                                                                         | <i>R = farnesile</i>     | 107.6±10.5% | 122.1±14.4%      | > 10 μM<br>(64.7±5.8%)  |

|     |                                                                                     |             |             |                         |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------------------|
|     |    |             |             |                         |
| 17a | <i>R</i> = <i>n</i> -butile                                                         | 102.6±19.1% | 103.1±36.4% | > 10 µM<br>(80.6±13.2%) |
| 18a | <i>R</i> = <i>n</i> -esile                                                          | 101.5±26.6% | 100.8±3.5%  | > 10 µM<br>(84.6±3.4%)  |
| 19a | <i>R</i> = <i>n</i> -ottile                                                         | 89.6±13.1%  | 123.0±26.9% | > 10 µM<br>(63.0±8.2%)  |
| 20a | <i>R</i> = <i>n</i> -decile                                                         | 143.5±12.6% | n.d.        | > 10 µM<br>(77.5±6.4%)  |
| 21a | <i>R</i> = <i>n</i> -undecile                                                       | 160.8±36.1% | 93.4±16.8%  | > 10 µM<br>(59.2±2.5%)  |
| 22a | <i>R</i> = <i>n</i> -dodecile                                                       | 138.5±18.3% | 126.9±5.5%  | 4.7±0.6                 |
| 23a | <i>R</i> = <i>n</i> -tridecile                                                      | 58.8±15.5%  | 84.1±17.0%  | 1.8±0.4                 |
| 24a | <i>R</i> = <i>n</i> -tetradecile                                                    | 84.5±6.7%   | 115.6±8.5%  | 4.4±1.3                 |
| 25a | <i>R</i> = <i>n</i> -pentadecile                                                    | 87.3±5.7%   | 115.4±3.2   | 7.2±1.1                 |
| 26a | <i>R</i> = <i>n</i> -esadecile                                                      | 121.0±29.9% | 97.8±19.0%  | > 10 µM<br>(65.5±4.3%)  |
| 27a | <i>R</i> = geranile                                                                 | 90.3±1.2%   | 126.8±9.7%  | > 10 µM<br>(80.2±6.9%)  |
| 28a | <i>R</i> = farnesile                                                                | 138.7±7.0%  | 135.7±17.2% | > 10 µM<br>(64.8±4.3%)  |
|     |  |             |             |                         |
| 17c | <i>R</i> = <i>n</i> -butile                                                         | 85.8±31.0%  | 128.8±24.8% | > 10 µM<br>(97.9±2.9%)  |
| 18c | <i>R</i> = <i>n</i> -esile                                                          | 18.6±6.7%   | 91.7±25.6%  | > 10 µM<br>(87.0±1.8%)  |
| 19c | <i>R</i> = <i>n</i> -ottile                                                         | 59.3±15.8%  | 101.7±24.0% | > 10 µM<br>(51.1±3.4%)  |
| 20c | <i>R</i> = <i>n</i> -decile                                                         | 133.1±63.9% | 147.8±17.5% | > 10 µM<br>(81.9±6.9%)  |
| 21c | <i>R</i> = <i>n</i> -undecile                                                       | 235.8±40.1% | 104.7±19.8% | > 10 µM<br>(53.5±11.6%) |
| 22c | <i>R</i> = <i>n</i> -dodecile                                                       | 134.8±15.8% | 132.9±13.1% | > 10 µM<br>(52.4±2.6%)  |
| 23c | <i>R</i> = <i>n</i> -tridecile                                                      | 78.5±28.8%  | 137.1±36.9% | > 10 µM<br>(77.5±4.4%)  |



|            |                          |                   |             |                         |
|------------|--------------------------|-------------------|-------------|-------------------------|
| <b>24c</b> | <i>R = n-tetradecile</i> | 87.3±11.6%        | 138.9±8.9%  | > 10 µM<br>(84.0±3.6%)  |
| <b>25c</b> | <i>R = n-pentadecile</i> | 88.9±6.8%         | 114.8±9.5%  | > 10 µM<br>(97.3±11.0%) |
| <b>26c</b> | <i>R = n-esadecile</i>   | <sup>a</sup> n.d. | n.d.        | n.d.                    |
| <b>27c</b> | <i>R = geranile</i>      | 72.8±32.9%        | 124.6±16.2% | > 10 µM<br>(61.5±2.3%)  |
| <b>28c</b> | <i>R = farnesile</i>     | 211.0±40.4%       | 174.3±21.2% | > 10 µM<br>(64.9±5.7%)  |

## 6.4 PARTE SPERIMENTALE

### Sezione Chimica

#### *Materiali e metodi*

Tutti i reagenti impiegati sono di grado analitico e sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano-Italia). La purificazione mediante flash cromatografia è stata effettuata utilizzando gel di silice Carlo Erba 60 (230 ÷ 400 mesh; CarloErba, Milano, Italia). La TLC è stata effettuata utilizzando piastre rivestite con gel di silice 60F 254 nm acquistate dalla Merck (Darmstadt, Germania). Gli spettri  $^1\text{H}$  sono stati effettuati su strumenti AC Brucker 250, 300, 400 e 600. Gli spostamenti chimici sono riportati in ppm. Le abbreviazioni usate sono le seguenti: s, singoletto; d, doppietto; dd doppio doppietto; m multipletto, t tripletto, q quadrupletto bs, segnale ampio

#### *1,2,4,5 tetraidrossibenzene (2)*

Ad una soluzione di 2,5-diidrossi-1,4-benzochinone (5g, 34.975 mmol) in HCl (37%, 112.0 mL) è stato aggiunto lentamente stagno granulare (5.170 g, 41.970 mmol), osservando sviluppo di effervescenza. La reazione è stata riscaldata a 100 °C e mantenuta in tali condizioni per 1h, tempo in cui il colore della soluzione è variato dall'arancio al nero e poi al trasparente. Trascorso tale tempo la miscela è stata filtrata a caldo e poi raffreddata a 0 °C in modo da fornire il composto come precipitato beige. Il solido è stato cristallizzato da THF ed ottenuto con una resa del 84%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz):  $\delta$  6.4 (s, 2H).

#### *1,2,4,5 tetrametossibenzene (3)*

Ad una soluzione del composto **2** (3g, 20.688 mmol) in DMF (60 mL), è stato aggiunto il  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (13.129 g, 93.96 mmol) e lo iodometano (15.77 mL, 248.256 mmol). La reazione, una volta portata a 50°C, è stata mantenuta in tali condizioni per 5 giorni. La miscela è stata raffreddata, diluita con  $\text{H}_2\text{O}$  ed estratta con diclorometano per 2 volte. Le fasi organiche sono state riunite, anidificate su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro ed evaporate sotto pressione per fornire un olio che è stato sottoposto a purificazione mediante flash-cromatografia, utilizzando come miscela eluente  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  9.9:0.1. Il prodotto desiderato è stato ottenuto con una resa del 52%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  3.87 (s, 12H), 6.63 (s, 2H).

#### **Procedura generale per la sintesi dei composti 5-16**

Ad una soluzione del composto **3** (300 mg, 1.48 mmol) e HMPA (0.1 eq) in THF anidro (10.0 mL), a -40 °C è stato aggiunto il n-Buli (1 eq). La soluzione è stata portata a -10 °C in un'ora circa e

mantenuta a questa temperatura per un'altra ora. Successivamente è stato aggiunto goccia a goccia l'alogenuro alchilico (1.1 eq.). La reazione è stata portata a temperatura ambiente e mantenuta in tali condizioni per tutta la notte. Trascorso tale tempo la miscela è stata evaporata sotto pressione e diluita con una soluzione satura di NH<sub>4</sub>Cl. La fase acquosa è stata estratta con EtOAc (3x25 mL). Le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua e una soluzione satura di NaCl, successivamente anidificate su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrate ed evaporate. Il grezzo, costituito da un olio giallino, è stato purificato mediante flash-cromatografia.

**3-butil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (5)**

Resa: 42%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.34-1.40 (m, 2H); 1.49-1.54 (m, 2H); 2.60 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.76 (s, 6H); 3.83 (s, 6H); 6.40 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.2, 22.7, 30.6, 32.3, 56.4 (2C), 61.1 (2C), 96.7 (2C), 131.3, 141.2, 149 (2C).

**3-esil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (6)**

Resa: 37%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.87 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.33-1.48 (m, 6H); 1.50-1.62 (m, 2H); 2.62 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.73 (s, 6H); 3.85 (s, 6H); 6.40 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.2, 22.7, 24.8, 29.6, 30.6, 32.3, 56.4 (2C), 61.1 (2C), 96.7 (2C), 131.3, 141.2, 149 (2C).

**3-ottil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (7)**

Resa: 52%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.22-1.54 (m, 10H); 1.51-1.62 (m, 2H); 2.61 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.79 (s, 6H); 3.84 (s, 6H); 6.40 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.3, 22.9, 24.9, 29.6, 29.9, 30.2, 31.0, 32.1, 56.4 (2C), 61.1 (2C), 96.7 (2C), 131.3, 141.2, 149.0 (2C).

**3-decil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (8)**

Resa: 40% I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [[J Agric Food Chem.](#) **2010** 58(7):4353-5.]

**3-undecil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (9)**

Resa: 46%. I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura [[J Agric Food Chem.](#) **2010** 58(7):4353-5]

**3-dodecil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (10)**

Resa: 42%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.87 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.32 (s, 18H); 1.47 (m, 2H); 2.62 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.76 (s, 6H); 3.86 (s, 6H); 6.42 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 12.1, 20.7, 22.7, 27.4, 27.5, 27.6, 27.8, 28.1, 28.8, 30.0, 54.3 (2C), 58.9 (2C), 95.1 (2C), 129.1, 139.4, 147.0 (2C).

***3-tridecil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (11)***

Resa: 62%. I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [*Journal of Natural Products* (2012), 75, (12), 2209-2215]

***3-tetradecil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (12)***

Resa: 42%. I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [*J Agric Food Chem.* 2010 58(7):4353-5.]

***3-pentadecil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (13)***

Resa: 46%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.86 (t, 3H, *J* = 8Hz); 1.22-1.62 (m, 24H); 1.63-1.78 (m, 2H); 2.63 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.76 (s, 6H); 3.89 (s, 6H); 6.57 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.3, 22.9, 24.9, 29.6, 29.7, 29.8, 29.9 (6C), 30.2, 31.0, 32.1, 56.4 (2C), 61.1 (2C), 96.7 (2C), 131.3, 141.2, 149.0 (2C).

***3-esadecil-1,2,4,5-tetrametossibenzene (14)***

Resa: 32%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.89 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.27 (s, 26H); 1.30 (m, 2H); 2.62 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.76 (s, 6H); 3.86 (s, 6H); 6.42 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 12.1, 20.7, 22.8, 27.4, 27.6, 27.8, 28.0 (8C), 28.8, 30.0, 54.3(2C), 58.9(2C), 95.1(2C), 129.1, 139.3, 146.9(2C).

