

CHIMICA FARMACEUTICA E TOSSICOLOGIA II

In questo corso vi è uno studio su molecole che agiscono su recettori di membrana, perché si ha a che fare con il sistema nervoso centrale e sistema nervoso periferico dove i principali mediatori della trasmissione sono ammine biogene che agiscono attraverso recettori di membrana e recettori canale.

OBIETTIVI CORSO: indicati nel sito

Conoscenze e abilità da conseguire

Al termine del corso lo studente conosce:

- i concetti fondamentali relativi allo studio chimico-molecolare dei farmaci, le principali teorie recettoriali quali e quantitative alla base dell'interazione farmaco-recettore e le strategie per la progettazione razionale di farmaci;
- gli aspetti fondamentali riguardanti, la sintesi, i meccanismi d'azione a livello molecolare e le relazioni fra struttura chimica e attività biologica di alcune classi di farmaci attivi sul sistema nervoso centrale e periferico. Inoltre lo studente:
 - è in grado di comprendere i meccanismi d'azione di agonisti e antagonisti che agiscono sui diversi sistemi recettoriali studiati sulla base delle caratteristiche chimiche delle molecole coinvolte e ne sa analizzare le relazioni struttura-attività;
 - sa valutare criticamente le strategie sintetiche per la preparazione di nuovi farmaci appartenenti a queste classi;
 - ha capacità di avvicinare criticamente testi ed articoli di chimica farmaceutica.

Quello che si vede quest'anno ha importanza per definire sia il meccanismo d'azione delle molecole, sia per definirne la stretta connessione tra la struttura chimica e l'attività farmacologica.

MODALITA' D'ESAME

La modalità d'esame prevede due momenti: La prima parte è la descrizione di due sintesi, se viene superata questa parte si passa alla parte orale in cui tutti gli argomenti trattati saranno divisi in tre contenitori, in uno vi è la parte generale, nell'altro la parte riguardante il SNC e infine il contenitore con la parte riguardante il Sistema nervoso periferico, lo studente sorteggia dai contenitori l'argomento. Le domande sono corrispondenti agli argomenti fatti durante il corso.

L'esame può essere separato in due parti all'interno della stessa sessione.

Appelli:

2 appelli a febbraio

1 appello a dicembre

1 appello a giugno

1 appello a luglio

2 appelli a settembre

Nella sessione di dicembre l'esame va sostenuto quel giorno per intero

MATERIALE DIDATTICO

- Slide
- Appunti
- Chimica farmaceutica a cura di A. Gasco, F. Gualtieri e C. Melchiorre, casa editrice Ambrosiana, II ediz. 2020

CHIMICA FARMACEUTICA

La definizione di chimica farmaceutica è quella data nel 1998 dalla IUPAC, fa riferimento a medicinal chemistry, è una disciplina interdisciplinare, difatti è di area chimica ma che coinvolge aspetti di scienze biologiche, mediche e farmaceutiche. Si occupa dell'invenzione, della scoperta e della progettazione di molecole nuove e dell'identificazione e la sintesi di composti biologicamente attivi, questo prevede che ci sia un target su cui vanno ad agire, il chimico farmaceutico deve anche valutare qual è il target su cui le molecole vanno ad agire.

Importante è lo studio del loro metabolismo, importante anche per verificare se dal metabolismo derivano delle sostanze tossiche, in alcuni casi il metabolismo porta alla diminuzione dell'attività biologica ma anche ad un danno; La molecola viene modificata per evitare questi metaboliti, un caso recente riguarda antistaminici come la terfenadina, farmaco anche cardiotossico, nel quale si è modificata la molecola per eliminare questo effetto tossico.

Un aspetto importante è l'interpretazione del meccanismo d'azione, quindi come e dove interagisce la molecola con il target biologico. Si studia il meccanismo d'azione anche per dirigere la molecola in un distretto piuttosto che un altro, per esempio si può avere una molecola estremamente attiva ma con un problema ovvero ha un indesiderato effetto a livello del SNC, la si modifica per evitare che oltrepassi la barriera ematoencefalica, la si rende più idrofila andando a rendere un azoto terziario quaternario, carico positivamente in maniera permanente, questa molecola ora non attraverserà più la barriera ematoencefalica, questo è stato fatto con l'atropina, se la si deve usare come spasmolitico o broncodilatatore deve stare a livello periferico e quindi si mette la carica. Un farmaco che agisce a livello del SNP deve essere selettivo.

Tutto questo porta alla costruzione dell'aspetto principale che si tratta per ogni classe di farmaci che sono le relazioni struttura attività.

La novità in questo corso: si tratteranno farmaci del sistema nervoso sia centrale sia periferico.

Vi sono una serie di neurotrasmettitori che hanno una prevalente azione centrale e altri che hanno una prevalente azione periferica, sulla base di questo si hanno diverse caratteristiche delle molecole.

SNC: Con sistema nervoso centrale si intende Encefalo, cervelletto, tronco encefalico e midollo spinale
Molecole che agiscono sul SNC: Dopamina, oppioidi, serotonina e GABA (farmaci anticonvulsorianti e ansiolitici).

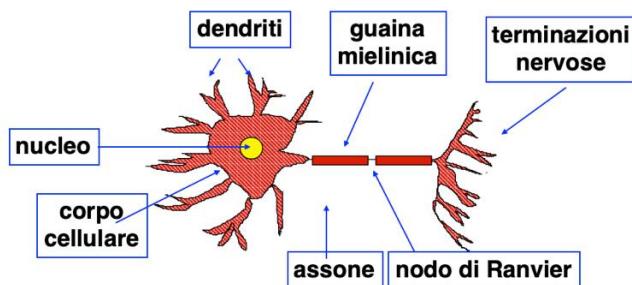
SNP: Si divide in

- Somatico o volontario: riguarda innervazione di cute, giunture e muscoli. Si parla di giunzione neuro muscolare. Si hanno i nervi spinali che innervano sia in senso efferente che afferente.
Nel periferico somatico ci si occupa principalmente della giunzione neuro muscolare e quindi dei recettori nicotinici.
- Sistema nervoso periferico viscerale: viene detto anche autonomo, vegetativo o involontario, non si può volontariamente broncocostringere, broncodilatare o vasocostringere, vasodilatare.
Si ha innervazione da parte di due sistemi che spesso sono uno contro l'altro. Per un equilibrio che si deve creare, il sistema simpatico ha effetto su organi effettori e il parasimpatico ha effetto opposto. L'ortosimpatico ha come principale neurotrasmettore la noradrenalina, a livello del cuore ha effetto inotropo, batnotropo, cronotropo e dromotropo positivo. Il simpatico a livello dei bronchi ha effetto broncodilatatore, il sistema parasimpatico invece sugli stessi organi, a livello del cuore ha effetto

inotropo, batnotropo, cronotropo e dromotropo negativo, contrario del simpatico. La stessa cosa succede per quello che riguarda i bronchi. Il parasimpatico è broncocostrittore il simpatico è bronco dilatatore. Hanno effetti opposti.

Questi sono i due sistemi che danno innervazione degli organi interni, dei vasi sanguigni e delle ghiandole. Sono quindi alla base della secrezione.

IL NEURONE



Il neurone ha una forma differente dalle altre cellule ed è caratterizzato da un corpo cellulare, da un nucleo, da una porzione chiamata porzione assonica, assone e da delle propaggini che si chiamano dendriti, con funzione di aumentare la superficie di contatto tra un neurone e un altro.

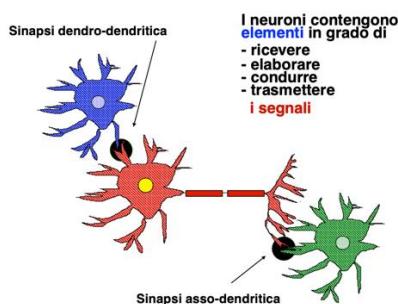
Alcuni neuroni hanno gli assoni mielinizzati, ricoperti quindi da guaina mielinica e i tratti mielinizzati sono intervallati da tratti non mielinizzati che si chiamano nodi di ranvier, si ha infine la porzione terminale o terminazione nervosa che insieme ai dendriti prende sinapsi ovvero contatto con altri neuroni per la trasmissione per l'impulso neuronale.

È l'unità minima per la comunicazione tra cellule contigue.

La giunzione tra neuroni si chiama sinapsi, i neuroni possono prendere sinapsi tra neuroni o tra neurone e organo.

Si tratta di cellule che trasferiscono un impulso nervoso. A seconda di dove avviene la sinapsi essa può essere:

- Dendrodentritica se avviene tra dentridi
- Asso dendritica se avviene tra terminale nervoso e dendridi del neurone successivo



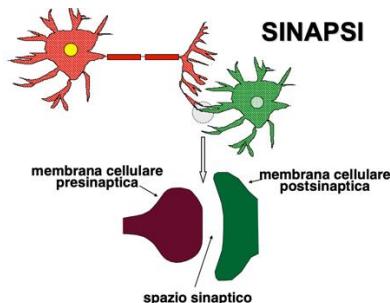
A livello del neurone avviene la sintesi e la liberazione del neurotrasmettore.

I neuroni contengono elementi in grado di ricevere l'impulso di elaborarlo di condurlo lungo l'assone e di trasmetterlo a un neurone contiguo o alla cellula bersaglio.

Queste azioni avvengono in maniera diversa nelle varie zone del neurone, se lungo la porzione assonica c'è una conduzione elettrica perché coinvolti canali voltaggio dipendenti, nella porzione terminale l'impulso elettrico che ha attraversato l'assone viene trasformato in impulso chimico, una volta arrivato in fondo al terminale sinaptico. L'impulso elettrico arrivato al terminale sinaptico libera un neurotrasmettore.

Si vede uno spazio che si chiama spazio sinaptico o bottone sinaptico dove viene riversato il neurotrasmettore. Le due porzioni che prendono sinapsi sono caratterizzate da una membrana cellulare pre-sinaptica che

appartiene al neurone che ha liberato il neurotrasmettore, esso viene riversato nello spazio e nella membrana post-sinaptica ci sono i recettori, strutture che sono in grado di interagire con il neurotrasmettore, in questa membrana post sinaptica ci sono recettori, se si prende in esame la muscolatura liscia intestinale ci sono i recettori M3 muscarinici attivati dal neurotramettore che è l'acetilcolina, si da origine alla contrazione della muscolatura liscia. Questo può essere fatto tra neurone e neurone o tra neurone e membrana post sinaptica dell'organo effettore.



COMUNICAZIONE NEURONALE

Lungo l'assone che si chiama conduzione assonica si ha la conduzione dell'impulso nervoso attraverso chiusura e apertura di canali del sodio e del potassio. Quando si arriva al terminale in quel caso la conduzione extracellulare perché ce un riversamento nello spazio sinaptico, viene detta conduzione sinaptica a carico di una sostanza chimica detta neurotrasmettore.

CONDUZIONE ASSONICA

Conduzione elettrica che dall'impulso centrale si trasferisce a livello assonico trasferita tramite continue depolarizzazioni a carico dei canali voltaggio dipendenti.

Questa conduzione può essere di due tipi a seconda che l'assone sia mielinizzato o no, in quello mielinizzato ci sarà un trasferimento più lento. Nel mielinizzato la conduzione è una propagazione saltatoria attraverso i nodi di ranvier quindi più veloce.

Differenza tra canali ionici:

Lungo l'assone sono canali ionici voltaggio dipendenti ovvero che rispondono a una variazione di potenziale, i canali che si hanno a livello delle terminazioni nervose sono canali ionotropi sensibili all'attivazione da parte di un neurotramettore, aperti e chiusi in funzione del neurotrasmettore che va ad interagire con quel canale. Alcuni sono modulati dalla variazione di potenziale mentre nei terminali sono a porta chimica, sono quelli che vengono chiamati recettori canali operati da ligando.

ESEMPIO

Fibra nicotinica. Fibra che libera l'acetilcolina, fibra del sistema volontario nella giunzione. Si libera acetilcolina e va ad agire sui recettori post sinaptici di tipo nicotinico. Lungo l'assone si ha la trasmissione che avviene attraverso l'impulso elettrico attraverso canali voltaggi dipendenti, al terminale l'impulso elettrico da il segnale di liberare acetilcolina, essa interagisce con recettori post sinaptici che sono canali diversi da quelli che si avevano nell'assone questi sono canali che si aprono o chiudono quando si va ad interagire con una sostanza chimica.

CONDUZIONE SINAPTICA

Nella trasmissione sinaptica c'è un impulso elettrico che, trasferito attraverso i canali voltaggio dipendenti, arriva nel terminale. A livello della terminazione nervosa viene rilasciata dalla membrana presinaptica una sostanza chimica, in generale chiamata neurotrasmettore, ma che in alcuni casi è più corretto chiamare neuromodulatore.

Il neurotrasmettore o neuromodulatore o neuromormone, viene liberato nello spazio sinaptico e va ad interagire con delle strutture che si trovano a livello della membrana post-sinaptica.

I mediatori chimici possono essere di due nature per l'effetto che fanno insorgere nella membrana post-sinaptica, mediatori di tipo eccitatorio e di tipo inibitorio. Lo stesso neurotrasmettore in alcuni distretti ha un comportamento di neurotrasmettore eccitatorio mentre in altri ha comportamento di inibitorio. Il comportamento dipende dal tipo di recettori post-sinaptici con cui va ad interagire. Ad esempio, se si parla del GABA, si può dire che è un neurotrasmettore inibitorio, ma se si parla dell'acetilcolina in alcuni casi è inibitoria e in altri eccitatoria.

Per ogni classe di neurotrasmettore poi si va a vedere il processo che avviene a livello del bottone sinaptico. Arriva l'impulso elettrico dalla porzione assonica. Normalmente a livello del terminale sinaptico si ha tutto un corredo di precursori ed enzimi che rendono possibile la biosintesi del neurotrasmettore, che parte da un precursore presente nel terminale. La maggior parte dei precursori sono amminoacidi.

Ci può essere anche un precursore che viene da fuori, ad esempio nel caso dell'acetilcolina, che deriva dall'acetilazione della colina. La colina è biosintetizzata a livello epatico e attraverso il circolo ematico raggiunge il neurone. In questo caso il precursore deve essere trasportato all'interno del neurone, del terminale. Altri neurotrasmettitori come adrenalina, noradrenalina e dopamina, hanno come precursore la tirosina.

Dal precursore, che normalmente è un amminoacido, attraverso una serie di enzimi, si arriva al neurotrasmettore di quella sinapsi. Se è neurone colinergico sarà acetilcolina, se è adrenergico sarà noradrenalina e se è un neurone dopaminergico sarà la dopamina.

Una volta che il neurotrasmettore è biosintetizzato, viene immagazzinato nelle vescicole sinaptiche. Deve essere immagazzinato perché altrimenti verrebbe degradato, infatti a livello della sinapsi sono presenti una serie di enzimi metabolizzanti, in grado di degradare il neurotrasmettore. La vescicola sinaptica protegge il neurotrasmettore sintetizzato dall'attacco per esempio degli enzimi mitocondriali, come le monoamminoossidasi. Quando arriva l'impulso, oltre alla sintesi del neurotrasmettore, questo fa sì che le vescicole sinaptiche si fondano con la membrana presinaptica e attraverso un processo di esocitosi calcio mediato facciano uscire il neurotrasmettore nello spazio sinaptico. Il neurotrasmettore liberato nello spazio sinaptico ha vari destini.