***1,2,4,5-tetrametossi -3-((E)-3,7-dimetilotta-2,6-dienil)benzene (15)***

Resa: 30%. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 1.60 (s, 3H); 1.68 (s, 3H); 1.81 (s, 3H); 1.92-2.15 (m, 4H), 3.35 (d, 2H, *J* = 6.9 Hz); 3.76 (s, 6H); 3.83 (s, 6H); 5.11 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz); 5.22 (t, 1H, *J* = 6.9 Hz); 6.40 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14.2, 15.7, 21.5, 21.7, 23.7, 24.6, 24.7, 37.8, 54.3, 58.8, 95.2, 121.2, 121.5, 122.1, 122.5, 128.2, 129.2, 132.8, 139.2, 147.0.

***1,2,4,5-tetrametossi -3-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)benzene (16)***

Resa: 32%.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.60 (s, 3H); 1.62 (s, 3H); 1.68 (s, 3H); 1.81 (s, 3H); 1.92-2.25 (m, 8H), 3.35 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 3.76 (s, 6H); 3.83 (s, 6H); 5.11 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 5.22 (t, 1H,  $J = 6.9$  Hz); 6.40 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  16.1, 17.7, 23.1, 25.7, 26.4 (2C), 26.7, 39.7(2C), 55.3, 55.7, 60.1, 60.3, 99.7, 122.3(2C), 123.8, 124.1, 125.5, 131.9, 135.0(2C), 137.0, 138.1, 143.7.

#### **Procedura generale per la sintesi dei composti 17a,b,c-28a,b,c**

I composti **5-16** (1mmol) sono stati sciolti in 10mL di  $\text{CH}_3\text{CN}$ . La soluzione è stata portata a  $-10^\circ\text{C}$ . A questo punto è stata gocciolata lentamente una soluzione di CAN (2.5 eq) sciolto in 6 mL di una miscela di  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  7:3. La reazione è stata condotta a  $-10^\circ\text{C}$  per 10' per ottenere una miscela dei composti **17a,c-28a,c** (Metodo A). Per ottenere i derivati **17b-28b** la miscela di reazione è stata portata lentamente a temperatura ambiente ed è stata mantenuta a questa temperatura per 2 ore (Metodo B).

Per entrambi i metodi, la miscela di reazione è stata diluita con  $\text{Et}_2\text{O}$  e la fase organica è stata più volte lavata con acqua. Le due fasi sono state separate e la fase organica è stata anidrificata con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro ed evaporata. Il grezzo è stato purificato mediante flash-cromatografia utilizzando una miscela in gradiente a partire da Esano/ $\text{EtOAc}$  8:2 fino a 7:3.

#### **2,5-dimetossi-3-butil-1,4-benzochinone (17a), 2-idrossi-5-metossi-3-butil-1,4-benzochinone (17b) e 4,5- dimetossi-3-butil-1,2-benzochinone (17c).**

Polvere gialla. Resa: 38% (Metodo A), 42% (Metodo B) (**17a**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.88 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.34-1.54 (m, 4H); 2.60 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.79 (s, 3H); 4.04 (s, 3H); 5.72 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.3, 22.8, 28.2, 32.1, 56.9, 61.5, 102.4, 119.5, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$  C, 64.27; H, 7.19; O, 28.54. C, 64.33; H, 8.02; O, 28.79.

Polvere arancio. Resa: 37% (**17b**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.84 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.25-1.54 (m, 4H); 2.50 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.85 (s, 3H); 5.82 (s, 1H); 7.33 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.3, 22.8, 28.2, 32.1, 56.9, 102.4, 119.5, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_4$  C, 62.85; H, 6.71; O, 30.44. C, 63.33; H, 7.74; O, 29.03.

Polvere rossa . Resa: 62% (**17c**)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.88 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.34-1.54 (m, 4H); 2.40 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.95 (s, 6H); 5.69 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz):  $\delta$  14.3, 20.7, 21.5,

26.9, 54.8, 59.9, 99.9, 100.2, 128.7, 156.9, 164.4, 176.8, 178.7. Anal. Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> C, 64.27; H, 7.19; O, 28.54. C, 64.21; H, 7.95; O, 28.79.

**2,5-dimetossi-3-esil-1,4-benzochinone (18a), 2-idrossi-5-metossi-3-esil-1,4-benzochinone (18b) e 4,5-dimetossi-3-esil-1,2-benzochinone (18c).**

Polvere gialla. Resa: 37% (Metodo A), 39% (Metodo B) (**18a**). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.34-1.56 (m, 8H); 2.50 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.79 (s, 3H); 4.04 (s, 3H); 5.72 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.3, 22.8, 22.9, 28.2, 29.6, 32.1, 56.9, 61.5, 102.4, 119.5, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> C, 66.65; H, 7.99; O, 25.37. C, 65.01; H, 6.65; O, 24.39.

Polvere arancio. Resa: 33% (**18b**). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.84 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.25-1.48 (m, 6H); 1.46-1.52 (m, 2H); 2.50 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.85 (s, 3H); 5.82 (s, 1H); 7.33 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.3, 22.8, 22.9, 28.2, 29.6, 32.1, 56.9, 102.4, 119.5, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> C, 65.53; H, 7.61; O, 26.86. C, 63.21; H, 7.75; O, 27.32.

Polvere rossa. Resa: 43% (**18c**). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, *J* = 6.5 Hz); 1.29-1.39 (m, 6H); 1.40-1.43 (m, 2H); 2.45 (t, 2H, *J* = 7.74 Hz); 3.92 (s, 6H); 5.70 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.1, 22.5, 23.5, 28.9, 29.3, 31.6, 56.8, 61.9, 101.3, 130.6, 158.9, 166.4, 178.7, 180.7. Anal. Calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> C, 66.65; H, 7.99; O, 25.37. FC, 64.11; H, 6.95; O, 25.79.

**2,5-dimetossi-3-ottil-1,4-benzochinone (19a), 2-idrossi-5-metossi-3-ottil-1,4-benzochinone (19b) e 4,5-dimetossi-3-ottil-1,2-benzochinone (19c).**

Polvere gialla. Resa: 38% (Metodo A), 42% (Metodo B) (**19a**). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.24 (s, 10H); 1.49-1.54 (m, 2H); 2.60 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.79 (s, 3H); 4.04 (s, 3H); 5.72 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.4, 22.8, 22.8, 28.2, 29.7, 29.8 (2C), 32.1, 56.9, 61.5, 102.4, 119.5, 151.8, 161.5, 181.9, 182.8. Anal. Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub> C, 68.54; H, 8.63; O, 22.83. C, 69.10; H, 8.55; O, 20.79.

Polvere arancio. Resa: 37% (**19b**). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.84 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.25 (s, 10H); 1.49-1.54 (m, 2H); 2.60 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.85 (s, 3H); 5.82 (s, 1H); 7.33 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.3, 22.8, 22.9, 28.2, 29.5, 29.8 (2C), 32.1, 56.8, 102.4, 119.5, 151.8, 161.2, 181.7, 182.9. Anal. Calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub> C, 67.64; H, 8.33; O, 24.03. C, 66.84; H, 8.30; O, 24.15.

Polvere rossa. Resa: 62% (**19c**). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.88 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.34 (s, 10H); 1.49-1.54 (m, 2H); 2.60 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.95 (s, 6H); 5.69 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ

14.3, 20.7, 21.4, 26.9, 54.8, 59.8, 99.8, 100.2, 128.7, 155.9, 164.4, 176.8, 178.5. Anal. Calcd. for  $C_{16}H_{24}O_4$  C, 68.54; H, 8.63; O, 22.83. Found C, 69.10; H, 8.91; O, 21.75.

**2,5-dimetossi-3-decil-1,4-benzochinone (20a), 2-idrossi-5-metossi-3-decil-1,4-benzochinone (20b) e 4,5-dimetossi-3-decil-1,2-benzochinone (20c).**

Polvere gialla. Resa: 28% (Metodo A) 44% (Metodo B) (**20a**). I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [[J Agric Food Chem. 2010](#) 58(7):4353-5.] Anal. Calcd. for  $C_{18}H_{28}O_4$  C, 70.10; H, 9.15; O, 20.75. C, 69.14; H, 8.45; O, 19.79.

Polvere Arancio. Resa:33% (**20b**). I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [[J Agric Food Chem. 2010](#)] Anal. Calcd. for  $C_{17}H_{26}O_4$  C, 69.36; H, 8.90; O, 21.74. C, 68.08; H, 7.97; O, 22.52.

Polvere rossa. Resa:62% (**20c**).  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.86 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.25 (s, 14H); 1.42 (s, 2H); 2.42 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.95 (s, 6H); 5.82 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.3, 20.7, 21.5, 26.9, 27.4, 27.7, 29.9, 54.8, 59.9, 99.9, 100.2, 128.7, 156.9, 164.4, 176.8, 178.7. Anal. Calcd. for  $C_{18}H_{28}O_4$  C, 70.10; H, 9.15; O, 20.75. C, 69.11; H, 8.92; O, 21.44.

**2,5-dimetossi-3-undecil-1,4-benzochinone(21a), 2-idrossi-5-metossi-3-undecil-1,4-chinone (21b) e 4,5-dimetossi-3-undecil-1,2-benzochinone (21c).**

Polvere gialla. Resa:32% (Metodo A), 47% (Metodo B) (**21a**) I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [[J Agric Food Chem. 2010](#) 58(7):4353-5.] Anal. Calcd. for  $C_{19}H_{30}O_4$  C, 70.77; H, 9.38; O, 19.85. C, 70.11; H, 9.02; O, 20.74.

Polvere arancio. Resa: 35% (**21b**) I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [[J Agric Food Chem. 2010](#) 58(7):4353-5.] Anal. Calcd. for  $C_{18}H_{28}O_4$  C, 70.10; H, 9.15; O, 20.75. C, 69.51; H, 8.97; O, 21.04.

Polvere rossa. Resa: 56% (**21c**)  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.92 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.30 (s, 16H); 1.42 (s, 2H); 2.42 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.92 (s, 6H); 5.70 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.3, 20.7, 21.5, 26.9, 27.5, 27.6, 27.7, 29.9, 54.8, 59.9, 99.9, 100.2, 128.7, 156.9, 164.4, 176.8, 178.7. Anal. Calcd. for  $C_{19}H_{30}O_4$  C, 70.77; H, 9.38; O, 19.85. C, 69.71; H, 8.98; O, 20.14.

**2,5-dimetossi-3-dodecil-1,4-benzochinone (22a), 2-idrossi-5-metossi-3-dodecil-1,4- benzochinone (22b) 4,5-dimetossi-3-dodecil-1,2- benzochinone (22c)**

Polvere gialla. Resa: 37% (Metodo A), 43% (Metodo B) (**22a**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.89 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.27 (s, 18H); 1.41 (br, 2H); 2.42 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.82 (s, 3H); 4.07 (s, 3H); 5.74 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.1, 22.7, 23.1, 28.7, 29.4, 29.5 (4C), 29.7 (2C), 31.9, 56.4, 61.3, 105.4, 130.8, 155.9, 158.9, 182.4, 183.6. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$  C, 71.39; H, 9.59; O, 19.02. C, 69.61; H, 9.88; O, 20.04.

Polvere arancio. Resa: 34% (**22b**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.90 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.27 (s, 18H); 1.48 (br, 2H); 2.46 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.88 (s, 3H); 5.86 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.1, 22.6, 22.7, 28.0, 29.3, 29.4 (2C), 29.6 (2C), 29.7 (2C), 31.9, 56.8, 102.2, 119.3, 151.5, 161.1, 181.7, 182.8. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_4$  C, 70.77; H, 9.38; O, 19.85. C, 69.73; H, 8.88; O, 20.07.

Polvere rossa. Resa: 51% (**22c**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ).  $\delta$  0.90 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.27 (s, 18H); 1.42 (m, 2H); 2.42 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.92 (s, 6H); 5.71 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.1, 22.6, 23.5, 28.9, 29.4, 29.5 (4C), 29.7 (2C), 31.9, 56.8, 61.9, 101.3, 130.6, 158.9, 166.4, 178.7, 180.7. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$  C, 71.39; H, 9.59; O, 19.02. C, 70.12; H, 9.13; O, 20.22.

**2,5-dimetossi-3-tridecil-1,4-benzochinone (23a), 2-idrossi-5-metossi-3-tridecil-1,4-benzochinone (23b), 4,5-dimetossi-3-tridecil-1,2-benzochinone (23c)**

Polvere gialla. Resa: 37% (Metodo A), 39% (Metodo B) (**23a**). I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [ *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 10298-10301]. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_4$  C, 71.96; H, 9.78; O, 18.26. C, 72.11; H, 9.92; O, 17.96.

Polvere arancio. Resa: 33% (**23b**). I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [ *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 10298-10301]. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$  C, 71.39; H, 9.59; O, 19.02. Found C, 72.19; H, 9.77; O, 18.92

Polvere rossa. Resa: 43% (**23c**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.88 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.34 (s, 20H); 1.49-1.54 (m, 2H); 2.60 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.92 (s, 6H); 5.71 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.3, 22.8, 22.9, 28.2, 29.5, 29.6, 29.7 (2C), 29.8 (4C), 32.1, 56.5, 61.6, 100.8, 130.1, 158.7, 166.1, 178.3, 180.3. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{O}_4$  C, 71.96; H, 9.78; O, 18.26. C, 71.80; H, 9.56; O, 18.87

**2,5-dimetossi-3-tetradecil-1,4-benzochinone (24a), 2-idrossi-5-metossi-3-tetradecil-1,4-benzochinone (24b), 4,5-dimetossi-3-tetradecil-1,2-benzochinone (24c)**



Polvere gialla. Resa: 28% (Metodo A) 44% (Metodo B) (**24a**). I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [*J Agric Food Chem.* **2010** 58(7):4353-5.] Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> C, 72.09; H, 10.45; O, 17.46. C, 71.57; H, 10.33; O, 17.12

Polvere arancio. Resa: 33% (**24b**). I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [*J Agric Food Chem.* **2010** 58(7):4353-5.] Anal. Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub> C, 71.96; H, 9.78; O, 18.26. C, 70.98; H, 9.82; O, 17.76

Polvere rossa. Resa: 62% (**24c**). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.9 (t, 3H, *J* = 7.28 Hz); 1.20-1.48 (m, 24H); 2.42 (t, 2H, *J* = 6.86 Hz); 3.92 (s, 6H); 5.71 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.1, 22.7, 23.5, 28.9, 29.4, 29.5, 29.7, 31.9, 32.1, 56.5, 61.6, 100.8, 130.1, 158.7, 166.1, 178.3, 180.3. Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> C, 72.49; H, 9.95; O, 17.56. C, 71.55; H, 9.69; O, 16.89

**2,5-dimetossi-3-pentadecil-1,4-benzochinone (25a), 2-idrossi-5-metossi-3-pentadecil-1,4-benzochinone (25b), 4,5-dimetossi-3-pentadecil-1,2-benzochinone (25c)**

Polvere gialla. Resa: 32% (Metodo A), 47% (Metodo B) (**25a**) I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [*Tetrahedron*, 43, (12), **1987**, 2653-2660] Anal. Calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> C, 72.59; H, 10.59; O, 16.82. C, 71.77; H, 10.12; O, 15.63.

Polvere arancio. Resa: 35% (**25b**) I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [*Tetrahedron*, 43, (12), **1987**, 2653-2660] Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> C, 72.09; H, 10.45; O, 17.46. C, 73.03; H, 10.89; O, 17.93

Polvere rossa. Resa: 56% (**25c**) <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.92 (t, 3H, *J* = 8 Hz); 1.30 (s, 24H); 1.42 (s, 2H); 2.42 (t, 2H, *J* = 8 Hz); 3.92 (s, 6H); 5.70 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.3, 22.8, 22.9, 28.2, 29.5, 29.6, 29.7 (3C), 29.8 (5C), 32.1, 56.5, 61.6, 100.8, 130.1, 158.7, 166.1, 178.3, 180.3. Anal. Calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub> C 72.98; H, 10.12; O, 16.91. C, 71.58; H, 10.77; O, 15.69.

**2,5-dimetossi-3-esadecil-1,4-benzochinone (26a), 2-idrossi-5-metossi-3-esadecil-1,4-benzochinone (26b), 4,5-dimetossi-3-esadecil-1,2-benzochinone (26c)**

Polvere gialla. Resa: 33% (Metodo A), 44% (Metodo B) (**26a**). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz): δ 0.90 (t, 3H, *J* = 5.7 Hz); 1.27 (s, 26H); 1.42 (s, 2H); 2.44 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz); 3.82 (s, 3H); 4.07 (s, 3H); 5.75 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 14.0, 22.7, 23.1, 28.7, 29.4, 29.5 (6C), 29.7 (4C), 31.9, 56.3, 61.4, 105.4, 130.7, 155.8, 159.0, 182.6, 183.9. Anal. Calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub> C, 73.43; H, 10.27; O, 16.30. C, 72.93; H, 10.07; O, 15.22.

Polvere arancio. Resa: 36% (**26b**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.84 (t, 3H,  $J = 8$  Hz); 1.25 (s, 26H); 1.42 (s, 2H); 2.41 (t, 2H,  $J = 8$  Hz); 3.85 (s, 3H); 5.82 (s, 1H); 7.33 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.3, 22.8, 22.9, 28.2, 29.5, 29.6, 29.7 (4C), 29.8 (5C), 32.1, 56.9, 102.4, 119.5, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_4$  C, 72.98; H, 10.12; O, 16.91. C, 73.12; H, 9.89; O, 17.02.

Polvere rossa. Resa: 55% (**26c**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  0.90 (t, 3H,  $J = 7.90$  Hz); 1.27-1.61 (m, 28H); 2.42 (t, 2H,  $J = 6.30$  Hz); 3.92 (s, 6H); 5.71 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  14.3, 22.8, 22.9, 28.2, 29.5, 29.6, 29.7, 29.8, 32.1, 56.5, 61.6, 100.8, 130.1, 158.7, 166.1, 178.3, 180.3. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{O}_4$  C, 73.43; H, 10.27; O, 16.30. C, 73.12; H, 9.93; O, 15.22.

*(E)*-3-(3,7-dimetilotta-2,6-dienil)-2,5-dimetossi-1,4-benzochinone (**27a**), *(E)*-3-(3,7-dimetilotta-2,6-dienil)-2-idrossi-5-metossi-1,4-benzochinone (**27b**) e *(E)*-3-(3,7-dimetilotta-2,6-dienil)-4,5-dimetossi-1,2-benzochinone (**27c**).

Olio giallo. Resa: 24% (Metodo A), 32% (Metodo B) (**27a**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.60 (s, 3H); 1.68 (s, 3H); 1.81 (s, 3H); 1.92-2.15 (m, 4H), 3.35 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 3.86 (s, 3H); 4.10 (s, 3H); 5.11 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 5.80 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  16.1, 17.7, 21.7, 25.7, 26.4, 39.7, 56.9, 61.5, 102.4, 119.5, 120.1, 123.2, 132.2, 136.5, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_4$  C, 71.03; H, 7.95; O, 21.03. C, 70.63; H, 7.02; O, 20.55.

Olio Arancio. Resa: 28% (**27b**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.60 (s, 3H); 1.68 (s, 3H); 1.76 (s, 3H); 1.92-2.15 (m, 4H), 3.35 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 3.85 (s, 3H); 5.11 (dt, 2H,  $J = 6.9$  Hz, 9Hz); 5.80 (s, 1H), 7.20 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  16.2, 17.7, 21.8, 25.6, 26.5, 39.9, 56.6, 102.0, 118.1, 119.3, 124.2, 131.3, 137.3, 151.3, 161.3, 181.5, 183.1. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4$  C, 70.32; H, 7.64; O, 22.04. C, 70.02; H, 7.85; O, 21.94.

Olio rosso. Resa: 40% (**27c**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.60 (s, 3H); 1.68 (s, 3H); 1.81 (s, 3H); 1.92-2.15 (m, 4H), 3.35 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 3.88 (s, 6H); 5.08 (t, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 5.72 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  16.1, 17.7, 21.7, 25.7, 26.4, 39.7, 54.8, 59.9, 99.9, 108.2, 122.3, 122.8, 127.5, 128.9, 133.2, 135.7, 156.9, 164.4, 176.8, 178.7. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_4$  C, 71.03; H, 7.95; O, 21.03. C, 70.11; H, 7.77; O, 22.43.

2,5-dimetossi-3-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-1,4-benzochinone (**28a**), 2-idrossi-5-metossi-3-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-1,4-benzochinone (**28b**) e 4,5-dimetossi-3-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)-1,2-benzochinone (**28c**).

Olio giallo. Resa: 24% (Metodo A) 35% (Metodo B) (**28a**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  1.58 (s, 3H); 1.60 (s, 3H); 1.68 (s, 3H); 1.81 (s, 3H); 1.92-2.15 (m, 8H), 3.16 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 3.81 (s, 6H); 4.06 (s, 3H); 5.06-5.09 (m, 3H); 5.72 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  16.1 (2C), 17.7, 23.1, 25.7, 26.4, 26.7, 39.7 (2C), 56.9, 61.5, 102.4, 119.5, 120.1, 123.3, 124.2, 132.3, 134.5, 135.6, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$  C, 73.43; H, 10.27; O, 16.30. C, 73.12; H, 9.93; O, 15.22.

Olio arancio. Resa: 31% (**28b**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.60 (s, 3H); 1.62 (s, 3H); 1.68 (s, 3H); 1.81 (s, 3H); 1.92-2.05 (m, 8H), 3.15 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 3.80 (s, 3H); 5.06-5.09 (m, 3H); 5.82 (s, 1H), 7.20 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  16.1 (2C), 17.7, 23.1, 25.7, 26.4, 26.7, 39.7 (2C), 56.9, 102.4, 119.5, 120.1, 123.3, 124.2, 132.3, 134.5, 135.6, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_4$  C, 73.71; H, 8.44; O, 17.85. C, 72.44; H, 8.01; O, 17.41.