-Il destino principale è l'attività biologica, cioè, va ad interagire con le strutture recettoriali presenti principalmente a livello della membrana post-sinaptica.

Ad esempio, nel neurone adrenergico viene liberata noradrenalina che va ad interagire con i recettori adrenergici.

-Oltre ai recettori post-sinaptici presenti sulla membrana post-sinaptica, ci sono strutture recettoriali presenti anche nella membrana presinaptica. In questo caso si chiamano recettori presinaptici e hanno la funzione di modulare la liberazione del neurotrasmettore.

La modalità della modulazione dipende dal tipo di recettore. Per esempio, i recettori nicotinici presinaptici modulano positivamente il rilascio di acetilcolina. Si crea un loop positivo. Si libera acetilcolina che interagisce sia con i recettori postsinaptici sia con i nicotinici presinaptici, che aumentano il rilascio di ulteriore acetilcolina. Modulazioni a feedback positivo.

Nella maggior parte dei casi i recettori presinaptici modulano il rilascio del neurotrasmettore con feedback negativo. Questo, per esempio, è il caso degli alfa2 adrenergici e degli M2 muscarinici. Viene liberato il neurotrasmettore che interagisce sia con i recettori post-sinaptici sia con i recettori presinaptici, portando ad un controllo con una modulazione negativa. Infatti, interagendo con i recettori presinaptici viene inibita un'ulteriore liberazione del neurotrasmettore. Non in tutti i distretti sono presenti i recettori presinaptici.

I recettori presinaptici si dividono in 2 categorie, gli autocettori o autorecettori e gli eterocettori o eterorecettori. Gli autorecettori sono quelli riportati nell'esempio precedente e ad esempio anche il neurone colinergico, dove viene liberata acetilcolina. L'acetilcolina poi interagisce con i recettori nicotinici presinaptici e postsinaptici. Quindi è un autocettore perché modula sé stesso, in questo caso con feedback positivo.

Gli eterocettori sono recettori che sono su neuroni che liberano neurotrasmettore diverso da quello che ha agito sugli eterocettori. Un esempio sono i neuroni dopaminergici centrali, che liberano dopamina, sui quali sono presenti eterocettori nicotinici, non dopaminici. La nicotina ha controllo sulla liberazione di dopamina. L'acetilcolina interagendo con gli eterocettori presinaptici stimola il rilascio di dopamina, neurotrasmettore diverso rispetto a quello che ha attivato l'eterocettore. L'eterocettore quindi è attivato dall'acetilcolina ma aumenta la liberazione di dopamina. Questo meccanismo è alla base dell'assuefazione da fumo, infatti la nicotina provoca dipendenza perché ha recettori nicotinici eterocettori presenti sui neuroni dopaminergici; quindi, la stimolazione di questi recettori porta ad un aumento della liberazione di dopamina.

TERMINAZIONE DELL'AZIONE

Una volta che il neurotrasmettore ha interagito con queste strutture post e presinaptiche, ci deve essere la terminazione dell'azione. La terminazione dell'azione avviene in vari modi, il modo principale è la metabolizzazione del neurotrasmettore.

A seconda del neurotrasmettore in studio esistono enzimi diversi in grado di degradarlo:

- Acetilcolina: è un estere della colina con acido acetico. Esiste un enzima, l'acetilcolina esterasi, presente nella fessura sinaptica, che ha il compito di rompere l'estere trasformando l'acetilcolina in colina e acetato. In questo modo si termina l'azione dell'acetilcolina. Per la colina poi è presente un trasportatore, infatti la colina ha una carica positiva permanente e quindi non attraversa in maniera autonoma la membrana per rientrare nel neurone presinaptico. La colina viene ricaptata da un trasportatore che la riporta nel neurone per una nuova sintesi di acetilcolina.
- Noradrenalina, dopamina e adrenalina: la terminazione dell'azione è a carico di due classi di enzimi, le MAO (monoamminoossidasi) che si trovano a livello dei mitocondri e gli enzimi COMT (catecol-O-metil-transfaserasi) che si trovano nella fessura sinaptica. Per quanto riguarda le MAO, affinché questi neurotrasmettitori possano avere azione di degradazione delle MAO, sia noradrenalina che dopamina devono essere ricaptate. La ricaptazione è a carico di un trasportatore. I trasportatori sono alla base del reuptake delle ammine biogene, ricaptate a livello citoplasmatico ed in seguito degradate dalle MAO. Questi neurotrasmettitori subiscono una degradazione ossidativa del terminale amminico e si forma lo ione ammonio e aldeide.

L'altra modalità di terminazione del segnale è a carico degli enzimi metabolizzanti che si trovano nella fessura sinaptica, gli enzimi COMT (catecol-O-metil-trasferasi). L'anello che caratterizza

noradrenalina, dopamina e adrenalina è un anello aromatico con due gruppi OH che si chiama catecolo. Queste 3 ammine biogene vengono quindi definite catecolammime. COMT trasferisce un metile sull'ossigeno in meta dell'anello catecolico, trasformando quindi l'OH in gruppo metossilico. Trasferendo un metile la molecola viene inattivata.

La terminazione dell'azione è fondamentale per evitare effetti tossici. Ad esempio, i gas nervini sono in grado di bloccare uno dei sistemi di metabolizzazione. I gas nervini vanno ad agire come inibitori dell'acetilcolina esterasi, bloccando quindi la metabolizzazione dell'acetilcolina. Un'alta concentrazione non degradata provoca a livello centrale convulsioni, a livello periferico paralisi respiratoria e conduce a morte.

NEUROTRASMETTITORE DA CIRCOLAZIONE SANGUIGNA

Mentre la noradrenalina è neurotrasmettore del sistema adrenergico, quindi sistema simpatico, che viene prodotto principalmente a livello dei neuroni adrenergici, l'adrenalina, che varia per un metile sull'azoto terminale, più che neurotrasmettore è un neuromone. L'adrenalina viene sintetizzata a livello delle ghiandole surrenali, dove c'è un corredo enzimatico per trasformare la tirosina in adrenalina. Adrenalina si comporta poi da ormone, rilasciata nel circolo ematico e può raggiungere il terminale neuronale adrenergico e attraverso i trasportatori essere portate nel neurone adrenergico. Neurotrasmettore è noradrenalina mentre l'adrenalina è neuromone, con effetti identici alla noradrenalina.

NEUROTRASMETTITORI

Noradrenalina e adrenalina: neurotrasmettitori del sistema simpatico post gangliare. Chiamate catecolammime del sistema adrenergico

Dopamina: fino agli anni 60 veniva considerata un precursore nella sintesi di noradrenalina, poi si è capito che la dopamina ha un suo sistema recettoriale; quindi, è neurotrasmettore a tutti gli effetti. Nelle fibre adrenergiche c'è un enzima che trasforma la dopamina in noradrenalina, nelle fibre dopaminergiche la biosintesi si ferma alla dopamina.

Acetylcolina: neurotrasmettore del sistema colinergico. Liberata dalle fibre pregangliari anche del sistema simpatico oltre che parasimpatico. Viene liberata a livello delle fibre postgangliari del sistema colinergico muscarinico e viene liberata a livello della giunzione neuromuscolare del sistema volontario.

Istamina: attività periferiche, molecola maggiormente coinvolta nelle reazioni allergiche e nella liberazione di acido gastrico.

Serotonina: azioni centrali. Agisce su diversi recettori, tante azioni diverse. Principalmente la vedremo negli antiemetici in seguito a chemioterapia e nei farmaci antidepressivi.

Acido gamma ammino butirrico: neuro inibitorio. Principalmente per effetti centrali, modula effetti inibitori a livello centrale. Famarsi che agiscono su GABA sono sedativi ipnotici, anticonvulsivanti, anestetici. Effetti inibitori a livello centrale.

Accanto a questi neurotrasmettitori ci sono anche acido glutammico e aspartico, due amminoacidi. Hanno un loro sistema di trasmissione, agiscono su 2 tipi diversi di recettori, recettore dell'N-metil-d-aspartato (NMDA) e recettore AMPA.

Glicina: amminoacido, si comporta da coattivatore di altri recettori

Adenosina: le purine hanno un sistema di neurotrasmissione, l'adenosina agisce su recettori purinergici della classe p1 mentre ADP e ATP agiscono attivando la classe p2.

Quindi ci sono 2 classi di recettori purinergici

- P1 su cui agisce adenosina
- P2 dove vanno ad interagire ADP e ATP.

NEUROTRASMETTITORI

Un aspetto comune dei neurotrasmettitori è che, a parte l'adenosina che rappresenta un neurotrasmettitore a struttura purinica, tutti gli altri derivano da amminoacidi che dopo una serie di reazioni chimiche portano alla formazione, a livello del terminale sinaptico, del neurotrasmettitore.

Per esempio, la noradrenalina ha un anello catecolico e una catena etilamminica. La molecola deriva dalla tirosina, che ha solo un gruppo -OH nell'anello, in para rispetto alla catena laterale. La prima reazione per trasformare la tirosina nel neurotrasmettitore, prevede l'ossidrilazione dell'anello (introduzione di un -OH) in posizione β . La seconda reazione prevede la decarbossilazione del gruppo -COOH in catena laterale, per dare origine alla dopamina (intermedio della biosintesi). Successivamente c'è un enzima che ha la capacità di ossidrilare la catena laterale.

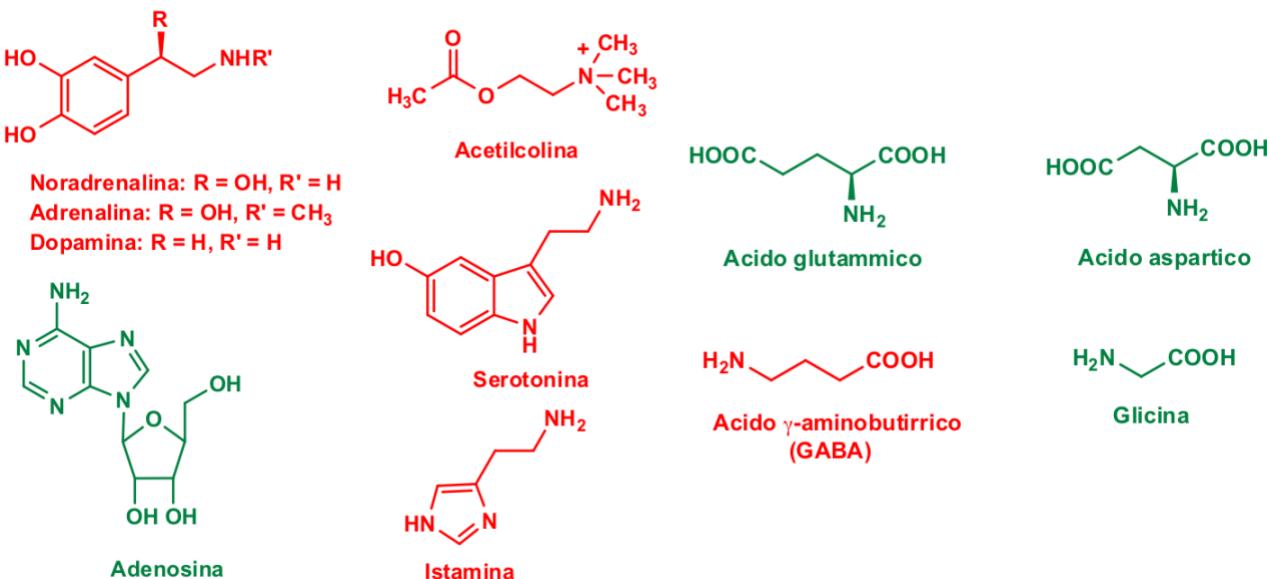
Nel caso dell'adrenalina, prodotta dalle ghiandole surrenali, c'è un ulteriore enzima che invece di ossidrilare la catena laterale, è in grado di metilare il gruppo amminico primario che diventa secondario.

Nel caso dell'acetilcolina la somiglianza con un amminoacido non è così evidente, però deriva dall'acetilazione della colina, che a sua volta deriva da una reazione epatica che trasforma la serina in colina. Quindi anche in questo caso il precursore è un amminoacido che non è presente nel terminale colinergico ma viene sintetizzato a livello epatico.

Nella serotonina si ritrova la struttura del triptofano (amminoacido con nucleo indolico).

L'istamina deriva dall'istidina, che possiede l'anello imidazolico.

Acido glutammico, acido aspartico e glicina sono essi stessi degli amminoacidi, mentre l'acido γ -amminobutirrico deriva dalla decarbossilazione dell'acido glutammico.



I neurotrasmettitori non sono le uniche molecole in grado di trasferire delle informazioni da un distretto a un altro dell'organismo, infatti ci sono tanti altri i composti che hanno questa caratteristica, ma che non vengono classificati come neurotrasmettitori. I **requisiti** che devono appartenere a una sostanza perché sia definita un **neurotrasmettore**, devono essere:

- **Biosintesi** da un amminoacido.
- **Accumulo** perché dalla biosintesi deriva una certa concentrazione di neurotrasmettore nel terminale sinaptico, che deve essere immagazzinato per evitare che venga distrutto, e deve quindi entrare nelle vescicole sinaptiche per essere protetto.
- **Rilascio** avviene per esocitosi, infatti quando la membrana delle vescicole in cui è immagazzinato il neurotrasmettore fonde rilascia la molecola a livello della fessura sinaptica. In seguito a un impulso elettrico, che nella fase finale diventa chimico.

- **Recettori specifici** sono solitamente delle proteine che fanno interazione con la molecola nella membrana post sinaptica o pre sinaptica.
- **Meccanismo di blocco dell'azione** per evitare che nella fessura sinaptica il neurotrasmettore rimanga troppo a lungo e possa portare a tossicità. Si può avere re-uptake o il catabolismo del neurotrasmettore a carico di enzimi sia mitocondriali, che presenti nella fessura sinaptica.

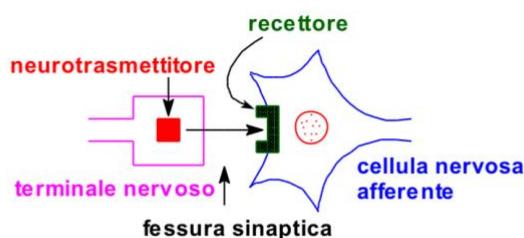
Alcune molecole molto simili ai neurotrasmettitori, ma che mancano anche solo di uno di questi meccanismi, vengono chiamati più propriamente neuromodulatori, neuroregolatori o neuroormoni (es. adrenalina). La produzione di adrenalina è sotto lo stimolo di fibre colinergiche perché la ghiandola surrenale si comporta come un ganglio ed è come se la fibra pre-gangliare colinergica, liberando acetilcolina e interagendo con i recettori nicotinici presenti sulla ghiandola surrenale, andasse ad attivare invece che la fibra post-gangliare, la produzione di adrenalina e quindi quella ghiandola surrenale si comporta come un ganglio, da cui però non parte la fibra post-gangliare. Il neuroormone viene riversato nel sangue e poi ha azione sui recettori adrenergici come la noradrenalina.

Altra molecola è l'encefalina e suoi precursori. Le encefaline sono due e sono piccoli peptidi formati da una catena Tyr-Gly-Gly-Phe-Met(Let). Questi due pentapeptidi vanno ad attivare i recettori oppioidi, quindi sono i ligandi endogeni dei recettori che vengono attivati dalla morfina. Queste molecole non sono le uniche ad attivare i recettori oppioidi, ma derivano da molecole più grandi che contengono sempre quell'unità minima indicata, che serve per attivare quel tipo di recettori. È più corretto chiamarli neuromodulatori perché per queste molecole non è stato ancora rinvenuto un sistema di re-uptake, quindi manca di un requisito.

Alcuni neurotrasmettitori sono anche neuroormoni, es. dopamina è un neurotrasmettore a tutti gli effetti per il suo sistema recettoriale, ma ha anche un effetto come neuroormone perché nell'asse ipotalamo-ipofisario ha il controllo della liberazione di prolattina.

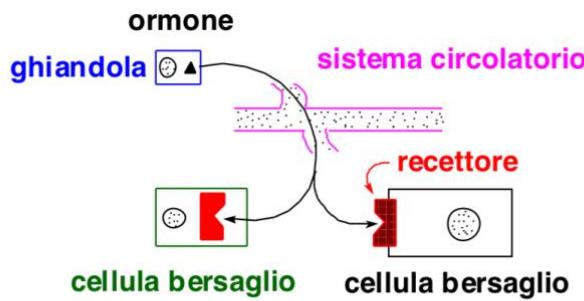
PROCESSI INTERCELLULARI DI COMUNICAZIONE

Trasmissione sinaptica



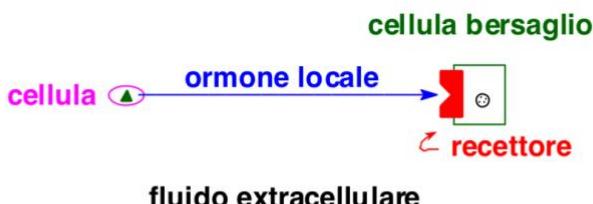
Un terminale nervoso rilascia un neurotrasmettore che diffondono attraverso la fessura sinaptica per interagire con un recettore sulla membrana postsinaptica.

Nel caso della trasmissione sinaptica, sulla cellula nervosa post-sinaptica abbiamo una serie di recettori che a seguito dell'attivazione da parte del neurotrasmettore danno origine alla trasmissione dell'impulso. La seconda cellula nervosa può essere una fibra post-gangliare, quindi un altro neurone, ma anche l'organo su cui avviene l'innervazione del neurone post-gangliare.



Una ghiandola endocrina secerne un ormone che, attraverso il sistema circolatorio, si distribuisce nell'organismo ed agisce su cellule bersaglio distanti dalla ghiandola

Nel caso degli ormoni glucocorticoidi, mineralcorticoidi e ormoni sessuali, c'è una ghiandola che li produce, poi vengono rilasciati nel circolo ematico e quindi la destinazione è lontana rispetto alla sede bersaglio. Quest'ultima, nel caso di ormoni del tipo ciclopentano peridrofenantrene, è un recettore intracellulare perché sono molecole lipofile che possono attraversare la membrana. In altri casi, quando invece la molecola non è così lipofila, come ad esempio l'insulina, interagisce con dei recettori di membrana (nello specifico tirosinchinasici).



Un ormone locale (autacoide), come l'istamina e le prostaglandine, viene rilasciato dalla cellula e, diffondendo attraverso lo spazio extracellulare, agisce localmente sulla stessa cellula (azione autocrina) o su cellule contigue (azione paracrina).

Infine ci sono gli ormoni locali, anche detti autacoidi. Tipico ormone di questo tipo è l'istamina, che è un neurotrasmettitore ma anche un autacoide perché non viene prodotto solo a livello delle sinapsi istaminergiche, ma anche da mastociti, dove a seguito di una reazione allergica antigene-anticorpo viene rilasciata questa molecola. Si dice autacoide perché reagisce sulle stesse cellule che l'hanno prodotta o su cellule contigue.

COMPLESSO FARMACO-RECEPTEORE

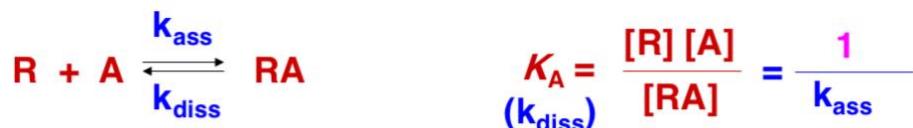
L'interazione farmaco-recettore, per avere un effetto deve dare sempre origine a delle interazioni chimiche tra molecola e struttura recettoriale. Quando per la prima volta si è parlato dell'interazione farmaco-recettore, si paragonò l'interazione ad una chiave con la sua serratura. La forte specificità fa sì che ci sia l'attivazione di uno specifico recettore a seguito dell'interazione, e che si dia il via ad una serie di eventi biochimici che danno l'azione finale. Relativamente a questo, la prima suddivisione è stata fatta sulla base di due termini:

- **Agonista** per le molecole che agendo sul recettore danno lo stesso effetto del ligando endogeno (attivanti), che nel nostro caso sarà un neurotrasmettitore;
- **Antagonista**, che rappresenta molecole che pur interagendo con quello stesso recettore specifico, bloccano l'attività del neurotrasmettitore.

La complementarietà farmaco-recettore in entrambi i casi ci deve essere, ma in un caso la cascata è di attivazione, nell'altro è il blocco dell'azione dell'agonista.

In generale l'affinità, cioè quanto è forte il legame di un agonista, rispetto a quello di un antagonista sul recettore, va sempre a favore dell'antagonista. Vuol dire che la costante di dissociazione degli agonisti è sempre maggiore rispetto a quella degli antagonisti. Questo perché di solito le molecole di antagonisti sono più grandi e hanno la capacità di dare dei legami ulteriori con il recettore e quindi si abbassa la costante di dissociazione. Più la costante di dissociazione è bassa, più significa che il legame è forte.

LEGAMI CHIMICI



$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{1}{K_A} = RT \ln K_A$$

ΔG° = variazione di energia libera

**R = costante dei gas
(1,98 cal · grado · mole)**

T = temperatura assoluta

K_A = costante di dissociazione

La reazione tra recettore e agonista è bimolecolare, caratterizzata dalla formazione di un complesso farmaco-recettore e da una costante di associazione e una di dissociazione. Per un agonista la costante di dissociazione è definita K_A ed è data dal rapporto del prodotto della concentrazione dei recettori per la concentrazione di agonista sulla concentrazione del complesso che si è formato. Questo complesso deve essere favorito, quindi devono formarsi dei legami che comportano l'abbassamento dell'energia del sistema ΔG che deve essere negativo. La variazione di energia libera è definita dall'equazione sopra riportata, dove a parte gli elementi che sono delle costanti, vediamo che è strettamente legata alle costanti di dissociazione.

Esempio

Ammettiamo che la costante di dissociazione di un recettore e agonista sia $K_A=100$ (già capisco che è molto alta), se sostituisco il valore nell'equazione per determinare il ΔG , vedo che è positivo, quindi il legame non si forma. Posso provare ad inserire un gruppo -OH per vedere se si forma un'interazione additiva come il legame a H, oppure si potrebbe inserire un gruppo carbonilico con l'idea che possa essere un accettore di legami ad H. Il legame ad H dà un contributo di circa 5,45 kcal/mole, ma in realtà dipende anche se si forma sullo stesso piano o se è angolare; in ogni caso con questo contributo additivo, ottengo un ΔG negativo di -2,62. In questo modo con il processo inverso vedo come si modifica la K_A e ottengo 0,01. In questo modo si rafforza l'interazione di 10.000 volte. Se nella molecola inserissi ulteriori gruppi in grado di dare un abbassamento del ΔG , si abbasserà anche la K_A . Essendo la molecola dell'antagonista normalmente più ingombrata rispetto alla molecola dell'agonista, questo contribuisce a un'affinità maggiore, ma l'attività è un discorso diverso.

Tabella dei legami farmaco-recettore

Tabella 2.4 Tipi di legame farmaco-recettore, energie ed esempi di gruppi funzionali coinvolti.

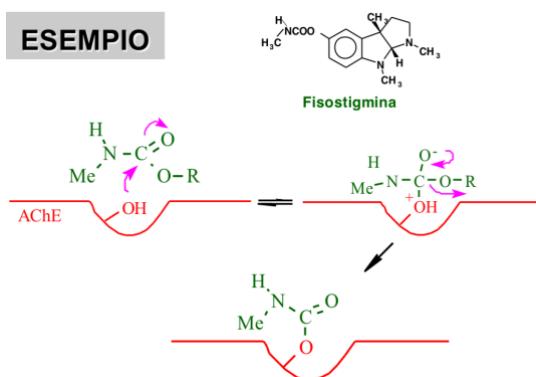
Tipo di legame	Energia (kcal/mole)	Esempio
Covalente	40-140	R'—O—R
Ionico	5	R ₄ —N ⁺ —OOC—R
Ionico rinforzato	10	R ₃ —NH ⁺ —OOC—R
Idrogeno	1-7	—OH — O=
Ione-dipolo	1-7	R ₄ —N ⁺ —NR ₃
Dipolo-dipolo	1-7	C=O — NR ₃
Ione-dipolo indotto	1-7	R ₄ —N ⁺ —CR ₄
Trasferimento di carica	1-10	
Alogenico	1-4	R—Cl — O=
Catione-π	3-5	
Idrofobico	1,4	
Van der Waals	0,5-1	—CH ₂ — H ₂ C—
Di coordinazione con un metallo	40-140	

Dalla tipologia di legame che si forma, si può intuire anche il meccanismo d'azione.

Legame covalente

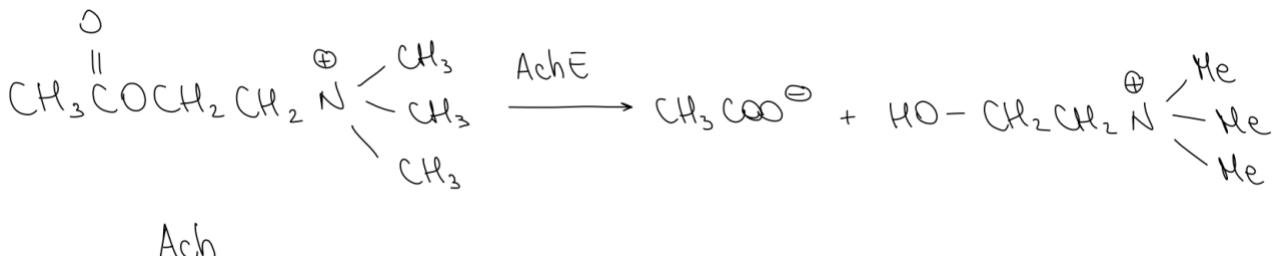
Di solito un legame covalente è gradito se devo andare a bersagliare un target che non è presente nel nostro organismo data l'irreversibilità di tale legame ad esempio le penicilline interagiscono con un enzima specifico della parete batterica, ma normalmente la formazione di un legame covalente porta a tossicità, infatti gli agenti antitumorali alchilanti sono tra quelli più tossici. Quindi la regola generale è che è consigliato un legame reversibile, a meno che non ci sia la possibilità di dare un legame covalente dopo che c'è stata un'attivazione enzimatica nelle vicinanze del target d'azione (ma se ne parlerà più avanti).

Gli esempi che sono stati presi in considerazione riguardano le molecole di fisostigmina e benextramina.



La **fisostigmina** è un alcaloide naturale. Importante è il gruppo carbammato, presente in molti farmaci usati come inibitori dell'acetilcolinesterasi.

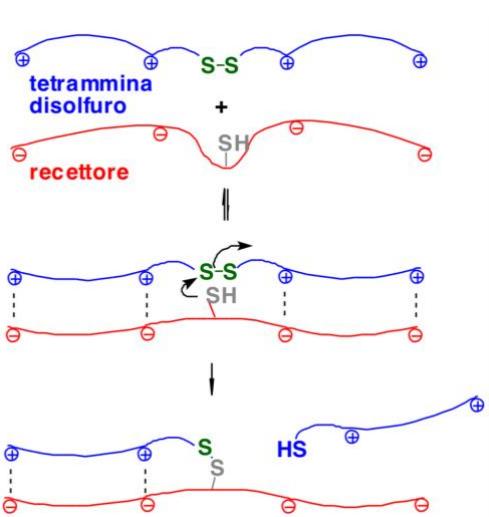
Acetilcolina normalmente, per azione dell'acetilcolinesterasi (enzima che idrolizza la molecola), forma acetato e colina che è l'alcol corrispondente. La differenza tra un carbammato e un gruppo estero in termini di reattività da parte di un enzima che idrolizza gli esteri, è che il carbammato è più stabile perché per avere l'idrolisi da parte dell'acqua, il C carbonilico deve essere più elettropositivo e lo è di più nell'estere dato che nel carbammato il doppietto elettronico dell'N viene delocalizzato e la carica positiva sta più favorevolmente nell'N piuttosto che sul C carbonilico e diventa meno elettropositivo e quindi meno attaccabile dall'acqua.



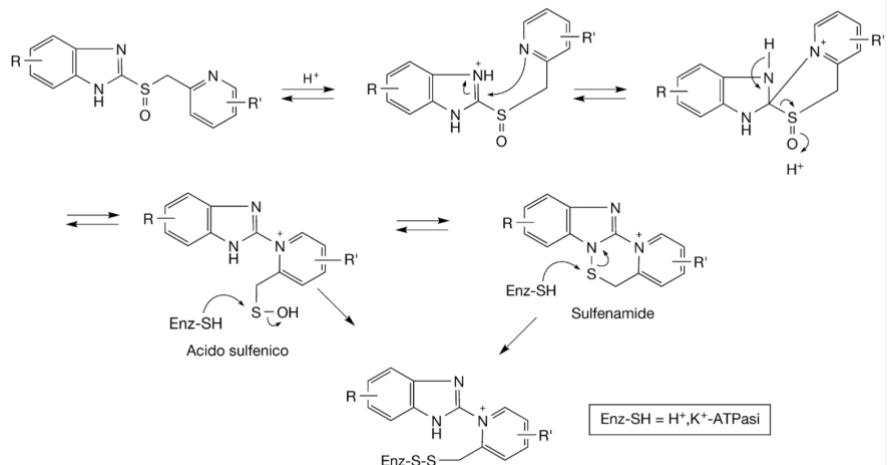
Succede quindi che l'acetilcolinaesterasi mi deve bloccare l'azione dell'acetilcolina quindi idrolizza l'estere. L'acetilcolinaesterasi dà un intermedio di transesterificazione, l'acqua arriva e riforma l'acetilcolinesterasi da un lato (libera -OH serinico) e dall'altra ha idrolizzato il neurotrasmettore liberando acetato. Quando invece ho il gruppo carbammato, si ha anche in questo caso un attacco covalente, ma mentre nell'estere ho un'idrolisi veloce, quando ho il carbammato siccome il C carbonilico è meno elettropositivo rispetto a quello di un estere, è meno facilmente attaccabile dall'acqua e quindi l'idrolisi avviene in tempi più lunghi. Molecole di questo tipo che hanno il gruppo carbammato sono inibitori covalenti dell'enzima, ma reversibili perché con il tempo quel legame covalente, essendo un legame carbamoilico, pian piano si idrolizza, ma tengono bloccato l'enzima acetilcolinesterasi per un tempo più lungo.