Olio rosso. Resa: 67% (**28c**).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz):  $\delta$  1.58 (s, 3H); 1.60 (s, 3H); 1.64 (s, 3H); 1.74 (s, 3H); 1.92-2.15 (m, 8H), 3.15 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz); 3.91 (s, 6H); 5.05-5.09 (m, 2H); 5.70 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz):  $\delta$  13.5, 14.3, 20.7, 24.1, 25.4, 25.5, 28.1, 30.1, 38.3, 54.8, 59.9, 99.9, 118.2, 122.3, 122.8, 127.5, 128.9, 133.2, 135.7, 156.9, 164.4, 176.8, 178.7. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$  C, 74.16; H, 8.66; O, 17.18. C, 73.22; H, 9.03; O, 17.96

#### **Procedura generale per la sintesi dei composti 17d-28d**

I composti **17a-28a**, (0.045 mmol) sono stati sciolti in 2 mL di EtOH. Alla soluzione è stata aggiunto 1,5 mL di soluzione di NaOH 2M. La reazione è stata condotta a 80 °C per 2 ore. Alla miscela, raffreddata a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 5 mL di una soluzione di HCl 2M e 5 mL di EtOAc. Le fasi sono state separate e la fase acquosa è estratta 3 volte con EtOAc (3 volte x 5 mL). Le fasi organiche sono state riunite, anidificate con  $\text{NaSO}_4$  anidro ed evaporate per fornire i prodotti come polveri di colore arancio.

#### **2,5-Diidrossi-3-butil-2,5-cicloesadiene-1,4-dione (17d)**

Resa: (72%)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$  300 MHz)  $\delta$  0.87 (t, 3H,  $J=6$  Hz), 1.22-1.35 (m, 4H), 2.31 (t, 2H,  $J=6$  Hz), 5.78 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz)  $\delta$  14.3, 22.2, 22.6, 30.3, 104.4, 117.9, 155.8, 165.7, 182.3, 183.5. MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M-H}^+$ ) 195.2. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$  C, 61.22; H, 6.16; O, 32.62. C, 61.12; H, 6.37; O, 32.45

#### **2,5-Diidrossi-3-hexyl-2,5-cicloesadiene-1,4-dione (18d)**

Resa. (89%)  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$  300 MHz)  $\delta$  0.83 (t, 3H,  $J=6$  Hz), 1.28-1.41 (m, 6H), 1.43-1.51 (m, 2H), 2.52 (t, 6H,  $J=9$  Hz), 6.01 (s, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz)  $\delta$  14.0, 17.8, 22.6, 23.0, 28.7,

29.5, 105.3, 117.6, 155.8, 165.7, 182.3, 183.5. MS (ESI)  $m/z$  ( $M-H^+$ ) 223.1. Anal. Calcd. for  $C_{12}H_{16}O_4$  C, 64.27; H, 7.19; O, 28.54. C, 64.33; H, 8.02; O, 28.79.

**2,5-Diidrossi-3-ottil-2,5- cicloesadiene -1,4-dione (19d)**

Resa: (80%)  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$  300 MHz)  $\delta$  0.83 (t, 3H,  $J=6$  Hz), 1.28-1.41 (m, 10H), 1.43-1.51 (m, 2H), 2.52 (t, 6H,  $J=9$  Hz), 6.01 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz)  $\delta$  14.0, 17.8, 22.6, 23.0, 28.7, 29.5, 105.3, 117.6, 155.8, 165.7, 182.3, 183.5. MS (ESI)  $m/z$  ( $M-H^+$ ) 253.1. Anal. Calcd. for  $C_{14}H_{20}O_4$  C, 66.65; H, 7.99; O, 25.37. C, 66.33; H, 8.02; O, 24.89.

**2,5-Diidrossi-3-decil-2,5- cicloesadiene -1,4-dione (20d)**

Resa: (81%)  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$  300 MHz)  $\delta$  0.86 (t, 3H,  $J=6$  Hz), 1.24 (s, 14H), 1.35 (br, 2H), 2.25 (t, 2H,  $J=6$  Hz), 5.60 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz)  $\delta$  12.3, 20.4, 26.3, 26.4, 26.6, 26.9, 29.9, 101.3, 105.6, 155.8, 165.7, 182.3, 183.5. Anal. Calcd. for  $C_{16}H_{24}O_4$  C, 68.54; H, 8.63; O, 22.83. C, 68.25; H, 8.96; O, 21.15.

**2,5-Diidrossi-3-dodecil-2,5- cicloesadiene -1,4-dione (22d)**

Resa: (83%)  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$  300 MHz)  $\delta$  0.86 (t, 3H,  $J=6$  Hz), 1.24 (s, 18H), 1.35 (br, 2H), 2.28 (t, 2H,  $J=6$  Hz), 5.77 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz)  $\delta$  14.4, 22.4, 22.5, 28.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 31.8, 104.2, 117.7, 155.8, 165.7, 182.3, 183.5. Anal. Calcd. for  $C_{18}H_{28}O_4$  C, 70.10; H, 9.15; O, 20.75. C, 71.23; H, 8.92; O, 20.33.

**2,5-Diidrossi-3-tridecil-2,5- cicloesadiene -1,4-dione (23d)**

Resa: (78%). I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura. [*J. Org. Chem.* **2007**, 72, 10298-10301]

**2,5-Diidrossi-3-tetradecil-2,5- cicloesadiene -1,4-dione (24d)**

Resa: (76%).  $^1H$  NMR (DMSO- $d_6$  300 MHz)  $\delta$  0.85 (t, 3H,  $J=6$  Hz), 1.24 (s, 22H), 1.35 (br, 2H), 2.27 (t, 2H,  $J=6$  Hz), 5.81 (s, 1H).  $^{13}C$  NMR (DMSO- $d_6$ , 75 MHz)  $\delta$  12.3, 20.3, 21.3, 26.2, 26.4, 26.6, 26.9, 29.9, 101.4, 105.5, 155.8, 165.7, 182.2, 183.7. Anal. Calcd. for  $C_{20}H_{32}O_4$  C, 71.39; H, 9.59; O, 19.02. C, 71.55; H, 9.32; O, 19.33.

**2,5-Diidrossi-3-pentadecil-2,5- cicloesadiene -1,4-dione (25d)**

Resa: (72%). I dati NMR sono in accordo con quanto riportato in letteratura [ *Bioorg Med Chem* **2014**, 22(1), 135-40.]

**2,5-Diidrossi-3-esadecil-2,5- cicloesadiene -1,4-dione (26d)**

Resa: (92%) <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz) δ 0.85 (t, 3H, J=6 Hz), 1.24 (s, 26H), 1.35 (br, 2H), 2.27 (t, 2H, J=6 Hz), 5.81 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz) δ 12.3, 20.3, 21.3, 26.2, 26.4, 26.6, 26.9, 29.9, 101.4, 105.5, 155.8, 165.7, 182.2, 183.7. Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub> C, 72.49; H, 9.95; O, 17.56. C, 71.94; H, 8.05; O, 18.33.

**2,5-Diidrossi-3-((E)-3,7-dimetilotta-2,6-dienil)cicloesa-2,5-diene-1,4-dione (27d)**

Resa (88%) <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz): δ 1.61 (s, 3H); 1.66 (s, 3H); 1.79 (s, 3H); 1.92-2.15 (m, 4H), 3.35 (d, 2H, J = 6.9 Hz); 5.11 (m, 2H); 5.82 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz): δ 16.4, 18.0, 21.7, 25.9, 26.5, 29.5, 29.8, 104.3, 117.0, 121.1, 124.2, 131.1, 135.7, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub> C, 69.54; H, 7.30; O, 23.16. C, 69.15; H, 6.85; O, 22.02

**2,5-Diidrossi-3-((2E,6E)-3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil)cicloesa-2,5-diene-1,4-dione (28d)**

Resa: (85%) <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub> 300 MHz): δ 1.60 (s, 3H); 1.62 (s, 3H); 1.68 (s, 3H); 1.81 (s, 3H); 1.92-2.05 (m, 8H); 4.04 (s, 3H); 5.05 (m, 3H); 5.72 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 75 MHz): δ 16.3, 17.7, 23.1, 25.7, 26.4, 26.7, 39.7, 102.2, 119.6, 120.1, 123.3, 124.2, 132.2, 134.4, 135.6, 151.8, 161.2, 181.9, 183.1. Anal. Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub> C, 73.23; H, 8.19; O, 18.58. C, 71.81; H, 8.76; O, 17.93.

## **Sezione biologica**

### ***Cellule***

I PMNL umani sono stati isolati da concentrati di leucociti provenienti dall'ospedale St. Markus (Francoforte, Germania). In breve, è stata prelevata un'aliquota di sangue venoso da donatori adulti sani ed è stata sottoposta a centrifugazione a 4000g per 20 minuti a 20°C per recuperarne i leucociti concentrati. I PMNL sono stati, poi, rapidamente isolati per sedimentazione con destrano, sottoposti a centrifugazione su cuscinetti di Nycoprep (laboratori PAA, Linz, Austria) seguita dalla lisi ipotonica degli eritrociti. I PMNL ( $7.5 \cdot 10^6$  cellule/mL; purezza > 96-97%) sono stati, infine, risospesi in una soluzione salina, contenente un tampone fosfato, a pH 7.4 (PBS) e poi è stato aggiunto 1 mL di glucosio.

### ***Determinazione della formazione dei prodotti della 5-,12- e 15-Lipossigenasi in cellule intatte***

Per le analisi in cellule intatte, un quantitativo di  $10^7$  PMNL è stato risospeso in 1 mL di PBS addizionato con 1 mg/mL di glucosio e 1 mM di  $\text{CaCl}_2$ . Dopo la preincubazione con i composti indicati (a 37 ° C), la formazione dei prodotti della 5-LOX è stata avviata dall'aggiunta di 2,5  $\mu\text{M}$  dello ionoforo A23187 con o senza AA 20  $\mu\text{M}$ , come indicato. Dopo 10 min a 37 ° C, la reazione è stata bloccata con 1 mL di metanolo, e 30  $\mu\text{L}$  1 N HCl, 200 ng di prostaglandina B1 e 500  $\mu\text{L}$  di PBS sono stati ulteriormente addizionati. I metaboliti della 5-LOX formati sono stati estratti e analizzati mediante HPLC e la loro quantità è espressa in ng di prodotto per  $10^6$  cellule. Tra quelli identificati ricordiamo LTB4 e i suoi *all-trans* isomeri: l'acido 5(S),12(S)-diidrossi-6-10-*trans*-8,14-*cis*-eicosatetraenoico (**5(S),12(S)-DiHETE**), e l'acido 5(S)-idro(pero)ssi-6-*trans*-8,11,14-*cis*-eicosatetraenoico (**5-H(p)ETE**). I Cisteinil-LT (LTC4, D4 e E4) non sono stati rilevati e prodotti di ossidazione di LTB4 non sono stati determinati. La biosintesi del prodotto della 12-LO, l'acido 12(S)-idro(-pero)ssi-5,8-*cis*-10-*trans*-14-*cis*-eicosatetraenoico (**12H(P)ETE**) e della 15-LO, l'acido 15(S)-idro(pero)ssi-5,8,11-*cis*-13-*trans*-eicosatetraenoico (**15-H(P)ETE**) è espressa per ng per  $10^6$  cellule.

### ***Espressione, purificazione della 5-LOX ricombinante umana proveniente da E. coli, e determinazione dell'attività residua della LOX in test cell-free***

La Trasformazione di E. coli BL21 con il plasmide pT3-5LO così come l'espressione e la purificazione della 5-LOX ricombinante sono stati condotti secondo modelli riportati in letteratura. La 5-LOX purificata è stata immediatamente impiegata per il saggio di attività inibitoria. Pertanto, 0,5  $\mu\text{g}$

di enzima purificato sono stati diluiti mediante PBS/EDTA (volume finale di 1 ml) e pre-incubati con i derivati di interesse. Dopo 5-10 min a 4°C i campioni sono stati pre-riscaldati per 30s a 37°C. Fatto ciò, 2mM di CaCl<sub>2</sub> ed l'adeguato apporto di AA vengono addizionati ai campioni per permettere la formazione dei prodotti della 5-LOX. Dopo il tempo di 10min a 37°C la reazione è stoppata ed addizionata di 1ml di metanolo raffreddato in ghiaccio, permettendo l'analisi dei metaboliti mediante HPLC.

## **CONCLUSIONI**

Uno dei problemi principali nella ricerca di inibitori della 5-LOX nell'ultimo decennio, è rappresentato dalla mancanza di sensibilità ( espressa in termini di IC50 nell'intervallo nanomolare e/o inferiore) per inibitori specifici che potrebbero essere impiegati in modelli animali di processi patologici o in studi clinici sperimentali nell'uomo .

I dati ottenuti durante il mio lavoro di tesi hanno permesso di ottenere importanti informazioni di correlazione Struttura-Attività:

- ❖ la sintesi di derivati a **nucleo chinonico** completa gli studi SAR effettuati precedentemente dal gruppo di ricerca a cui afferisco. A tal proposito sono stati sintetizzati 48 composti distinti in **4 serie** (composti 1,2 ortoquinonici e 1,4parabenzochinonici che presentano rispettivamente in posizione 2 e 5 gruppi metossilici ed/o idrossilici) sui quali sono stati condotti test biologici mirati a rilevare la potenza inibitoria di tutti i costituenti delle serie. Tra i composti sintetizzati il più attivo si è dimostrato essere il composto 4,5-dimetossi-3-dodecil-1,2-benzochinone con un valore di IC50 = 29 nM in test cellulari su cellule di polimorfonucleati intatte ( PMNL ) , **un miglioramento di circa 60 volte rispetto al lead l'Embelina;**
- ❖ La sintesi di composti a nucleo catecolico ha permesso di ottenere derivati estremamente potenti nell'inibire l'attività enzimatica, ottenibili mediante processi sintetici MW catalizzati. Tutti I derivati catecolici hanno mostrato valori di IC50 in un range compreso 200 and 500 nM sia in test cellulari che in sistemi cell-free.
- ❖ Infine, nell'ambito dei composti a **nucleo indolico e benzoindolico** lo studio di SAR ha interessato la valutazione della sostituzione in posizione 2 di gruppi feniltimetilici variamente sostituiti, l'estensione della porzione aromatica e la metilazione dell'azoto indolico. Da un'analisi dei dati ottenuti, secondo la quale la maggior parte dei composti



saggiati, presenta valori di IC50 inferiori al  $\mu\text{M}$ , si è evinto che in riferimento ai lead l'introduzione di gruppi feniltimetilici aventi entrambi le posizioni orto-occupate (soprattutto se da alogeni) è vantaggiosa ai fini dell'attività così come l'estensione della porzione aromatica. La possibilità di un approccio di inibizione duale sarà certamente di aiuto a svelare i meccanismi alla base degli effetti indesiderati di FANS e di sviluppare FANS più sicuri .

Allo stato attuale, però, più lavoro deve essere svolto per analizzare i meccanismi d'azione dei *pathway* in cui la 5LO si trova implicata, facendo ricorso ad uno studio multidisciplinare su più fronti che permetta di ottenere potenti inibitori, impiegabili per la cura di processi patologici acuti e cronici quali l'asma bronchiale.

**BIBLIOGRAFIA**

- Abramovitz, M.**, Wong, E., Cox, M.E., Richardson, C.D., Li, C. & Vickers, P.J. (1993), 5-Lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur. J. Biochem.*, 215, 105–111.
- Anderson, K. M.**, Alrefai, W.A., Bonomi, P.A., Anderson, C.A., Dudeja, P.& Harris, J.E. (2000). A genomic response of H-358 bronchiolar carcinoma cells to MK 886, an inhibitor of 5-lipoxygenase, assessed with a cDNA array. *Anticancer Res.*, 20, 2433–2439.
- Anderson, K. M.**, Seed, T., Vos, M., Mulshine, J., Meng, J., Alrefai, W., (1998). 5-Lipoxygenase inhibitors reduce PC-3 cell proliferation and initiate nonnecrotic cell death. *Prostate*, 37, 161–173.
- Araico, A.**, Terencio, M.C., Alcaraz, M.J., (2006) Phenylsulphonyl urenyl chalcone derivatives as dual inhibitors of cyclooxygenase- 2 and 5-lipoxygenase. *Life Sci* 78,2911-8
- Avis, I.**, Hong, S.H., Martinez, A., Moody, T., Choi, Y.H., Trepel, J., (2001). Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J* 15, 2007–2009.
- Avis, I.M.**, Jett, M., Boyle, T., Vos, M.D., Moody, T., Treston, A.M., (1996). Growth control of lung cancer by interruption of 5-lipoxygenase mediated growth factor signaling. *J. Clin. Invest.* 97, 806–813.
- Back, M.** ,(2009) Inhibitors of the 5-lipoxygenase pathway in atherosclerosis. *Curr. Pharm. Des.* 15, 3116-32
- Bell, R. L.**, Young, P. R., Albert, D., Lanni, C., Summers, J. B., Brooks, D. W.,(1992). The discovery and development of zileuton: an orally active 5-lipoxygenase inhibitor. *Int. J. Immunopharmacol.* 14, 505–510.

- Bellido-Reyes, Y.A.**, Akamatsu, H., Kojima, K., (2006) Cytosolic phospholipase A2 inhibition attenuates ischemia-reperfusion injury in an isolated rat lung model. *Transplantation* 81,1700-7
- Boado, R. J.**, Pardridge, W. M., Vinters, H. V. & Black, K. L. (1992).Differential expression of arachidonate 5-lipoxygenase transcripts in humanbrain tumors: evidence for the expression of a multitranscript family. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, U S A 89, 9044–9048
- Boeglin, W.E.**, Kim, R.B. and Brash, A.R. (1998) A 12R-lipoxygenase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 95, 6744-6749
- Brash, A. R.** (1999) Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 23679-23682
- Brash, A.R.**, Boeglin, W.E. and Chang M. (1997) Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans.*Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 94, 6148-6152.
- Brash, A.R.**, Boeglin, W.E., Chang, M.S. e Shieh, B.H. (1996) Purification and molecular cloning of an 8R-lipoxygenase from the coral *Plexaura homomalla* reveal the related primary structures of R- and S-lipoxygenases *J.Biol. Chem.* 271, 20949-20957
- Brink, C.**, Dahlen,S. E. Drazen, J., Evans, J. F., Hay, D. W., Nicosia, S., (2003). International Union of Pharmacology: XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol. Rev.* 55, 195–22
- Brooks, C.D.W.**, Stewart, A.O., Basha, A., (1995) R-(p)-N-[3-[5-(4-Fluorophenyl) methyl]-2-thienyl]-1-methyl-2-propynyl]-N-hydroxyurea (ABT-761), a second generation 5-lipoxygenase inhibitor. *J. Med. Chem* 38, 4768-75
- Celotti, F.**, Laufer, S.,(2001) Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol. Res.* 43,429-36

- Chen X. S.,** Funk, C.D., (2001). The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J. Biol. Chem.* 276, 811
- Chen, Q.H.,** Rao, P.N., Knaus, E.E. (2006) Synthesis and biological evaluation of a novel class of rofecoxib analogues as dual inhibitors of cyclooxygenases (COXs) and lipoxygenases (LOXs). *Bioorg. Med. Chem.* 14, 7898-909
- Chen, X. S.,** Zhang, Y. Y., Funk, C. D., (1998) Determinants of 5-lipoxygenase nuclear localization using green fluorescent protein/5-lipoxygenase fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 273, 31237
- Chen, X.,** Li, N., Wang, S., Wu, N., Hong, J., Jiao, X., (2003). Leukotriene A4 hydrolase in rat and human esophageal adenocarcinomas and inhibitory effects of bestatin. *J Natl Cancer Inst* 95, 1053–1061.
- Chen, X.,** Wang, S., Wu, N., & Yang, C. S. (2004). Leukotriene A4 hydrolase as a target for cancer prevention and therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* 4, 267–283.
- Chowdhury, M.A.,** Abdellatif, K.R., Dong, Y., (2008a) Synthesis of celecoxib analogs that possess a N-hydroxypyrid-2(1H)one 5-lipoxygenase pharmacophore: biological evaluation as dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett*;18, 6138-41
- Chowdhury, M.A.,** Abdellatif, K.R., Dong, Y., (2009a) Synthesis of celecoxib analogues possessing a N-difluoromethyl-1,2-dihydropyrid-2-one 5-lipoxygenase pharmacophore: biological evaluation as dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. *J. Med. Chem.*;52 ,1525-9
- Chowdhury, M.A.,** Abdellatif, K.R., Dong, Y., (2009b) Synthesis of 1-(methanesulfonyl- and aminosulfonylphenyl)acetylenes that possess a 2-(N-difluoromethyl- 1,2-dihydropyridin-2-one) pharmacophore: evaluation as dual inhibitors of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase with anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem Lett*;19, 584-8

- Chowdhury, M.A.,** Chen, H., Abdellatif, K.R., (2008b) Synthesis and biological evaluation of 1-(benzenesulfonamido)-2-[5-(N-hydroxypyridin-2(1H)-one)] acetylene regioisomers: a novel class of 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*;18, 4195-8
- Claesson, H. E. & Dahlen, S. E. (1999).** Asthma and leukotrienes: antileukotrienes as novel anti-asthmatic drugs. *J. Intern. Med.* 245, 205–227.
- Conrad, D.J,** Kühn, H., Mulkins, M., Highland, E. e Sigal, E. (1992) Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 89,217-221
- Cortes-Burgos, L.A.,** Zweifel, B.S., Settle, S.L., (2009) CJ-13610, an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase is efficacious in preclinical models of pain. *Eur. J. Pharmacol.* 617,59-67
- Dahlén, S. E.,** Björk, J., Hedqvist, P., Arfors, K. E., Hammarström, S., Lindgren, J.Å.,(1981). Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3887–3891
- Dahlén, S.E. (2006)** Treatment of asthma with antileukotrienes : First line or last resort therapy? *Eur. J. of Pharm.* 533, 40-56
- Davidson, E. M.,** Rae, S. A. & Smith, M. J. H. (1983). Leukotriene B<sub>4</sub>, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 42, 677–679.
- De Petrocellis, L.** and Di Marzo, V. (1994) Prostaglandins Leukotrienes. *Essent. Fatty Acids* 51, 215-229
- Degreef, H.,** Dockx, P., De Doncker, P., De Beule, K. & Cauwenbergh, G.(1990). A double-blind vehicle-controlled study of R 68 151 in psoriasis: a topical 5-lipoxygenase inhibitor. *J Am Acad. Dermatol.* 22, 751–755.