Quando invece il legame tra acetilcolinesterasi e una molecola diventa covalente e irreversibile, la molecola diventa un veleno, come nel caso dei gas nervini detti organofosforici, perché quello che si forma è un enzima fosforilato che si ripristina in maniera molto molta lenta. Mentre tutte le volte che do origine a un'interazione covalente che porta a un estere o un carbammato, è reversibile.

Es. Omeprazolo



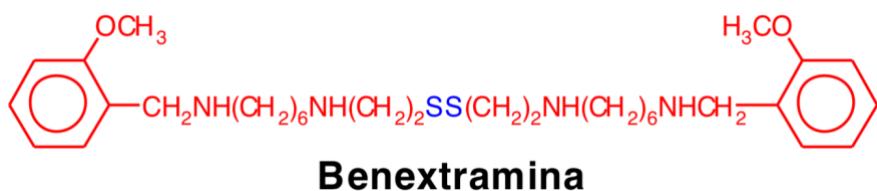
Esempio: Omeprazolo



È un caso diverso rispetto a quello appena spiegato perché si ha un'inibizione covalente della pompa H/K ATPasica, deputata allo scambio idrogeno/potassio a livello delle cellule ossintiche dello stomaco e che porta

alla formazione dell'HCl. I farmaci maggiormente utilizzati per l'ulcera gastrica, sono proprio questi inibitori della pompa protonica che danno un attacco covalente e irreversibile. Infatti, anche dopo vari giorni dalla sospensione della terapia, finché non viene risintetizzata nuova proteina, viene mantenuto l'effetto di inibizione. In questo caso l'attacco avviene tramite gruppo solfossido, che in vivo subisce un riarrangiamento e dà origine ad acido sulfenico e sulfenamide. Entrambe le specie sono in grado di dare un'interazione covalente per attacco di -SH di una cisteina dell'enzima sul gruppo sulfenamidico o sull'acido sulfenico. Questo attacco porta alla formazione di un ponte disolfuro, legame covalente molto lento da ripristinare. L'enzima allora rimane covalentemente inibito finché non ne viene sintetizzato di nuovo.

Es. Benextramina



È una poliammina (tetra) antagonista dei recettori α -adrenergici e il meccanismo di antagonismo è stato studiato in virtù del fatto che la molecola nella parte centrale ha un gruppo disolfuro. Non è un farmaco ma è una molecola che si utilizza sui recettori α -adrenergici per bloccarli in maniera covalente e irreversibile. L'aspetto interessante è che ha attività di antagonista irreversibile nei confronti dei recettori α -adrenergici, mentre se viene studiata sul sistema muscarinico, quindi colinergico, si comporta da antagonista competitivo. Questo perché entrambi i recettori, α e M2 muscarinico, hanno capacità di dare legami ionici con i gruppi amminici protonati, ma il ponte disolfuro nel caso dell' α -adrenergico intercetta un gruppo tiolo di una cisteina presente nel recettore e quindi dà un attacco covalente che blocca il recettore in maniera irreversibile. La stessa cisteina nel recettore muscarinico non c'è e quindi in quel caso l'antagonismo è reversibile.

Quindi la stessa molecola può avere attività di antagonista competitivo su un recettore e antagonista irreversibile su un altro, tutto dipende dai residui aminoacidici presenti nell'uno e nell'altro.

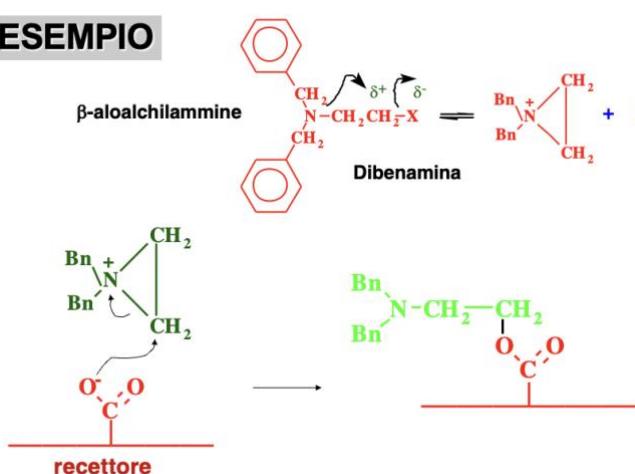
la Benextramina è un antagonista dei recettori alpha adrenergici e ha attività di antagonista irreversibile nei confronti di questi mentre se viene studiata sul sistema muscarinico quindi colinergico si comporta da antagonista competitivo perché abbiamo solo interazioni elettrostatiche.

Nel caso dell'alpha adrenergico porta ad un addotto covalente tra un gruppo tiolo con il recettore; nei muscarinici la cisteina non c'è, ci sono solo interazioni elettrostatiche e quindi è reversibile; questo per

dire che la stessa molecola può avere l'attività di antagonista irreversibile o competitivo.

Un altro esempio sono le beta aloalchilamine che sono antagonisti dei recettori alpha adrenergici e sono usate nelle crisi ipertensive da tumore delle ghiandole surrenali perché si ha una overproduzione di adrenalina.

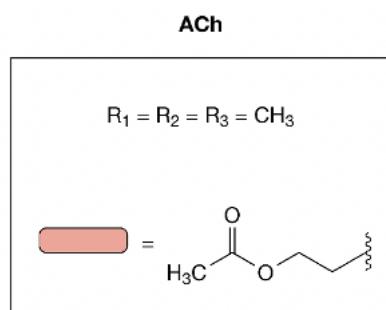
ESEMPIO



Queste molecole sono caratterizzate da una catena beta aloalchiloamminica; si viene a formare come intermedio uno ione aziridinio che subisce l'attacco del gruppo aspartato del recettore per dare origine all'addotto covalente estereo che risulta pseudo-irreversibile perché il gruppo estero con il tempo si idrolizza.

Per quanto riguarda i legami che tratteremo maggiormente sono i **legami ionici** perché sono coinvolti in molecole come amminobiogene (molecole oggetto di studio); presentano un gruppo amminico protonato a pH fisiologico; di base le amminobiogene formano con il recettore legami elettrostatici ionici con una controparte anionica che è rappresentata da un gruppo aspartato conservato nel terzo dominio transmembrana dei recettori accoppiati a proteina G.

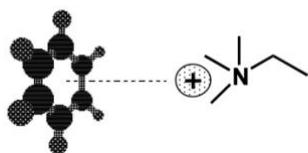
La molecola dell'acetilcolina non ha un gruppo amminico che si protona a pH fisiologico ma presenta un gruppo ammonico quaternario perché la carica non si muove, è permanente quindi la carica + è indipendente dal pH.



Tutte le volte che è presente un'ammina protonata o un gruppo ammonico quaternario l'unico legame possibile è quello ionico o quella carica positiva può dare delle interazioni diverse? Inizialmente si pensava che potesse essere solamente un'interazione elettrostatica aspartato-ammina quaternaria/gruppo ammonico; successivamente grazie alla cristallizzazione dell'acetilcolina esterasi l'interazione aveva una natura diversa perché la testa ammonica quaternaria dell'ACh dà delle interazioni che vengono definite interazioni **catione-pigreco**.

Questo tipo di interazioni si formano perché la testa ammonica quaternaria dell'ACh non interagisce con un Aspartato/glutammato dell'enzima ma con un anello di triptofano cioè un anello indolico appartenente al triptofano, sito attivo dell'enzima.

LEGAMI CATIONE – π



Reminder: Il sito attivo dell'enzima è il sito in cui si ha l'attacco principale della molecola con un residuo amminoacidico dell'enzima (es sito attivo della COX è dato da COO- con un'arginina con un gruppo guanidinico); poi l'acido arachidonico si piega e con la parte centrale va ad intercettare il sito

catalitico cioè dove avviene la ciclizzazione che dà origine alla cascata da cui si generano prostaglandine ecc...);

Tornando al triptofano, lì avviene l'ancoraggio dell'ACh con la sua testa cationica con interazione catione-pigreco(quindi il sito attivo); poi la molecola lì ancorata proietta la porzione esterea verso il sito catalitico che come nel caso dell'ACh esterasi è formato da una serina ma spesso questo viene coadiuvato da AA vicini e infatti nell'ACh esterasi si parla di triade catalitica cioè caratterizzata da tre aa che promuovono l'idrolisi l'attacco avviene con l'OH serinico e poi ci sono l'istidina e il glutammato.

Quando facciamo interazioni con recettore di base c'è sempre un legame guida cioè principale, di ancoraggio e poi la molecola viene indirizzata verso gli altri gruppi di interazione.

Legame a H

Il legame ad H può essere più o meno forte a seconda di come sono orientati il gruppo accettore o donatore (stesso piano=il legame è più forte). Quindi non abbiamo un unico valore di variazione di energia libera nel momento in cui si forma un legame a H ma abbiamo un range.

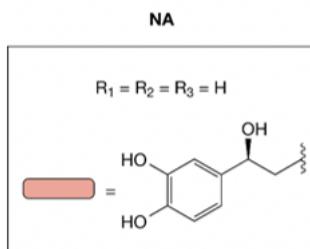
LEGAMI IDROGENO



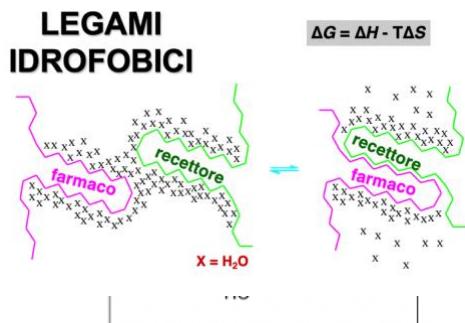
Proprietà direzionali del legame idrogeno

Il legame a H è importante perché l'inserzione di un gruppo OH ci sposta l'energia libera del sistema; per portare un esempio consideriamo i vari NT: la noradrenalina sembra identica alla dopamina ma in catena laterale presenta un gruppo OH.

Innanzitutto a livello di stereochimica la noradrenalina deve essere in configurazione R perché nel recettore c'è una serina e se l'OH si trova dalla parte opposta non può avvenire l'interazione.
Sul recettore adrenergico, la dopamina ha lo stesso effetto che ha la S noradrenalina.



Il legame a H ai fini dell'interazioni è fondamentale in diversi casi, ad esempio, per la doppia elica del DNA o per la stabilizzazione delle proteine.

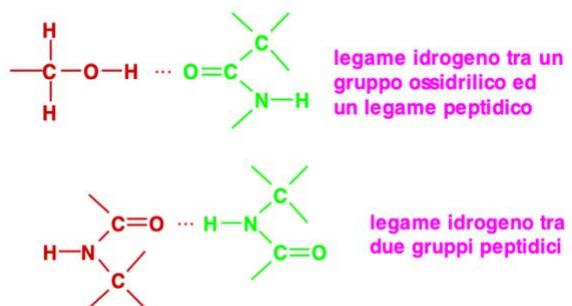


Ese di legami a H:

LEGAMI IDROGENO



LEGAMI IDROGENO



Legame idrofobico

Il **legame idrofobico** avviene tra catene idrofobiche (es legame tra ciclopantanoperidofenantrene che avviene con il recettore degli estrogeni).

Il legame idrofobico tra strutture lipofile deve portare ad una diminuzione di energia libera che corrisponde ad un aumento di entropia che è dato dall'aumento di disordine delle molecole d'acqua che normalmente circondano le due funzioni idrofobiche; quindi la spinta termodinamica per formare l'interazione idrofobica è principalmente entropica ($DS > 0$).

Quindi quando due superfici idrofobiche entrano in contatto le molecole di H_2O perdono la loro struttura ordinata con aumento di entropia e abbassamento di energia.

Relazioni struttura attività

Mettono in relazione i parametri strutturali con i parametri farmacologici.

INTERAZIONE FARMACO-RECETTORE



Per quanto riguarda i parametri strutturali facciamo riferimento alla **struttura** della molecola e a seconda dei gruppi presenti ci saranno gruppi che favoriranno le interazioni e altri che non favoriranno all'interazioni a seconda della complementarità con il recettore.

La **stereoisomeria** è un fondamentale sia in termini di R/S ma anche di configurazione cis/trans (sempre in riferimento ad es agli ormoni dietilstilbestrolo se trans è attivo se cis no)

Per le **caratteristiche chimico-fisiche** consideriamo ad es lipofilia/idrofilia che ci permette di modificare la molecola a seconda di dove vogliamo bersagliarla (ad es che agisca a livello centrale o periferico). Aspetti importanti da considerare sono anche la farmacocinetica e la farmacodinamica in relazione sempre agli aspetti chimico-fisici per il discorso della solubilità di molecole di farmaco, della distribuzione, dell'assorbimento, del metabolismo e dell'eliminazione di queste.

Questi parametri strutturali incidono sicuramente sui parametri farmacologici e sono:

L' **affinità** cioè la capacità che una molecola ha di legarsi fortemente o debolmente ad un determinato target biologico; l'affinità viene definita sia per molecole agoniste che antagoniste.

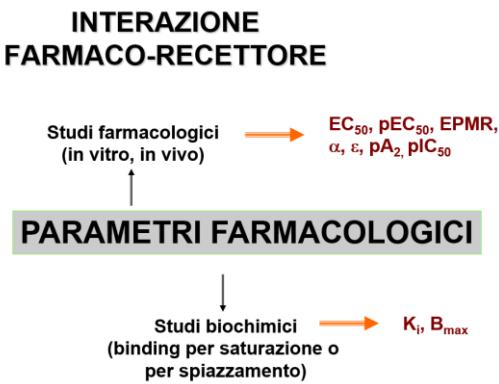
L'**efficacia** cioè la capacità della molecola in grado di dare un'attività biologica dopo aver legato con il recettore; con efficacia si sottintende sia l'attività intrinseca della molecola che le caratteristiche del target biologico con cui deve andare ad interagire;

La **potenza** misura invece quanto fortemente una molecola di antagonista mi inibisce l'azione di un agonista.

Mettendo quindi in rapporto parametri farmacologici e strutturali andiamo a definire le relazioni struttura attività (SAR); nello studio delle varie molecole di farmaco queste ci definiscono l'azione biologica, il sito di interazione, i tipi di legame che si instaurano e il meccanismo d'azione.

Interazione farmaco-recettore

Parametri farmacologici



Gli studi farmacologici sono quelli che ci danno la possibilità di determinare l'attività di una molecola biologicamente attiva, e vengono effettuati per la maggior parte in vitro, ma quando una molecola risulta particolarmente interessante si vanno anche a fare gli studi in vivo.

Normalmente l'attività e affinità di una molecola viene valutata attraverso studi biochimici, cioè di binding, i quali prevedono l'utilizzo di recettori nativi o clonati di determinate cellule (le più usate sono le CHO) e ci danno indicazione della costante di affinità della molecola nei confronti del pool recettoriale,

dandoci l'informazione attraverso uno spiazzamento di un radio ligando. Sono studi di binding per spiazzamento, più difficilmente per saturazione, poiché è più comodo avere un ligando marcato, e andare a valutare l'interazione con i recettori direttamente. In realtà per avere un radio ligando occorre avere anche un laboratorio chimico attrezzato per usare radioisotopi, ed è molto costoso anche sintetizzare molecole radioattive, come molecole triziate (con il trizio al posto dell'idrogeno).