- Ding, X. Z.,** Iversen, P., Cluck, M. W., Knezetic, J. A. & Adrian, T. E. (1999). Lipoxigenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 218–223.
- Ding, X. Z.,** Talamonti, M. S., Bell, R. H. Jr. & Adrian, T. E. (2005). A novel anti-pancreatic cancer agent, LY293111. *Anticancer Drugs* 16, 467–473.
- Dixon, R. A. F.,** Diehl, R. E., Opas, E., Rands, E., Vickers, P. J., Evans, J. F., (1990). Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 343, 282–284.
- Doiron, J.,** Boudreau, L.H., Picot, N., (2009) Synthesis and 5-lipoxygenase inhibitory activity of new cinnamoyl and caffeoyl clusters. *Bioorg. Med. Chem. Lett*;19, 1118-21
- el-Hakim, I. E.,** Langdon, J. D., Zakrzewski, J. T. & Costello, J. F. (1990).Leukotriene B4 and oral cancer. *Br. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 28, 155–159.
- Evans, J.F.,** Ferguson, A.D., Mosley, R.T., (2008)What’s all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 29:72-8
- Fan, X. M.,** Tu, S. P., Lam, S. K., Wang, W. P., Wu, J., Wong, W. M., (2004). 5-Lipoxygenase-activating protein inhibitor MK-886 induces apoptosis in gastric cancer through upregulation of p27kip1 and bax. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19, 31–37
- Feldberg, W., & Kellaway, C. H. (1938).** Liberation of histamine and formation of lysocithin-like substances by cobra venom. *J. Physiol.* 94, 187–226.
- Ferguson, A.D.,** McKeever, B.M., Xu, S.,(2007) Crystal structure of inhibitorbound human 5-lipoxygenase-activating protein. *Science* 317,510-2
- Ferry, D. R.,** Deakin, M., Baddeley, J., Daryanani, S., Bramhall, S., Anderson, D. A., (2000). A phase II study of the 5-lipoxygenase inhibitor, CV6504, in advanced pancreatic cancer:

correlation of clinical data with pharmacokinetic and pharmacodynamic endpoints. *Ann. Oncol.* 11, 1165–1170.

**Feuerstein, G. (1984).** Leukotrienes and the cardiovascular system. *Prostaglandins* 27, 781–802.

**Fischer, L., Hornig, M., Pergola, C., (2007)** The molecular mechanism of the inhibition by licofelone of the biosynthesis of 5-lipoxygenase products. *Br. J. Pharmacol.* 152, 471-80

**Fischer, L. D. Szellas, O. Radmark, D. Steinhilber, O. Werz, (2003)** Phosphorylation and stimulus-dependent inhibition of cellular 5-lipoxygenase activity by nonredox-type inhibitors, *Faseb J.* 17 949e995.

**Fischer, L., Steinhilber, D., Werz, O. (2004)** Molecular pharmacological profile of the nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor CJ-13,610. *Br. J. Pharmacol.* 142, 861-8

**Fitzgerald, G.A.,(2004).** Coxibs and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 351,1709–1711.

**Flamand, N., Surette, M. E., Picard, S., Bourgoin, S. & Borgeat, P. (2002).** Cyclic AMP-mediated inhibition of 5-lipoxygenase translocation and leukotriene biosynthesis in human neutrophils. *Mol. Pharmacol.* 62, 250–256.

**Ford-Hutchinson, AW, Gresser, M., Young, R.N. (1994)** 5-Lipoxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 63,383-417

**Funk, C.D. (1996).** The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 1304, 65–84.

**Funk, C.D., (2001)** Prostaglandins and leukotrienes, advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871–1875.

**Funk, C.D., Hoshiko, S., Matsumoto, T., Rådmark, O., Samuelsson, B., (1989).** Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 2587–2591

- Gerwick, W.H. (1994)** Structure and biosynthesis of marine algal oxylipins *Biochim. Biophys. Acta.* 1211, 243-255
- Ghosh, J. & Myers, C. E. (1997).** Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 418–423.
- Ghosh, J. & Myers, C. E. (1998).** Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 13182–13187.
- Gilbert, N.C., Bartlett, S.G. Waight, M.T., Neau, D.B., Boeglin, W.E., Brash, A.R., Newcomer, M.E. (2011)** The structure of human 5-lipoxygenase The structure of human 5-lipoxygenase *Science* vol.331, 217-219
- Goethe-Universität J.W., Main, Fa. (2009)** 5-Arylkylidene-2-arylalkyl-thiazol-4-one derivatives as inhibitors of 5-lipoxygenase and uses thereof. WO/2009/027077
- Griffiths, R. J., Smith, M. A., Roach, M. L., Stock, J. L., Stam, E. J., Milici, A. J.,(1997).** Collagen-induced arthritis is reduced in 5-lipoxygenaseactivating protein-deficient mice. *J. Exp. Med* 185, 1123–1129.
- Grimm, E.L., Brideau, C., Chauret, N., (2006)** Substituted coumarins as potent 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 2528-31
- Hamberg, M. and Samuelsson,B. (1974)** Synthesis and biological properties of a 9,11-azoprostanoid: Highly active biochemical mimic of prostaglandin endoperoxides *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 3400-3404
- Hammarberg, T., Reddy, K. V., Persson, B., Rådmark, O., (2002).** Calcium binding to 5-lipoxygenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 507, 117



- Hawkey, C. J.,** Dube, L. M., Rountree, L. V., Linnen, P. J. & Lancaster, J. F.(1997). A trial of zileuton versus mesalazine or placebo in the maintenance of remission of ulcerative colitis. *Gastroenterology* 112, 718–724.
- Haynes, J.Jr.,** Baliga, B. S., Obiako, B., Ofori-Acquah, S. & Pace, B. (2004). Zileuton induces hemoglobin F synthesis in erythroid progenitors: role of the L-arginine-nitric oxide signaling pathway. *Blood*, 103,3945–3950.
- Hennig, R.,** Ding, X. Z., Tong, W. G., Schneider, M. B., Standop, J., Friess, H., (2002). 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am. J. Pathol.*, 161, 421–428.
- Hoque, A.,** Lippman, S. M., Wu, T. T., Xu, Y., Liang, Z. D., Swisher, S., (2005). Increased 5-lipoxygenase expression and induction of apoptosis by its inhibitors in esophageal cancer: a potential target for prevention. *Carcinogenesis* 26, 785–791
- Hörnig, C.,** Albert, D., Fischer, L., Hörnig, M., Rådmark, O., Steinhilber, D., (2005). 1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol stimulates 5-lipoxygenase activity via a putative (phospho)lipid binding site within the N-terminal C2-like domain. *J. Biol. Chem.* 280, 26913–26921.
- Irvin, C.G.,** Tu, Y. P., Sheller, J. R. & Funk, C. D. (1997). 5-Lipoxygenase products are necessary for ovalbumin-induced airway responsiveness in mice. *Am. J. Physiol.* 16, L1053–L1058
- Iversen, L.,** Fogh, K., Ziboh ,V.A., Kristensen, P., Schmedes, A. & Kragballe, K. (1993). Leukotriene B4 formation during human neutrophil keratinocyte interactions: evidence for transformation of leukotriene A4 by putative keratinocyte leukotriene A4 hydrolase. *J. Invest. Dermatol.* 100, 293–298.

- Janssen-Timmen, U.**, Vickers, P. J., Wittig, U., Lehmann, W. D., Stark, H. J., Fusenig, N. E., (1995). Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6966–6970.
- Jisaka, M.**, Kim, R.B., Boeglin, W.E., Nanney, L.B. and Brash, A.R. (1997) *J.Biol.Chem.* 272, 24410-24416
- Kaaman, M.**, Ryden, M., Axelsson, T., Nordstrom, E., Sicard, A., Bouloumie, A.,(2005). ALOX5AP expression, but not gene haplotypes, is associated with obesity and insulin resistance. *Int. J. Obes.* 30, 447–452.
- Kanaoka, Y.** & Boyce, J. A. (2004). Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J. Immunol.* 173, 1503–1510.
- Karg, E.M.**, Luderer, S., Pergola, C., (2009) Structural optimization and biological evaluation of 2-substituted 5-hydroxyindole-3-carboxylates as potent inhibitors of human 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 52 3474-83
- Kennedy, T. J.**, Chan, C. Y., Ding, X. Z. & Adrian, T. E. (2003). Lipoxygenase inhibitors for the treatment of pancreatic cancer. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 3, 525–536.
- Klickstein, L. B.**, Shapleigh, C., & Goetzl, E. J. (1980). Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *J. Clin. Invest.* 66, 1166–1170.
- Knapp, M. J.**, Klinman, J. P., (2003). Kinetic studies of oxygen reactivity in soybean lipoxygenase-1, *Biochemistry* 42, 11466
- Knapp, M. J.**, Seebeck, F. P., Klinman, J. P., (2001). Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1, *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2931

- Koeberle, A., Zettl, H., Greiner, C., (2008)** Pirinixic acid derivatives as novel dual inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 51, 8068-76
- Koeberle, A., Bauer, J., Verhoff, M., (2009b)** Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits microsomal prostaglandin E(2) synthase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 350-4
- Koeberle, A., Haberl, E.M., Rossi, A., (2009a)** Discovery of benzo[g]indol-3-carboxylates as potent inhibitors of microsomal prostaglandin E(2) synthase-1. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 7924-32
- Koeberle, A., Northoff, H., Werz, O. (2009a)** Curcumin blocks prostaglandin E2 biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Mol. Cancer. Ther.* 8, 2348-55
- Koeberle, A., Siemoneit, U., Buhning, U., (2008)** Licofelone suppresses prostaglandin E2 formation by interference with the inducible microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 326, 975-82
- Koeberle, A., Siemoneit, U., Northoff, H., (2009)** MK-886, an inhibitor of the 5-lipoxygenase-activating protein, inhibits cyclooxygenase-1 activity and suppresses platelet aggregation. *Eur. J. Pharmacol.* 608, 84-90
- Koeberle, A., & Werz O. (2009)** Inhibitors of the Microsomal Prostaglandin E(2) Synthase-1 as Alternative to Non Steroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) - A Critical Review. *Curr. Med. Chem.*
- Kühn, H and Borngraber, S (1999)** Mammalian 15-lipoxygenases. Enzymatic properties and biological implications. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447:5-28;
- Kuhn H., Thiele, B.J., (1999)** The diversity of Lipoxigenase family, *FEBS Lett.* 449 7-11

- Kulkarni S.,** Das, S., Funk, C. D., Murray, D. & Cho, W. (2002). Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 277, 13167–13174.
- Kulkarni, S.,** Das, S., Funk, C. D., Murray, D., Cho W., (2002). Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase *J. Biol. Chem.* 277, 13167
- Kulkarni, S.K.,** Singh, V.P. (2008) Licofelone: the answer to unmet needs in osteoarthritis therapy? *Curr. Rheumatol. Rep.* 10, 43-8
- Landwehr, J.,** George, S., Karg, E.M., (2006) Design and synthesis of novel 2-amino-5-hydroxyindole derivatives that inhibit human 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.* 49, 4327-32
- Laufer, S.,** Tries, S., Augustin, J., (1994) Pharmacological profile of a new pyrrolizine derivative inhibiting the enzymes cyclo-oxygenase and 5-lipoxygenase. *Arzneimittelforschung* 44, 629-36
- Lehnigk, B.,** Rabe, K.F., Dent, G., ,(1998) Effects of a 5-lipoxygenase inhibitor, ABT-761, on exerciseinduced bronchoconstriction and urinary LTE4 in asthmatic patients. *Eur. Respir. J.* 11,617-23
- Letts, L. G.** (1987). Leukotrienes: role in cardiovascular physiology. *Cardiovasc Clin* 18, 101–113.
- Levy, B.D.,** Romano, M., Chapman, H.A., Reilly, J.J., Drazen, J. and Serhan, C.N. (1993) Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins *J. Clin. Invest.* 92, 1527-1579
- Lewis, R. A.,** Austen, K. F. & Soberman, R. J. (1990). Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway—biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N. Engl. J. Med.* 323, 645–655.

- Li, L.,** Ji, H., Sheng, L., (2009) The anti-inflammatory effects of ZLJ-6, a novel dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 607, 244-50
- Li, N.,** Sood, S., Wang, S., Fang, M., Wang, P., Sun, Z., (2005). Overexpression of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 2 in hamster and human oral cancer and chemopreventive effects of zileuton and celecoxib. *Clin. Cancer Res.* 11, 2089–2096
- Liedtke, A.J.,** Keck, P.R., Lehmann, F., (2009b) Arylpyrrolizines as inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 (mPGES-1) or as dual inhibitors of mPGES-1 and 5-lipoxygenase (5-LOX). *J. Med. Chem.* 52, 4968-72
- Lotzer, K.,** Spanbroek, R., Hildner, M., Urbach, A., Heller R., Bretschneider E.,(2003). Differential leukotriene receptor expression and calcium responses in endothelial cells and macrophages indicate 5-lipoxygenase-dependent circuits of inflammation and atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, e32–e36.
- Luo, M.,** Jones, S. M., Flamand, N., Aronoff, D. M., Peters-Golden, M., & Brock, T. G., (2005). Phosphorylation by protein kinase A inhibits nuclear import of 5-lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 280, 40609–40616.
- Luo, M.,** Jones, S. M., Peters-Golden, M. & Brock, T. G. (2003). Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 12165–12170.
- Luo, M.,** Jones, S. M., Phare, S. M., Coffey, M. J., Peters-Golden, M. & Brock, T. G. (2004). Protein kinase A inhibits leukotriene synthesis by phosphorylation of 5-lipoxygenase on serine 523. *J. Biol. Chem.* 279, 41512–41520.
- Maccarone, M.,** Melino, G., Finazzo-Agrò, A., (2001) Lipoxygenases and their involvement in programmed cell death. *Nature.* 776-784,

- Maier, T.J.**, Tausch, L., Hoernig, M., (2009) Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. *Biochem. Pharmacol.* 76, 862-72
- Mano, T.**, Stevens, R.W., Ando, K., (2005) Optimization of imidazole 5-lipoxygenaseinhibitors and selection and synthesis of a development candidate. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 53, 965-73
- Matsuyama, M.**, Yoshimura, R., Mitsuhashi, M., Tsuchida, K., Takemoto, Y., Kawahito, Y.,(2005). 5-Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human renal cell carcinoma and induce apoptosis through arachidonic acid pathway. *Oncol. Rep.* 14, 73–79.
- McGill, K. A. & Busse, W. W.** (1996). Zileuton. *Lancet* 348, 519–524.
- McMillan, R.M.** (2001). Leukotrienes in respiratory disease. *Paediatr. Respir. Rev.* 2, 238–244.
- McMillan, R.M.**, Walker, E.R.H. (1992) Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* 13,323-30
- Mehrabian, M.**, Allayee, H., Stockton, J., Lum, P. Y., Drake, T. A., Castellani, L. W., (2005). Integrating genotypic and expression data in a segregating mouse population to identify 5-lipoxygenase as a susceptibility gene for obesity and bone traits. *Nat. Genet.* 37, 1224–1233.
- Miller, D. K.**, Gillard, J. W., Vickers, P. J., Sadowski, S., Léveillé, C., Mancini, J. A.,(1990). Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature* 343, 278–281.
- Minor, W.**, Steczko J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin J.T., Walter, R. e Axelrod, B. (1996) Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 Å resolution *Biochemistry* 35, 10687-10701.
- Mizuno, C. S.**; Rimando, A. M.; Duke, S. O. (2010), Phytotoxic Activity of Quinones and Resorcinolic Lipid Derivatives. *J Agr Food Chem* 58, 4353-4355.

- Murphy, R. C.,** Hammarström, S., & Samuelsson, B. (1979). Leukotriene C: a slow reacting substance from murine mastocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 76, 4275–4279.
- Myers, C. E. & Ghosh, J. (1999).** Lipoxygenase inhibition in prostate cancer. *Eur. Urol.* 35, 395–398.
- Nagase, T.,** Uozumi, N., Aoki-Nagase, T.,(2003)A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A2, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*284, L720-6
- Nakano, R.,** Oka, M., Nakamura, T., Fukuda, M., Kawabata, S., Terashi, K., (1998). A leukotriene receptor antagonist, ONO-1078, modulates drug sensitivity and leukotriene C4 efflux in lung cancer cells expressing multidrug resistance protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 307–312.
- Nelson, M.J.,** Cowling, R.A. and Seitz, S.P. (1994) The structure and function of lipoxygenase *Biochemistry* 33, 4966-4973
- Neu, I.,** Mallinger, J., Wildfeuer, A., & Mehlber, L. (1992). Leukotrienes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Acta. Neurol. Scand.* 86,586–587.
- Okuno, T.,** Yokomizo, T., Hori, T., Miyano, M. & Shimizu, T. (2005). Leukotriene B4 receptor and the function of its helix 8. *J. Biol. Chem.* 280, 32049–32052.
- Owman, C.,** Nilsson, C. & Lolait, S. J. (1996). Cloning of cDNA encoding a putative chemoattractant receptor. *Genomics* 37, 187–194.
- Plante, H.,** Picard, S., Mancini, J. & Borgeat, P. (2006). 5-Lipoxygenaseactivating protein homodimer in human neutrophils: evidence for a role in leukotriene biosynthesis. *Biochem. J.* 393, 211–218.

- Przylipiak, A.,** Hafner, J., Przylipiak, J., Kohn, F. M., Runnebaum, B. & Rabe, T. (1998). Influence of 5-lipoxygenase on in vitro growth of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Gynecol. Obstet. Invest.* 46, 61–64.
- Rao, P.N.,** Chen, Q.H., Knaus, E.E. (2006) Synthesis and structure-activity relationship studies of 1,3-diarylprop-2-yn-1-ones: dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *J. Med. Chem.* 49, 1668-83
- Rapoport, S.M.,** Schewe, T. and Thiele, B.J. (1990) Shape and Specificity in Mammalian 15-Lipoxygenase Active Site *Blood cell Biochem.* 1, 151-194
- Roberts, W. G.,** Simon, T. J., Berlin, R. G., Haggitt, R. C., Snyder, E. S., Stenson, W. F., (1997). Leukotrienes in ulcerative colitis: results of a multicenter trial of a leukotriene biosynthesis inhibitor, MK-591. *Gastroenterology* 112, 725–732.
- Romano, M.,** Catalano, A., Nutini, M., D'Urbano, E., Crescenzi, C., Claria, J. (2001). 5-Lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor. *FASEB J.* 15, 2326–2336.
- Safayhi, H.,** Mack, T., Sabieraj, J., (1992) Boswellic acids: novel, specific, nonredox inhibitors of 5-lipoxygenase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 1143-46
- Samuelsson, B.,** Dahlén, S.-E., Lindgren, J. -Å., Rouzer, C. A. & Serhan, C. N. (1987). Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 237, 1171–1176
- Schewe, T.,** Halangk, W., Hiebsch, C. e Rapoport, S.M. (1975) *FEBS Lett.* 60, 149-152.
- Scholz, M.,** Ulbrich, H.K., Soehnlein, O., (2009) Diaryl-dithiolanes and -isothiazoles: COX-1/COX-2 and 5-LOX-inhibitory, \*OH scavenging and antiadhesive activities. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 558-68



- Sengupta, K.,** Alluri, K.V., Satish, A.R.,(2008) A double blind, randomized, placebo controlled study of the efficacy and safety of 5-Loxin for treatment of osteoarthritis of the knee. *Arthritis Res. Ther.* 10,R85
- Serhan, C. (1999).** Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins. In J. L. Gallin, & R. Syndermann (Eds.), *Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates. Philadelphia: Lipincott Williams and Williams.*
- Sharon, P., & Stenson, W. F. (1984).** Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 86, 453–460
- Shirumalla, R.K.,** Naruganahalli, K.S., Dastidar, S.G. (2006). RBx 7,796: A novel inhibitor of 5-lipoxygenase. *Inflamm. Res.* ;55, 517-27
- Shirumalla, R.K.,** Sharma, P., Dastidar, S.G., (2008) Pharmacodynamic and pharmacokinetic characterisation of RBx 7796: a novel 5-lipoxygenase inhibitor. *Inflamm. Res.* ;57, 135-43
- Siemoneit, U.,** Pergola, C., Jazzar, B.,(2009) On the interference of boswellic acids with 5-lipoxygenase: mechanistic studies in vitro and pharmacological relevance. *Eur. J. Pharmacol.* 606, 246-54
- Sjöström, M.,** Johansson, A. S., Schröder, O., Qiu, H., Palmblad, J. & Haeggström, J. Z. (2003). Dominant expression of the CysLT2 receptor accounts for calcium signaling by cysteinyl leukotrienes in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, e37–e41.
- Spanbroek, R.,** Stark, H. J., Janßen-Timmen, U., Kraft, S., Hildner, M., Andl, T (1998). 5-Lipoxygenase expression in Langerhans cells of normal human epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 663–668.