Di conseguenza si fanno gli **studi di spiazzamento**: Si fa incubazione di un radio ligando noto e si sa avere affinità per quei recettori, e si va a misurare la costante di affinità, poi il sistema radio ligando marcato noto di riferimento con i recettori viene incubato con il ligando in questione da studiare, e se il ligando ha affinità per quei recettori spiazza il radio ligando da quei recettori, e si fa una misura per differenza, cioè quale è la radioattività che diluisce nel sistema in quanto viene spiazzato il mio radio ligando.

Dagli studi farmacologici ottengo dei parametri che ci definiscono quantitativamente l'attività delle nostre molecole:

-Quando abbiamo a che fare con un agonista parlo di **EC₅₀**, cioè la concentrazione che produce il 50% della risposta massima. La risposta non è all'infinito, ma si arriva a un plateau definito Emax, ma non si misura l'Emax, bensì il 50% di questa risposta. Il -log di questo valore è il **pEC₅₀**.

-l'**EPMR** (Equipotent Molar Ratio) che mette a confronto una molecola di riferimento con la molecola in studio, e questo valore è un rapporto tra l'attività della molecola in studio rispetto a una molecola di riferimento che può essere lo stesso neurotrasmettore, per valutare se la molecola in studio è più o meno potente di quella di riferimento, e cioè del neurotrasmettore o ligando.

-**L'alfa e l'epsilon**. Non c'è solo l'evento di interazione che dà l'attività. Questo è importante ed è definito da una costante di affinità, ma ci sono delle caratteristiche intrinseche della molecola che mi danno origine all'attività agonista o antagonista. Alfa è l'attività intrinseca, cioè la capacità del farmaco di darmi l'attività biologica del farmaco uguale a quella del neurotrasmettore, oppure di avere il blocco dell'attività dell'agonista. L'alfa che è stata introdotta da Ariens è stata parametrizzata in questo modo:

- Se alfa è uguale a 1 è quella degli agonisti pieni, cioè quelli che si comportano come i neurotrasmettitori che danno origine alla stessa E massima.
- Se alfa è minore di 1 le molecole vengono definite agonisti parziali
- Se alfa è uguale a 0 vengono definiti antagonisti

Epsilon riguarda sempre l'efficacia intrinseca, ma prende in considerazione anche l'altro partner. Nell'interazione non c'è solo il ligando ma anche il recettore. Prende in considerazione anche le caratteristiche dei recettori con cui questo ligando va a interagire, perché in alcuni tessuti esistono dei recettori di riserva, i quali seppur interagiscono con il ligando non sono importanti per dare l'azione biologica, e per questo vengono definiti recettori di riserva.

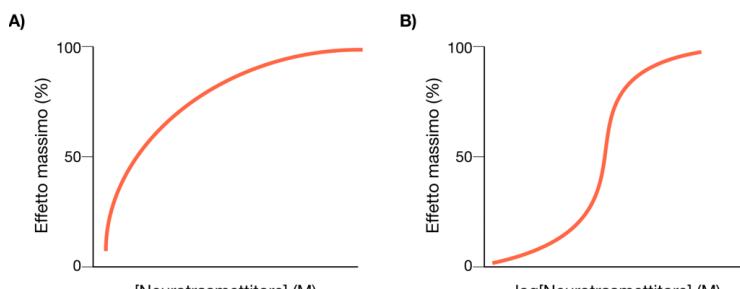
Poi ci sono i due parametri che definiscono gli antagonisti:

-Quando parliamo di **PA2** vedremo che l'antagonista in questione è competitivo, cioè non svilupperà dei legami covalenti con il recettore, ma può essere spiazzato.

Quando ho un antagonismo competitivo l'antagonista si lega al recettore e mi blocca l'attività. Se aumento la concentrazione di agonista, mi spiazzo l'antagonista, se rimetto altro antagonista mi spiazzo l'agonista, se rimetto altro agonista mi spiazzo l'antagonista, poiché interagiscono con lo stesso sito con legami di tipo reversibile. Il PA2 è dato dal -log della concentrazione di antagonista per cui è necessario il doppio della concentrazione di agonista per ottenere lo stesso effetto in assenza di antagonista. Più è alto il PA2, quindi più è bassa questa concentrazione. Se la concentrazione è 10^{-9} , il PA2 è 9, se la concentrazione è 10^{-8} , il PA2 è 8. Il più potente è quello che ha 9, in quanto ha una concentrazione minore di 10^{-9} , ed io ottengo la necessità di aumentare la concentrazione di agonista per avere lo stesso effetto. Tanto più è bassa la concentrazione di antagonista che richiede questo, più alta sarà la sua potenza antagonista, poiché è più efficace a dosi più basse.

-Quando l'antagonismo non è competitivo non si usa il PA2, ma l'**EC50**, che è il -log della concentrazione di antagonista che inibisce il 50% della risposta massima dell'agonista. In questo caso anche se si va ad aumentare la concentrazione di agonista, siccome agiscono su due siti diversi, non si ripristina l'attività; quindi, non ha senso parlare di PA2.

Negli studi biochimici si misura una costante di inibizione. Con gli studi di spiazzamento si misura la **Ki**, che è una costante di inibizione di quanto viene inibito il legame del radio ligando con questi recettori da parte della molecola che non è marcata. In questo caso è una misura della potenza/capacità del ligando di interagire con quel recettore: tanto è più bassa la ki, tanto più il ligando è potente, perché ha la capacità di spiazzare il radio ligando dal complesso col recettore.



Curva concentrazione–risposta che si ottiene per concentrazioni crescenti di un neurotrasmettore (agonista) sul processo di contrazione di un muscolo: A, scala lineare; B, scala semilogaritmica per le concentrazioni.

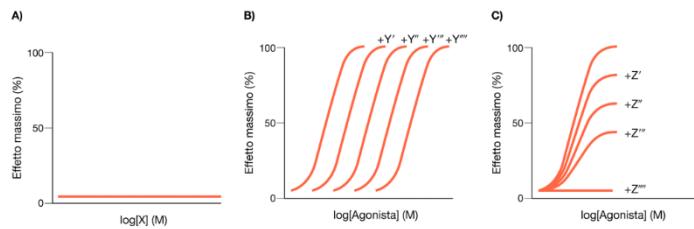
Le curve base-risposta si ottengono da questi studi. Si può fare un esempio pratico: il sistema colinergico innerva, per esempio, la muscolatura liscia intestinale; quindi, uno studio degli agonisti muscarinici è andare a registrare la contrazione della muscolatura liscia dell'ileo in seguito a incubazione con acetilcolina ad esempio.

Quello che si ottiene, se si mette la concentrazione dell'acetilcolina con l'effetto di contrazione, si ottiene la curva di sinistra

che raggiunge un massimo (Emax) dopo cui non si va oltre, e si ha un plateau. In realtà non si va a misurare quel plateau, quell'Emax, ma si fa una scala semilogaritmica e si ottengono dei sigmoidi e, cioè si va a riportare il logaritmo della concentrazione del neurotrasmettore verso un effetto massimo. La scala semilogaritmica è

la migliore misura, perché nella parte centrale della scala per piccole variazioni di concentrazione di neurotrasmettitori, si ha un'impennata elevata dell'effetto, e quindi si compie un minore errore nell'andare a misurare un effetto del 50%, al 50% si traccia la parallela all'asse delle x, e questa quindi è il -log della concentrazione di neurotrasmettore che provoca il 50% della risposta massima, e cioè che mi definisce l'EC50.

Studi farmacologici: curve concentrazione-risposta



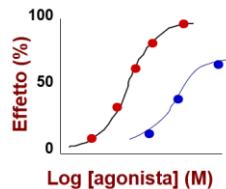
Curva concentrazione-risposta di un antagonista X (A); effetto di concentrazioni crescenti di (B) un antagonista competitivo Y (Y' - Y'' - Y''') e di (C) un antagonista non competitivo Z (Z' - Z'' - Z''') sulle curve concentrazione-risposta di un agonista.

contrazione dell'ileo. Quello che si osserva è una retta poco sopra lo zero parallela all'asse delle x (nessuna attività).

A destra si vedono gli studi in presenza di agonista. Si fa questo per vedere il meccanismo d'azione. Si fa prima la curva con l'agonista. È indispensabile fare questo, perché si potrebbe avere un tessuto che non risponde bene. Quindi per vedere se funziona devo prima fare la curva con l'agonista. Si vede la curva, si raggiunge l'effetto massimo e questa è la curva dell'agonista. A questo punto si ha un sistema in cui si è formato un complesso tra l'agonista con i recettori. Si va ad incubare con l'antagonista e si vede che la contrazione diminuisce, perché l'agonista spiazza l'antagonista. Ma se si va ad aumentare la concentrazione di agonista, si ripristina di nuovo il massimo, ma si ha una concentrazione più alta di agonista, perché mi è servita per spiazzare l'antagonista che mi aveva portato giù la contrazione.

Faccio l'incubazione con una concentrazione superiore di antagonista, ma se si aumenta l'agonista si torna alla stessa curva. Le curve sono parallele, spostate verso destra e proporzionali alla concentrazione di antagonista che abbiamo messo. Quando si ottengono queste curve si è in presenza di un antagonismo competitivo, perché si raggiunge sempre il massimo. Viceversa, la curva tutta a destra fa vedere, all'aumentare della concentrazione di agonista, un abbassamento del massimo fino ad arrivare a 0 per concentrazioni più elevate di antagonista. Questo vuol dire che anche se si va ad aumentare la concentrazione di agonista, essendo l'antagonista non competitivo, non si riesce mai a ripristinare massimo. In questo caso si parla di PC50, nel caso di prima di PA2.

Studi farmacologici: curve concentrazione-risposta



Curve concentrazione-risposta di un agonista parziale in confronto ad un agonista pieno (neurotrasmettitore).

Cosa succede se la molecola è un agonista parziale?

In confronto ad un agonista pieno, la curva blu è spostata verso destra, ma la cosa più importante di tutte è che non raggiunge lo stesso effetto massimo dell'agonista pieno. In alcuni casi l'agonismo parziale è preferibile al pieno.

Teorie recettoriali: Clark 1933

Teorie Recettoriali (Occupazionale: Clark 1933)



• La reazione è bimolecolare e governata dalla legge di massa

• La risposta è linearmente proporzionale al numero di recettori occupati; la risposta massima si ha quando tutti i recettori sono occupati:

$$\frac{E_A}{E_{\max}} = \frac{[RA]}{[R_T]} = \frac{[A]}{K_A + [A]}$$

• La risposta di ogni recettore è del tipo "tutto o nulla". La risposta misurata corrisponde all'occupazione dei recettori all'equilibrio.

Describe la risposta di un agonista in funzione della frazione di recettori occupati

$$\frac{E_A}{E_{\max}} = \frac{[RA]}{[R_T]} = \frac{[A]}{K_A + [A]}$$

$\frac{[RA]}{[R_T]} = 1$: effetto massimo (tutti i recettori sono occupati)

$\frac{[RA]}{[R_T]} = 0,5$: effetto pari al 50% dell'effetto massimo
(l'agonista occupa il 50% dei recettori)

↓
EC₅₀ (concentrazione di agonista [A] che provoca il 50% dell'effetto massimo)

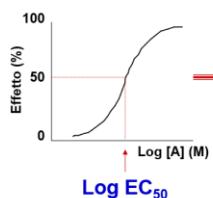
Il primo studioso che si è occupato della reazione bimolecolare tra recettore e agonista è stato Clark nel 1933, e la sua teoria che è alla base dello studio quantitativo dell'interazione farmaco-recettore. Lui aveva ipotizzato che la risposta che i recettori danno è proporzionale al numero di recettori occupati. Se occupo il 50% dei recettori, avrò l'EC₅₀, cioè la concentrazione che mi provoca il 50% della risposta massima, ma si è visto con le teorie successive che questo non è sempre vero.

Clark arrivò alla relazione finale per cui l'attività per qualsiasi concentrazione di recettori occupati è sempre proporzionale al numero di recettori occupati. Dalla trattazione matematica questa attività per una determinata concentrazione di agonista sull'effetto massimo che si può avere è uguale alla concentrazione dell'agonista sulla K_A, dove quest'ultima è la costante di dissociazione dell'agonista + la concentrazione di A. Quando RA=RT tutti i recettori sono stati occupati.

Andando a sostituire RA/RT=1 o 0,5, nel primo caso si ha l'effetto massimo, nell'altro l'EC₅₀. Se si va, quindi, a sostituire lo 0,5 nell'equazione, si vede che l'EC₅₀ è esattamente l'agonista che provoca il 50% dell'effetto massimo. Questo non è sempre vero, non c'è la corrispondenza tra l'EC₅₀ e i recettori occupati, poiché in alcuni tessuti ci sono dei recettori di riserva che non concorrono alla risposta biologica.

$$\frac{E_A}{E_{\max}} = \frac{[RA]}{[R_T]} = \frac{[A]}{K_A + [A]} \quad \text{Ponendo } [A] = EC_{50} \text{ e } \frac{[RA]}{[R_T]} = 0,5$$

$$0,5 = \frac{EC_{50}}{K_A + EC_{50}} \quad \text{da cui } 0,5(K_A + EC_{50}) = EC_{50}; \quad EC_{50} = K_A$$



di norma:

EC₅₀ < K_A, cioè si ottiene il 50% E_{max} ancora prima di occupare il 50% dei recettori

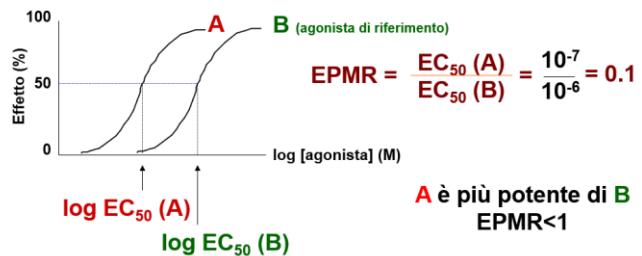
$$pD_2 = -\log EC_{50}$$

Se si va a sostituire ad RA/RT 0,5 risulta che l'EC₅₀=K_A. Questo vuol dire che la costante di dissociazione dell'agonista è uguale alla sua EC₅₀, cioè alla concentrazione che provoca il 50% dell'effetto massimo, che si va a vedere sulla curva in corrispondenza del 50% dell'effetto massimo. L'EC₅₀ nella maggior parte dei tessuti è minore della K_A, cioè si ottiene il 50% della risposta massima anche quando si sono occupati meno del 50% dei recettori. In alcuni casi si trova il -log che viene definito con il pD2.

Adesso vediamo l'EPMR. Quando si paragonano due agonisti, la cosa importante è che le curve che questi due agonisti danno siano parallele. Vuol dire che agiscono sullo stesso sito. Se le curve non sono parallele è difficile fare il paragone.

Confronto tra agonisti:

- curve parallele
- concentrazioni che producono il medesimo effetto
- EquiPotent Molar Ratio (EPMR ha senso solo se le curve sono parallele)



Se si hanno due molecole, B e A, dove B è la molecola di riferimento e la A è la molecola in studio, l'EPMR in cosa consiste?