- Steinhilber, D. (1994).** 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm. Acta. Helv.* 69, 3–14
- Steinhilber, D. (1999).** 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited. *Curr. Med. Chem.* 6, 69–83.
- Steinhilber, D., Hoshiko, S., Grunewald, J., Rådmark, O. & Samuelsson, B. (1993).** Serum factors regulate 5-lipoxygenase activity in maturing HL-60 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1178, 1–8.
- Sud'ina, G.F., Pushkareva, M.A., Shephard, P., (2008)** Cyclooxygenase (COX) and 5-lipoxygenase (5-LOX) selectivity of COX inhibitors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* ;78, 99-108
- Sun, D., McDonnell, M., Chen, X.S., Lakkis M., Li, H., Isaacs, S.N., Elsea, S.H., Patel, P.I. e Funk, C.D. (1998)** Human 12(R)-lipoxygenase and the mouse ortholog. Molecular cloning, expression, and gene chromosomal assignment *J.Biol.Chem.* 273, 33540-33547.
- Tahitian Noni International. (2008)** Lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition. WO/2008/067410
- Tai, N., Kuwabara K., Kobayashi M.,(2009)** Cytosolic phospholipase A2 alpha inhibitor, pyrroxyphene, displays anti-arthritic and anti-bone destructive action in a murine arthritis model. *Inflamm Res*
- Tong, W. G. D., Ding, X. Z. & Adrian, T. (2002c).** The leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 induces S-phase arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Pancreas* 25, 453.

- Tong, W. G.,** Ding, X. Z., Hennig, R., Witt, R. C., Standop, J., Pour, P. M.,(2002a). Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer. Res.* 8,3232–3242.
- Tong, W. G.,** Ding, X. Z., Witt, R. C. & Adrian, T. E. (2002b). Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol. Cancer. Ther.* 1, 929–935.
- Tries, S.,** Neupert, W., Laufer, S. (2002) The mechanism of action of the new antiinflammatory compound ML3000: inhibition of 5-LOX and COX-1/2. *Inflamm. Res.* 51,135-43
- Uhl, J.,** Klan, N., Rose, M., Entian, K. D., Werz, O., & Steinhilber, D. (2002).The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *J. Biol.Chem.* 277, 4374–4379.
- Uozumi, N.,** Kume, K., Nagase, T., (1997) Role of cytosolic phospholipase A(2) in allergic response and parturition. *Nature* 390:618-22
- van de Kerkhof, P. C.,** van Pelt, H., Lucker, G. P. Steijlen, P. M. & Heremans, A. (1996). Topical R-85355, a potent and selective 5-lipoxygenase inhibitor, fails to improve psoriasis. *Skin Pharmacol.* 9, 307–311.
- Vila, L. (2004).** Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase pathways in the vessel wall: role in atherosclerosis. *Med. Res. Rev.* 24, 399–424.
- Wachtershauser, A.,** Steinhilber, D., Loitsch, S. M. & Stein, J. (2000). Expression of 5-lipoxygenase by human colorectal carcinoma Caco-2 cells during butyrate-induced cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 778–783.
- Weinblatt, M. E.,** Kremer, J. M., Coblyn, J. S., Helfgott, S., Maier, A. L., Petrillo, G., (1992). Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 19, 1537–1541.

- Weitzel, F. & Wendel, A. (1993).** Selenoenzymes regulate the activity of leukocyte 5-lipoxygenase via the peroxide tone. *J. Biol. Chem.* 268, 6288–6292.
- Werz, O. & Steinhilber, D. (1996).** Selenium-dependent peroxidases suppress 5-lipoxygenase activity in B-lymphocytes and immature myeloid cells the presence of peroxidase-insensitive 5-lipoxygenase activity in differentiated myeloid cells. *Eur. J. Biochem.* 242, 90–97.
- Werz, O. (2002).** 5-Lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy.* 1, 23–44.
- Werz, O., & Steinhilber, D. (2005).** Pharmacological intervention with 5-lipoxygenase: new insights and novel compounds. *Expert. Opin. Ther. Patents.* 15, 505–519
- Werz, O., Bürkert, E., Fischer, L., Szellas, D., Dishart, D., Samuelsson, B., (2002a).** Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *FASEB J.* 16, 1441–1443.
- Werz, O., Bürkert, E., Rådmark, O. & Steinhilber, D. (2002b).** Activation of 5-lipoxygenase by cell stress is calcium independent in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 99, 1044–1052.
- Werz, O., Greiner, C., Koeberle, A., (2008)** Novel and potent inhibitors of 5-lipoxygenase product synthesis based on the structure of pirinixic acid. *J. Med. Chem.*;51, 5449-53
- Werz, O., Schneider, N., Brungs, M., Sailer, E. R., Safayhi, H., Ammon, H. P. T., (1997).** A test system for leukotriene synthesis inhibitors based on the in-vitro differentiation of the human leukemic cell lines HL-60 and Mono Mac 6. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 356, 441–445.

- Werz, O.,** Steinhilber, D., (2007) Development of 5-lipoxygenase inhibitors-lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem. Pharmacol.* 70,327-33
- Werz, O.,** Steinhilber, D., (2006) Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* 112, 701-718.
- Werz, O.,** Szellas, D., Steinhilber, D. & Rådmark, O. (2002c). Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). *J. Biol. Chem.* 277, 14793–14800.
- Whitney, L.W.,** Ludwin, S.K., McFarland, H.F. & Biddison, W.E. (2001). Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J. Neuroimmunol.* 121, 40–48.
- Woodmansee, D. P., & Simon, R. A. (1999).** A pilot study examining the role of zileuton in atopic dermatitis. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 83, 548–552.
- Xu, G.L.,** Liu, F., Ao, G.Z., (2009b) Anti-inflammatory effects and gastrointestinal safety of NNU-hdpa, a novel dual COX/5-LOX inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 611,100-6
- Xu, G.L.,** Liu, F., Zhao, Y., (2009a) Biological evaluation of 2-(4-amino-phenyl)- 3-(3,5-dihydroxyphenyl) propenoic acid. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 105, 350-6
- Yokomizo, T.,** Izumi, T., Chang, K., Takuwa, Y. & Shimizu, T. (1997). A Gprotein- coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 387, 620–624.
- Zheng, M.,** Zhang, Z., Zhu, W., (2006). Essential structural profile of a dual functional inhibitor against cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX): molecular docking and 3D-QSAR analyses on DHDMBF analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 3428-37

**Zhi, H.**, Zhang, J., Hu, G., Lu, J., Wang ,X., Zhou, C., (2003). The deregulation of arachidonic acid metabolism-related genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer.* 106, 327–333.

**Zouboulis, C. C.**, Nestoris, S., Adler, Y. D., Orth, M., Orfanos, C. E., Picardo, M., (2003). A new concept for acne therapy: a pilot study with zileuton, an oral 5-lipoxygenase inhibitor. *Arch. Dermatol.* 139, 668–670.

---

### Dico grazie...

- ❖ A chi ha permesso che tutto questo potesse accadere, a chi ha saputo affiancarmi, guidarmi e portarmi "per mano" in questo lungo e tortuoso percorso. Ha chi ha saputo spronarmi non senza screzi, lacrime e "strigliate". Alla mia Prof, Rosanna Filosa, dico grazie dal più profondo del cuore. Devo a lei tanto, perché ha saputo insegnarmi come sia impossibile smettere di sognare e, francamente, come sia possibile lottare, a testa alta, per le cose in cui si crede ciecamente. Grazie.
- ❖ Alla Dott.ssa Antonella Peduto per il suo esserci sempre, nelle sconfitte e nelle vittorie, ricordandole ancora una volta come Virgilio abbia accompagnato Dante fino alle profondità più oscure della Terra, per poi uscire, insieme con lui, a rimirar le stelle. Grazie.
- ❖ Al Professore Paolo De Caprariis per la disponibilità e cortesia dimostratami nel corso dei tre anni trascorsi. Grazie.
- ❖ Al Prof. Oliver Werz e a tutto il gruppo di ricerca tedesco, per lo sviluppo dei test biologici, la repentinità delle risposte e il piacere di una sana collaborazione accademica. Grazie.
- ❖ Al Prof. Mario De Rosa per le sue doti da Mentore e Maestro. Grazie.
- ❖ Ai miei colleghi che sopportano con me reazioni, colonne, ansie, paure, ma anche gioie e tante ma tante risate. A Marika, perché senza le nostre chiacchierate forse avrei mollato molto prima. Grazie, sei una vera amica. A Suann, che oramai è "un pezzo del mio cuore". A Maria, la miglior post doc che un dottorando inesperto possa desiderare. Grazie. A Daniela, per il suo essere mamma, sempre. E a Selene, perché mi ha insegnato l'importanza dell'ascolto. Grazie Chem Lab.
- ❖ Al fantastico Gruppo del Centro Grandi Apparecchiature di Napoli, citarvi tutti sarebbe impossibile ma qualcuno in particolare me lo dovette: Ad Ottavia ed Ileana che con la semplicità dei loro abbracci e dei loro sorrisi hanno saputo rendere più piacevoli le lunghe giornate in lab. A Rosario ed

---

Alberto più che grazie chiedo scusa per aver usurpato la loro egemonia di "belli" indiscussi del CGA. Siete unici, dei veri signori. A Paola, per le mie incessanti richieste impossibili, Grazie. Grazie di tutto.

- ❖ Ai miei amici di sempre Laura Stefania, Marice, Angelo e Pasquale, semplicemente perché hanno sopportato, sopportano e spero supporteranno sempre un amico pazzo come me. Ed ai miei nuovi amici Emanuela, Andrea, Aurelio e Lorenzo che mi hanno voluto bene sin da subito accettando i miei pregi e difetti come se ci conoscessimo da una vita. Non riesco più ad immaginare una vita senza voi tutti. Grazie.
- ❖ Ai miei nuovi fratelli, che mi aiutano a scoprire ogni ora le meraviglie del mondo, meravigliandosi con me: a Lorenza dico grazie per il suo presente anche quando è assente e semplicemente perché senza di lei il mio mondo sarebbe meno colorato. a Claudio, beh a Claudio dico solo che un fratello è come uno scrigno chiuso a chiave: non sai dire cosa vi è nascosto all'interno, ma daresti la tua vita per difenderlo. Grazie
- ❖ Alla mia famiglia senza la quale neanche questi grazie esisterebbero. Per dire grazie a voi un libro intero non basterebbe. A mamma e papà, dico grazie perché ci siete. Qualunque cosa accade nella mia vita voi ci siete. E questa è la forma più grande d'affetto, quella che a questo mondo usano chiamare amore. A Rosi, alla mia piccola Rosi dico solo che senza di lei, senza di noi, i miei sforzi non avrebbero senso. Grazie sorellina mia, perché fai di me ogni giorno il fratello migliore del mondo. "Non c'è consolazione più grande di quella che si trova tra le braccia di una sorella" Grazie. A Stefano dico grazie per la sua semplicità e la solida capacità di guardare oltre le apparenze. Grazie.
- ❖ Ed infine, A te, che in poco tempo hai saputo conoscermi a pieno, hai saputo toccare le note giuste, i tasti giusti per creare una splendida melodia. Hai saputo aspettare con pazienza e hai sottratto alla tua vita tempo ed energia per sommarli alla mia. Senza mai chiedere nulla in cambio. Dico grazie per averti incontrata e ti dico grazie per ogni giorno



---

passato insieme. Senza di te la mia vita sarebbe meno dolce.  
Grazie Elisa