Si va a fare il rapporto dei loro EC50. L'EC50 di B è più alto di quello di A; quindi, si deduce da questa curva che siccome A ha il 50% della risposta massima e ha una concentrazione inferiore, sarà più attivo di B. La curva sarà a sinistra, non a destra rispetto alla molecola di riferimento. Se si fa il rapporto degli EC50 si ottiene un numero inferiore a 1. Quando l'EPMR è inferiore a 1, vuol dire che il composto che si sta studiando è più potente di quello di riferimento. Se è maggiore di 1 il composto di riferimento è più potente di quello in studio, quindi l'EPMR è il rapporto tra gli EC50 di un composto in studio rispetto all'EC50 di un composto di riferimento.

Teoria recettoriale di Clark modificata da Ariens

Teoria Recettoriale di Clark (modificata da Ariëns)

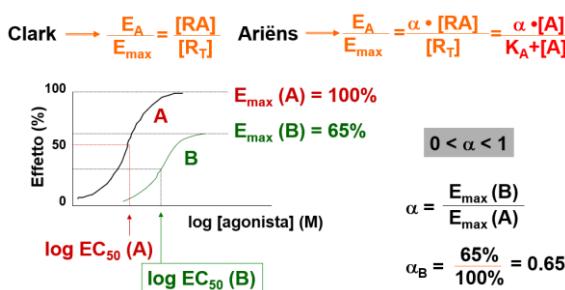
Resta valida l'assunzione della linearità con il numero di recettori occupati ma l'interazione di un farmaco con il recettore viene scissa in due stadi:

- complessazione con il recettore
- produzione dell'effetto

La teoria di Clark è stata rivista da Ariens. Ariens ebbe l'intuizione e fu quello che portò alla modifica delle teorie recettoriali, perché non si spiegava perché una molecola interagendo nello stesso modo con il recettore in un caso si comportasse da agonista e, in un altro caso non desse nessun effetto.



$$\boxed{\text{Effetto biologico} = \text{attività intrinseca} \cdot \text{numero di recettori}}$$



Ariëns disgiunse la produzione di questo effetto dalla complessazione con il recettore, cioè la complessazione con il recettore viene misurata dalla sua costante di dissociazione, ma il fatto che dia un'attività o un'altra dipende dalla cosiddetta attività intrinseca del ligando che lui chiamò alfa, ed è quella che rende conto dell'effetto biologico finale. Se l'attività intrinseca è uguale a 1 è un agonista pieno; se l'attività intrinseca è tra 0 e 1 è un agonista parziale; se l'attività intrinseca è uguale a 0 è un antagonista.

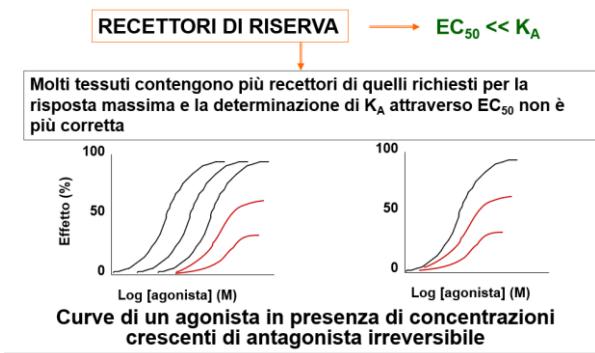
Recentemente sono stati classificati gli agonisti inversi. Quindi l'effetto biologico non è solo dovuto ai recettori occupati, ma anche all'attività intrinseca. Quando alfa è uguale ad 1, si ha un agonista pieno e ritorno all'equazione vista precedentemente; quando non è uguale a 1, non si ha il 100% dell'effetto massimo. Per esempio, se alfa è uguale a 0,65, in questo caso ho una curva parallela ma spostata verso destra e verso il basso, la seconda molecola che dà il 65% dell'effetto massimo rispetto all'agonista pieno, viene chiamato agonista parziale.

Non sempre il farmaco che è un agonista parziale è da buttare, perché quando si utilizzano delle molecole per uso cronico, come i broncodilatatori nell'asma, e i recettori con cui vanno ad interagire che in questo caso sono i recettori beta 2 adrenergici, danno origine a desensitizzazione recettoriale (è l'esposizione cronica che dà origine a desensitizzazione), e quindi si ha una minor risposta. Con un agonista pieno questa desensitizzazione avviene in tempi rapidi, perché c'è una stimolazione con un effetto massimo continuo. È richiesto quando si hanno a che fare con dei recettori che danno desensitizzazione un agonista parziale che comunque mi dà l'effetto broncodilatatore, però esercita un effetto meno forte sulla desensitizzazione del recettore. I recettori rimangono più responsivi. Un altro esempio è la varenichina che viene usata nella disassuefazione da fumo. Anche in quel caso si parla di un agonista parziale nei confronti dei recettori nicotinici, ma questo dipende dall'effetto e dall'uso che si fa di una molecola. Non sempre l'agonismo parziale è un effetto non voluto.

Teoria recettoriale di Clark modificata da Stephenson & Furchtgott



Successivamente ad Ariëns Stephenson e Furchgott inserirono un altro parametro, ma bisogna considerare anche le caratteristiche del tessuto con cui si va ad interagire. I due ricercatori misero in campo l'efficacia intrinseca, che tiene conto del fatto che in alcuni tessuti ci sono i recettori di riserva, cioè dei recettori che sono in grado di dare la risposta biologica anche quando è occupata una frazione recettoriale, rispetto a tutti i recettori, piccola e che viene inattivata.



Esempio: ci sono delle molecole che sono degli antagonisti irreversibili come quelli con i ponti di solfuro. Questi danno una curva come quella di destra, essendo antagonisti irreversibili, perché non si ha una curva spostata verso destra e parallela, ma anche se aumenta la concentrazione di agonista si osserva sempre un abbassamento del massimo fino ad arrivare a 0.

In alcuni tessuti però è importante partire da concentrazioni sempre molto basse e mano a mano salire

con la concentrazione, perché ci si può trovare di fronte ad un caso in cui a basse concentrazioni si ha un andamento delle curve come quelle di sinistra, cioè si osserva a basse concentrazioni che aumentando la concentrazione di agonista si ottiene sempre l'effetto massimo, e cioè se in quel tessuto ci sono dei recettori di riserva, questi recettori a basse concentrazioni di antagonista sono in grado di mantenere l'attività anche quando una piccola porzione di recettori è inattivata, cioè l'antagonista irreversibile a bassa concentrazione si lega a un certo numero di recettori, ma si hanno i recettori di riserva che continuano a garantire l'attività agonista. All'aumentare della concentrazione di antagonista saranno coinvolti anche i recettori che consentono di dare l'attività biologica; quindi, a mano a mano che ci si sposta verso concentrazioni più alte ottengo le stesse curve che ho con l'antagonismo irreversibile. Se io ottengo da uno studio la curva di sinistra o la curva di destra, in quest'ultimo caso non ho un tessuto con recettori di riserva, nel caso di sinistra sì.

Lezione di Chimica Farmaceutica e Tossicologica II #3 del 17/10/2023

Docente: Anna Minarini

Sbordinatore: Tullia Merola

Revisore: Eleonora Stomeo

Domanda: "può ripetere gli ultimi due grafici?"

Il grafico di destra è lo studio di un antagonista irreversibile in un tessuto che non contiene recettori di riserva, e la cui curva dose-risposta è la stessa analizzata precedentemente. È necessario, però, studiare le molecole anche a concentrazioni basse per avere indicazioni sulla presenza o meno di recettori di riserva.

Il grafico di sinistra, invece, rappresenta il comportamento di un antagonista irreversibile in un tessuto che contiene recettori di riserva. Quando l'antagonista irreversibile è presente in concentrazioni basse (parte iniziale del grafico), seppure si leggi in maniera irreversibile ai recettori, sembra che si comporti da antagonista reversibile competitivo; si avrà infatti uno spostamento delle curve verso destra ma, al tempo stesso, verrà mantenuto sempre l'effetto massimo. Questo dipende dal fatto che nel tessuto sono presenti dei recettori di riserva; questi sono in grado di dare la risposta biologica in presenza dell'agonista sebbene una porzione di recettori venga inattivata dall'antagonista irreversibile. A basse concentrazioni ($10^{-8}/10^{-9}/10^{-10}$), infatti, si ha un comportamento di antagonismo competitivo, falsato dalla presenza di recettori che rispondono ugualmente nonostante l'inattivazione. Ad alte concentrazioni questi recettori non rispondono più e si inizia a vedere l'antagonismo irreversibile.

Per questo motivo, solitamente, l' EC_{50} (concentrazione di agonista che dà il 50% della risposta massima) non corrisponde esattamente alla K_A (costante di dissociazione della molecola), poiché dipende dalle caratteristiche del tessuto e dei recettori.

Studi in vivo

Gli studi in vivo ci danno informazioni su due parametri:

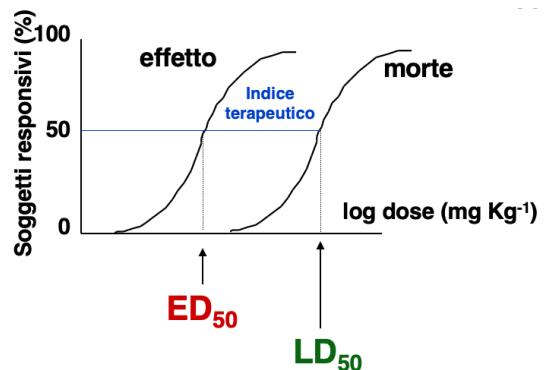
- ED₅₀ o dose efficace 50, è la dose che provoca l'effetto terapeutico desiderato nel 50% dei soggetti trattati.
- LD₅₀ o dose letale 50, è la dose che provoca il 50% della morte dei soggetti.

È importante ricordarsi che tra i due non c'è alcuna correlazione, come non c'è tra l'EC₅₀ e l'ED₅₀; in un caso parliamo di uno studio sull'organo isolato, mentre nel secondo di un effetto terapeutico che dipende dall'attraversamento delle membrane e dalla farmacocinetica (non solo, quindi, dalla farmacodinamica).

Lo studio in vivo ci dà un altro dato importante: l'indice terapeutico, dato dal rapporto tra i due parametri.

$$I.T. = \frac{LD_{50}}{ED_{50}}$$

L'indice terapeutico è una misura della sicurezza del farmaco e dovrebbe essere un valore elevato; le due concentrazioni dovrebbero infatti essere valori molto distanti. Ad esempio, farmaci come digitali cardioattivi che hanno un indice terapeutico al limite, devono essere utilizzati con molta attenzione perché la tossicità è molto vicina alla dose efficace.

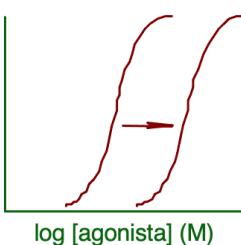


Costanti di dissociazione degli antagonisti

L'antagonismo può essere competitivo e non competitivo, termini che posso essere sostituiti da sormontabile e insormontabile (che non può essere superato da un aumento della concentrazione di agonista).

Antagonismo sormontabile

Il grafico che si ottiene è quello riportato in figura. Sono riportati tre casi:



SORMONTABILE

1. Competitivo (reversibile)
2. Allosterico (reversibile)
3. Competitivo (irreversibile)

1. Quando parliamo di antagonismo competitivo reversibile, le curve-dose risposta che otteniamo sono parallele, spostate verso destra e proporzionali alla concentrazione di agonista aggiunto (come già visto).

2. Relativamente all'antagonismo sormontabile abbiamo anche l'antagonismo allosterico, in cui l'antagonista interagisce con un sito diverso da quello ortosterico ma che è strettamente interconnesso ad esso. L'interazione tra antagonista allosterico e sito allosterico va a modificare la conformazione del recettore in maniera tale che l'agonista non riesca più a interagire con il sito ortosterico; in questo caso, pur essendo un antagonismo reversibile, l'aumento della concentrazione dell'agonista non è esattamente proporzionale all'antagonista aggiunto. Le curve dose-risposta raggiungono un massimo e sempre parallele tra loro ma, a differenza delle precedenti, non

essendoci un'azione diretta sul sito ortosterico, risultano spostate di tratti diversi.

Oltre all'antagonismo allosterico esiste anche l'agonismo allosterico, di cui parleremo quando faremo i recettori del GABA. I farmaci che agiscono a livello di questi recettori, infatti, legano il sito allosterico portando ad una modificazione conformazionale del recettore tale per cui il GABA possa legarsi più favorevolmente.

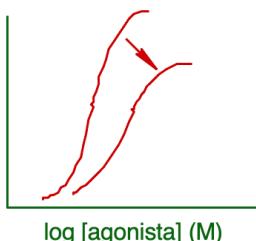
Nel caso in cui, invece, l'interazione della molecola con il sito allosterico diminuisca l'affinità dell'agonista per il sito, si parlerà di antagonista allosterico.

Nell'antagonismo allosterico i due siti sono tra loro interconnessi, mentre, come vedremo, nell'antagonismo non competitivo non lo sono.

3. Nello schema sono riportati anche gli antagonisti competitivi irreversibili perché, come è stato detto precedentemente, questi, in presenza di recettori di riserva e a basse concentrazioni, si comportano come gli antagonisti reversibili competitivi.

Antagonismo insormontabile

Per quanto riguarda gli antagonismi non competitivi esistono due casistiche:



INSORMONTABILE

1. Non competitivo (reversibile)
2. Non competitivo (irreversibile)

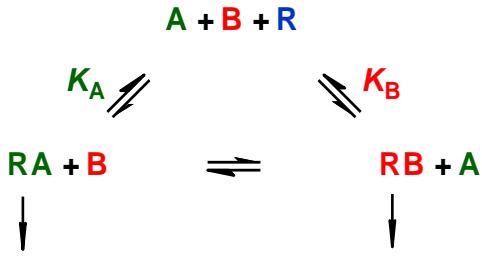
1. Antagonismo non competitivo reversibile: la molecola si lega ad un sito diverso da quello ortosterico con legami reversibili. Anche aumentando la concentrazione dell'agonista non si ha lo spiazzamento dell'antagonista perché i due siti sono diversi e il recettore rimane bloccato. I due siti non sono interconnessi tra di loro.

2. Antagonismo non competitivo irreversibile: la molecola si lega al sito ortosterico ma con dei legami di tipo covalente per cui, anche aumentando la concentrazione di agonista, non si ha spiazzamento. Pur andando sullo stesso sito, il tipo di legame fa sì che l'interazione tra i due sia irreversibile.

L'antagonismo insormontabile si può avere sia quando la molecola si lega (reversibilmente o irreversibilmente) ad un sito diverso da quello dell'agonista (sito non ortosterico) sia quando si lega in maniera irreversibile ad una qualsiasi altra porzione del recettore

Antagonisti competitivi

Quando si ha a che fare con un antagonista e con un agonista competitivo, si ha a che fare con un sistema a tre dove A è l'agonista, B l'antagonista e R il recettore.



Risposta biologica

Nessuna risposta

L'agonista e l'antagonista competono per i recettori; all'aumentare di B si ha lo spiazzamento del complesso RA e all'aumentare di A si ha lo spiazzamento del complesso RB. Questi equilibri sono descritti in figura: K_A descrive l'affinità dell'agonista con il recettore e dà la risposta biologica; la K_B descrive l'equilibrio dell'interazione del recettore con l'antagonista che

non mi dà invece nessuna risposta. Quindi, se aumenta la concentrazione di agonista questo va a spiazzare il complesso antagonista-recettore così da avere la risposta biologica; se invece aumenta la concentrazione di antagonista sposta invece l'equilibrio verso destra (verso il complesso RB) e non ho nessuna risposta (parliamo infatti di antagonisti competitivi).

$$K_A = \frac{[R] \cdot [A]}{[RA]} ; \quad [R] = \frac{K_A \cdot [RA]}{[A]} \quad K_B = \frac{[R] \cdot [B]}{[RB]} ; \quad [RB] = \frac{[R] \cdot [B]}{K_B}$$

$$\begin{aligned} [R_T] &= [R] + [RA] + [RB] = \frac{K_A \cdot [RA]}{[A]} + [RA] + \frac{[R] \cdot [B]}{K_B} = \\ &= \frac{K_A \cdot [RA]}{[A]} + [RA] + \frac{K_A \cdot [RA] \cdot [B]}{[A] \cdot K_B} = [RA] \left(\frac{K_A}{[A]} + 1 + \frac{K_A \cdot [B]}{[A] \cdot K_B} \right) \end{aligned}$$

$$R_T = [RA] \left(\frac{K_A}{[A]} + 1 + \frac{K_A \cdot [B]}{[A] \cdot K_B} \right) = [RA] \frac{K_A \cdot K_B + [A] \cdot K_B + K_A \cdot [B]}{[A] \cdot K_B}$$

$$\frac{[RA]}{[R_T]} = \frac{[A] \cdot K_B}{K_A \cdot K_B + [A] \cdot K_B + K_A \cdot [B]} ; \text{ dividendo per } K_B \text{ si ha:}$$

$$\frac{[RA]}{[R_T]} = \frac{[A]}{K_A + [A] + \frac{K_A \cdot [B]}{K_B}} = \frac{[A]}{K_A \left(1 + \frac{[B]}{K_B} \right) + [A]}$$

In assenza di antagonista, quindi per $[B]=0$, si ha

$$\frac{[RA]}{[R_T]} = \frac{[A]}{K_A + [A]}$$

Ma non è questo il caso che stiamo analizzando; è necessario tenere conto della presenza dell'antagonista e della sua costante di dissociazione K_B . Cosa succede quando $B>0$?

$$\frac{[RA]}{[R_T]} = \frac{[A]}{K_A \left[1 + \frac{[B]}{K_B} \right] + [A]}$$

Per avere la stessa risposta (ovvero occupare lo stesso numero di recettori) la concentrazione di A deve aumentare ad A' : quando si ha un antagonista competitivo si può ritornare all'effetto massimo andando ad aumentare la concentrazione di agonista (fenomeno dello spiazzamento).

L'attività torna ad essere la stessa iniziale se, in presenza di antagonista, si aumenta la concentrazione di agonista fino ad un valore A' (superiore ad A).

$$\frac{[A]}{K_A+[A]} = \frac{[A']}{K_A \left[1 + \frac{[B]}{K_B} \right] + [A']}$$

Risolvendo rispetto ad A' su A:

$$\frac{[A]}{K_A+[A]} = \frac{[A']}{K_A \left[1 + \frac{[B]}{K_B} \right] + [A']} = \frac{[A'] \cdot K_B}{K_A \cdot K_B + K_A[B] + K_B[A']}$$

$$[A] \cdot (K_A K_B + K_A[B] + K_B[A']) = K_B[A'] \cdot (K_A + [A])$$

$$K_A K_B [A] + K_A [B][A] + K_B[A'][A] = K_A K_B [A'] + K_B[A'][A]$$

$$[A] \cdot (K_A K_B + K_A[B]) = K_A K_B [A'] \text{ da cui:}$$

$$\frac{[A']}{[A]} = \frac{K_A K_B + K_A[B]}{K_A K_B} = 1 + \frac{[B]}{K_B}$$

L'equazione finale indica che la nuova concentrazione di agonista necessaria per avere lo stesso effetto in presenza di antagonista $[A']$, sulla concentrazione di agonista senza antagonista $[A]$, è uguale al rapporto tra concentrazione di antagonista $[B]$ e la costante di dissociazione dell'antagonista K_B , +1.

Stiamo cercando di trovare la potenza dell'antagonista, quindi la sua costante di dissociazione.

Portando l'1 a sinistra, avremo:

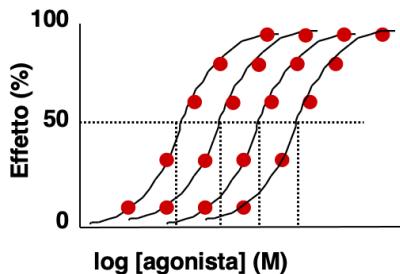
$$\frac{[A']}{[A]} - 1 = \frac{[B]}{K_B}$$

Ponendo il rapporto tra $[A']$ e $[A]=x$, si ottiene:

$$\frac{[A']}{[A]} = x; \quad x - 1 = \frac{[B]}{K_B}$$

Trasformando in logaritmo, avremo:

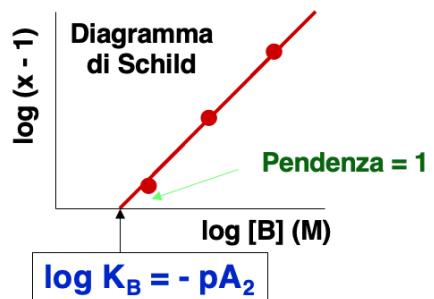
$$\log(x-1) = \log[B] - \log K_B$$



Graficamente è possibile vedere che, all'aumentare della concentrazione di agonista, le curve dose-effetto risultano spostate verso destra e parallele tra di loro. Inoltre, si ha sempre il raggiungimento dell'effetto massimo e una proporzionalità con la concentrazione di antagonista.

Dalla trasformazione dell'equazione a logaritmo, si avrà invece l'equazione di una retta. Per graficare si pone in ordinata $\log(x-1)$ (logaritmo del rapporto tra le due concentrazioni di agonista con e senza l'antagonista, -1) e in ascissa $\log B$ (concentrazione dell'antagonista).

Il grafico prende il nome di diagramma di Schild e la pendenza della retta è uguale a 1.



Quando si parla di pA_2 ?

Ponendo $x=2$:

Per $x = 2$:

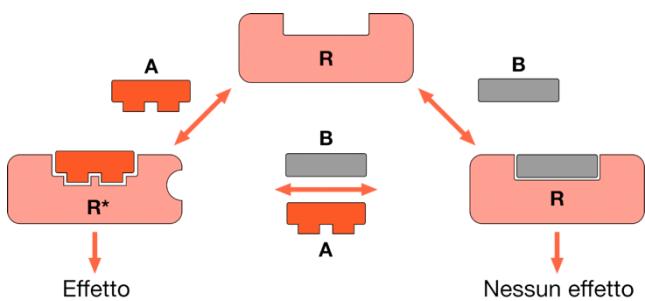
$$\log(2 - 1) = \log[B] - \log K_B = 0$$

$$\log[B] = \log K_B; pA_2 = -\log K_B$$

Quando si ha il raddoppiamento della concentrazione di agonista rispetto a quella iniziale senza antagonista, il logaritmo di B risulta essere uguale al logaritmo della K_B . Nel diagramma di Schild questo valore corrisponde all'intercettata della retta sull'asse delle x; infatti, l'intercetta si ha quando il log di $x-1$ è uguale a zero, quindi quando x (rapporto tra le due concentrazioni di agonista) è 2. Il logaritmo della K_B è uguale a $-pA_2$ quando ho raddoppiato la concentrazione dell'agonista e, per questo motivo, pA_2 è una misura della costante di dissociazione dell'antagonista; non ha nessun senso utilizzarlo per gli antagonisti non competitivi dal momento che stiamo parlando di una attività che deve tornare ad essere la stessa iniziale.

È necessario specificare un aspetto. Di solito la costante di dissociazione di una agonista è intorno a 10^{-6} , 10^{-7} , mentre quella di un antagonista arriva anche a 10^{-9} (costante più piccola indice di affinità maggiore). Ma da cosa dipende la differenza tra queste due costanti di dissociazione?

Nel momento in cui un recettore che si trova in una conformazione degenere è nelle vicinanze di un agonista, cambia la sua struttura conformazionale per avere un adattamento recettore-agonista; si ha così l'attivazione del recettore e il conseguente effetto biologico.

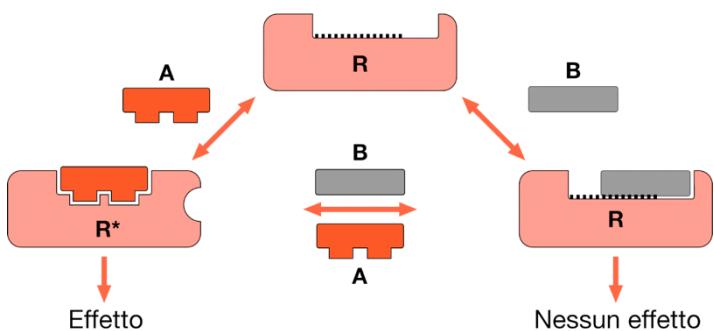


Quando l'antagonista B (in questo caso un antagonista competitivo) va ad interagire con lo stesso sito, l'agonista A non ha più la possibilità di interagire perché il sito è occupato completamente dall'interazione dell'antagonista con il recettore. Se i due sono competitivi, all'aumentare di A si torna alla situazione di sinistra, all'aumentare di B si ritorna alla situazione di destra.

Solitamente, però, nonostante il sito ortosterico sia lo stesso per agonisti e antagonisti, non è detto che non ci siano interazioni con dei siti adiacenti (siti accessori); l'antagonista spesso stabilisce con il recettore delle interazioni ulteriori che fanno sì che la K_B di dissociazione sia più bassa rispetto alla K_A : si ha quindi attività a concentrazioni più basse rispetto a quelle che si hanno per l'effetto di un agonista.

Nella figura, la linea tratteggiata indica il sito ortosterico dove interagisce l'agonista; l'antagonista non necessariamente forma legami solo su questo sito, ma può andare ad occupare anche porzioni adiacenti al recettore. Lo spiazzamento dell'agonista avviene anche se la tipologia di legame che ha l'agonista con il recettore non è esattamente la stessa, ma si hanno legami ulteriori anche in posizioni accessorie (sempre nell'intorno della porzione ortosterica di legame).

In ogni caso, aumentando la concentrazione dell'agonista, il sito può essere sbloccato.



Nessun effetto

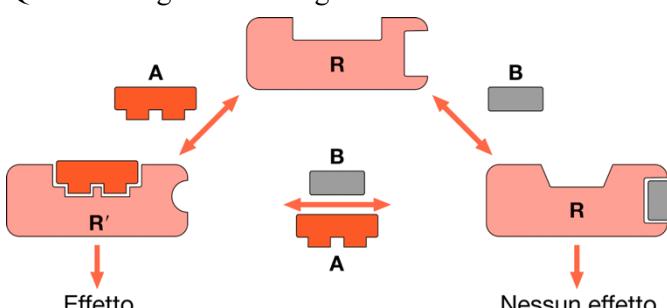
Antagonismo allosterico

In questa tipologia di antagonismo sono coinvolti due siti interconnessi tra loro, quello ortosterico e quello allosterico: l'interazione tra un ligando e il sito ortosterico provoca una modifica conformazionale del sito allosterico e viceversa.

Quando un agonista interagisce con il sito ortosterico si ha sia l'attivazione del recettore che la variazione delle

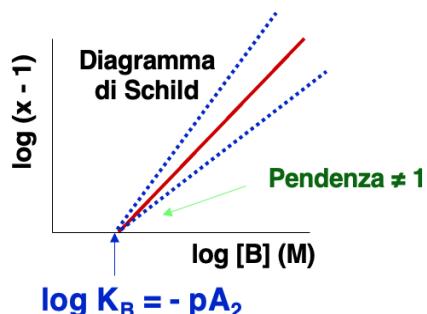
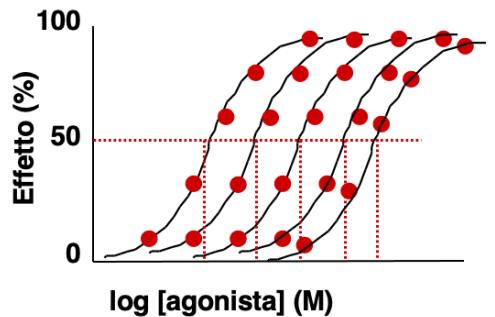
caratteristiche conformazionali del sito allosterico interconnesso, mentre quando l'antagonista interagisce con il sito allosterico, l'interazione non dà alcun effetto ma provoca una modifica conformazionale sul sito ortosterico che fa sì che non ci sia più interazione agonista-recettore. Andando ad aumentare la concentrazione di agonista, è comunque possibile spostare

l'equilibrio verso sinistra (verso l'interazione e quindi verso l'effetto biologico); viceversa, andando ad aumentare la concentrazione dell'antagonista, l'equilibrio si sposta verso la formazione del complesso recettore-antagonista e non si ha nessun effetto. I due siti si influenzano reciprocamente: l'uno diminuisce l'affinità dell'altro.



Nessun effetto

In questo caso, pur essendo un antagonismo competitivo, si parla di antagonismo allosterico; si ha ugualmente uno spiazzamento ma, essendo un sito di interazione diverso, le curve dose-risposta non saranno più direttamente proporzionali alla concentrazione di antagonista aggiunto. Man mano che mi sposto verso destra, lo spostamento della curva diminuisce all'aumentare della concentrazione di antagonista allosterico; è quindi necessario fare gli studi a concentrazioni sempre crescenti. Questo perché, a basse concentrazioni, si potrebbe vedere un andamento simile a quello competitivo ma, all'aumentare della concentrazione, la distanza tra le curve inizierà a diminuire.



Anche la pendenza della curva del diagramma di Schild, non essendoci proporzionalità diretta tra le due concentrazioni, è diversa da 1.

Accanto agli studi farmacologici su organi isolati, generalmente quello che si fa in prima battuta per vedere l'affinità di una molecola nei confronti di un determinato sistema recettoriale, è eseguire studi di binding.

Gli studi di binding possono essere di 2 tipi:

- 1) di saturazione, in presenza del radio ligando disponibile
- 2) di spiazzamento, se occorre studiare una molecola nuova non marcata.

Prima di eseguire uno studio di spiazzamento è necessario andare a vedere la costante di dissociazione e la Emax, dedotte da studi di saturazione mediante impiego di un radioligando. Da questi studi di saturazione con radio ligando, è possibile determinare la costante di dissociazione del radio ligando, parametro importante da tenere in considerazione nello studio di spiazzamento, a livello del quale vi è una competizione fra l'interazione del radio ligando con il sistema recettoriale e il ligando in studio. Dagli studi di saturazione, dalla pendenza della retta di Scatchard è possibile dedurre il valore di Kd, ossia l'affinità del radioligando ai recettori.

Il valore di Kd si misura facendo una conta della radioattività: conoscendo la concentrazione del radio ligando, si osserva la quantità di complesso recettoriale che si è formato attraverso la conta della radioattività. Maggiore è la radioattività, maggior quantità di radioligando si è legato al recettore. Il processo prevede l'incubazione del radioligando con il sistema recettoriale (si usano recettori nativi o recettori clonati sulle cellule cho), dopo di che si lava e si osserva umanità radioattività permane nel complesso formatosi.

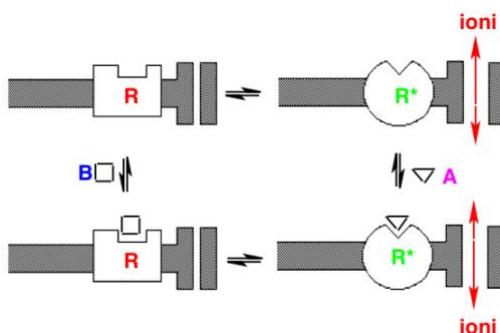
Dall'equazione di Scatchard deduco così la costante di dissociazione.

Successivamente eseguo lo studio di spiazzamento con il ligando non marcato, il quale tanto più esso è affine al sistema recettoriale, maggiore spiazzerà il radioligando (indicato con L) dal complesso radioligando-recettore (I). Tale studio è sì di competizione ma anche di inibizione perché i ligandi più potenti e più spiazzanti inibiscono l'interazione fra il radioligando e i recettori.

Da questi studi, dopo l'incubazione del ligando con il sistema recettoriale recettero radioligando, si osserva la radioattività residua: maggiore è l'entità dello spiazzamento, meno radioattività troverò nel sistema.

Da quest'ultimo studio deduco IC50, ossia la concentrazione del composto in studio (composto inibitore) che ha spiazzato il 50% del radioligando dal sistema ligando-recettore e tale valore, insieme alla Kd trovata mediante i precedenti studi di saturazione, serve a determinare la costante di dissociazione del complesso recettore-ligando in studio, la quale descrive quanto è affine il ligando in studio per quel sistema recettoriale. In tal caso si rileva un'affinità e non un effetto: si osserva quanto la molecola in studio è affine al sistema recettoriale preso in esame (in tali studi è poi possibile inserire secondi messaggeri e valutare una loro possibile inattivazione).

TEORIA DEL RECETTORE A 2 STADI



In realtà la molecola in studio non necessariamente deve provocare una perturbazione molecolare nel recettore per modificarlo affinché esso passi da uno stato attivo ad uno inattivo (ciò avviene negli antagonisti) ma, la teoria vale soprattutto per i recettori canale, prevede che il recettore già costitutivamente esiste in equilibrio tra 2 stadi: il recettore esiste in uno stato conformazionale inattivo (R) in equilibrio con uno stato conformazionale attivo (R*).

DOMANDA: Qual è il ruolo di un agonista e di un antagonista?

RISPOSTA: Agonista e antagonista sposterebbero tale l'equilibrio, avendo l'agonista maggiore affinità per lo stato attivo del recettore, viceversa l'antagonista.

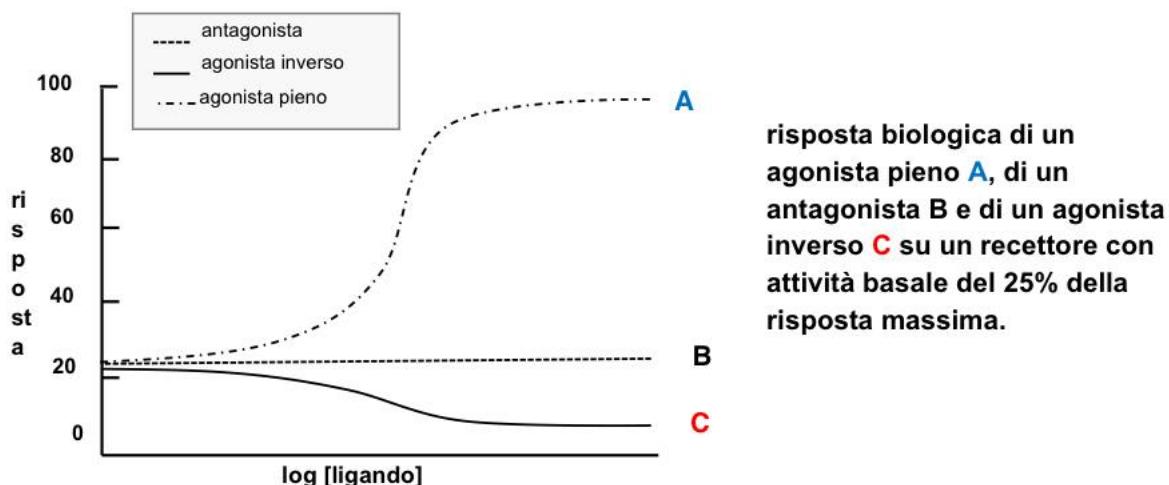
Di conseguenza la molecola non va ad attivare il recettore ma lo trova già in una conformazione a lei complementare e sposta il suo equilibrio verso una forma o l'altra.

Questo spiega perché il numero dei recettori occupati, in molti sistemi recettoriali, non è uguale al numero dei recettori attivati: la risposta biologica non sempre è proporzionale all'occupazione dei siti recettoriali, ossia l'Emax non viene raggiunta necessariamente solo quando tutti i recettori sono occupati.

AGONISTI INVERSI

In molti sistemi recettoriali si identifica un'attività costitutiva basale del recettore, ossia esso è attivo costitutivamente, in una percentuale minore dell'Emax ma con un'attività costitutiva superiore allo 0 e di conseguenza non necessariamente dell'agonista per attivarsi (ne ha bisogno solo per raggiungere Emax).

Alla luce di quanto appena affermato, una molecola potrebbe inibire tale attività costitutiva e se ciò avviene tale molecola viene definita agonista inverso: es. sistema recettoriale del GABA.



Un recettore con attività costitutiva del 25% avrebbe un'attività basale che parte dal 20% della risposta.

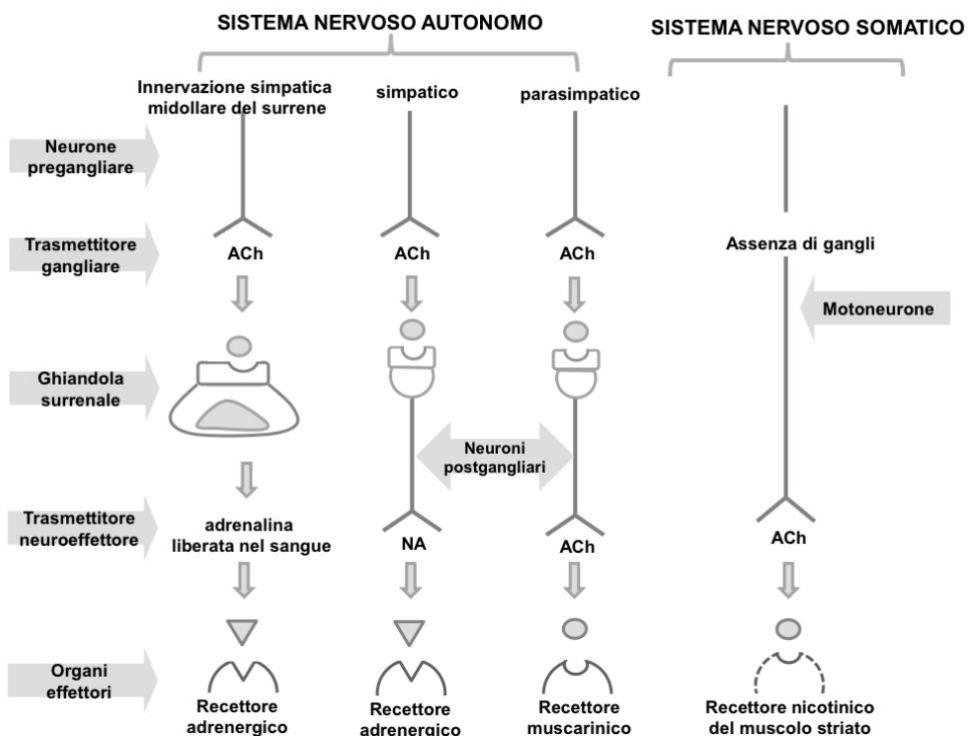
Se tale recettore viene legato da un agonista pieno, quest'ultimo fa sì che la risposta aumenti fino ad arrivare all'effetto massimo (curva dose-risposta di un agonista pieno, il quale aumenta linearmente passando dal 20% al 100% della risposta). Ma se tale recettore interagisce con una molecola che agisce come agonista inverso (curva C), elimina l'attività basale del recettore, azzerandola (es. se il recettore possiede attività basale inibitoria, questo agonista inversione sarà in parte eccitatorio).

In tal caso l'antagonista non darebbe nessun effetto sull'attività costitutiva del recettore, ma si oppone all'azione agonista dell'agonista pieno e all'azione agonista inversa dell'agonista inverso, ossia l'antagonista ripristinerebbe l'attività basale costitutiva del recettore del 25% (retta B).

Gli agonisti inversi, soprattutto per quanto riguarda i recettori del GABA, sono stati identificati anche in molecole naturali ed esercitano azione eccitatoria e pro-convulsivante.

Oltre agli agonisti pieni e inversi, si hanno anche gli agonisti parziali inversi, i quali non riducono l'attività costitutiva del recettore e alfa assume valore di -1.

LINEE DI TRASMISSIONE: SISTEMA NERVOSO AUTONOMO E SISTEMA NERVOSO SOMATICO



SISTEMA NERVOSO SOMATICO: Nel sistema nervoso somatico non ci sono gangli: il motoneurone innerva la muscolatura, si parla di giunzione neuromuscolare e a livello della stessa sono presenti recettori nicotinici muscolari. Tale fibra rilascia acetilcolina e attiva, post giunzionalmente, recettori nicotinici muscolari (si chiamano muscolari perché accanto ad essi compaiono altri che non sono muscolari).

SISTEMA NERVOSO AUTONOMO: Il sistema nervoso autonomo possiede una fibra pre-gangliare e una fibra post-gangliare. I 2 sistemi sono ortosimpatico e parasimpatico: in entrambi la fibra pregangliare è una fibra colinergica perché libera acetilcolina e va ad attivare i recettori presenti sulle fibre postgangliari che sono recettori nicotini gangliari, differenti da quelli muscolari presenti a livello della placca.

Le fibre postgangliari dei neuroni simpatici che prendono sinapsi con gli organi effettori, liberano nel terminale noradrenalina; le fibre postgangliari dei neuroni collocati nel sistema simpatico sono fibre colinergiche e a

livello degli organi effettori innervati dal sistema parasimpatico, liberano acetilcolina, la quale attiva i recettori muscarinici.

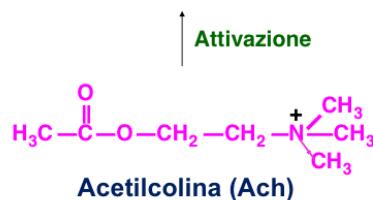
Infine compare l'innervazione da parte di fibre pregangliari della midollare del surrene, anch'esse fibre colinergiche perché rilasciano acetilcolina, che va ad attivare i recettori nicotinici presenti sulla ghiandola surrenale (la ghiandola surrenale si comporta da ganglio perché è innervata da una fibra pregangliare ma poi la ghiandola non rappresenta una fibra postgangliare: sotto lo stimolo dell'acetilcolina che interagisce con i suoi recettori nicotinici presenti sulla ghiandola surrenale, sintetizza l'adrenalina la quale è un ormone che viene liberata nel circolo ematico).

PRIMO TEMA: SISTEMA COLINERGICO

RECESSIONI COLINERGICI

Il sistema colinergico ha come neurotrasmettore l'acetilcolina.

Il Sistema Colinergico



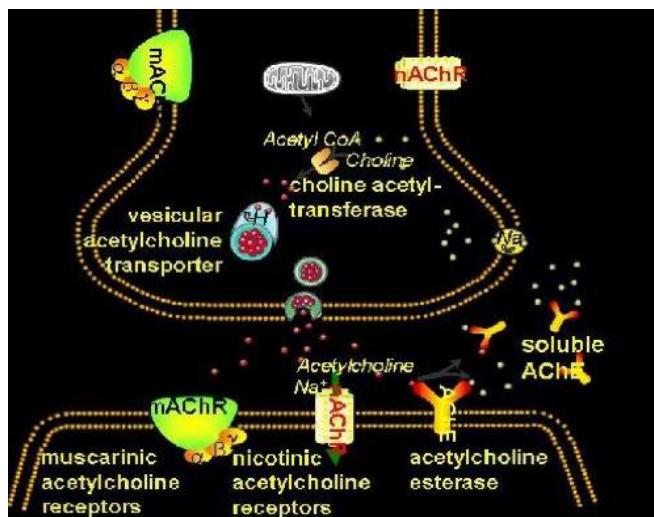
L'acetilcolina ha una testa cationica permanente, la quale vede principalmente l'azoto la carica positiva ma essa può delocalizzarsi nella nube dei metili legati ad esso e per questo motivo generalmente tale terminale viene definito testa-cationica.

Tale testa non è soggetta a variazione al variare del pH perché è una testa cationica permanente, possiede 3 gruppi metilici legati che si sommano alla catena della colina, perciò risulta evidente che per portarla ad ammina terziaria è necessario rompere un legame covalente.

L'altra parte fondamentale della molecola è il gruppo acetossilico, il quale rappresenta uno dei problemi principali dell'acetilcolina: da esso discende la sua labilità perché soggetto all'idrolisi da parte delle esterasi ematiche.

L'acetilcolina come tale non può essere utilizzata come farmaco: nel tempo sono state effettuate delle modifiche sulla molecola del neurotrasmettore per incrementare la sua stabilità affinché possa essere impiegata come farmaco.

SINAPSI COLINERGICA



L'acetilcolina viene biosintetizzata nel neurone colinergico ma la colina non si sintetizza nel neurone ma è di origine epatica: essa viene trasportata a livello neuronale, attraverso l'acetil-CoA e l'enzima colina acetiltransferasi, si verifica l'acetilazione della colina, la formazione dell'acetilcolina e l'immagazzinamento nelle vescicole sinaptiche; al momento dell'impulso nervoso la vescicola sinaptica si fonde con la membrana pre-sinaptica, evento che determina la liberazione dell'acetilcolina.

L'acetilcolina deve poi andare ad interagire con le strutture post-sinaptiche: a livello gangliare saranno i recettori nicotinici gangliari, a livello della giunzione neuromuscolare saranno i recettori nicotinici muscolari, a livello degli organi effettori saranno i recettori muscarinici.

L'acetilcolina interagisce con 2 tipi diversi di recettori: nicotinici (recettori canale) e muscarini (recettori accoppiati a proteine G), a seconda della fibra neuronale presa in esame.

Accanto a questi 2 recettori, per quanto riguarda l'attività di farmaci che agiscono a livello del sistema colinergico, occorre prendere in considerazione l'acetilcolina esterasi. Quest'ultima idrolizza l'acetilcolina, termina la sua azione a livello della fessura sinaptica e rompe il legame estereo tra la colina e l'acetile. Anche l'acetilcolina esterasi rappresenta un target biologico (per il sistema colinergico studieremo 3 classi di farmaci: 1. farmaci che agiscono sui recettori nicotinici; 2. farmaci che agiscono sui recettori muscarinici e 3. farmaci che vanno ad inibire l'acetilcolina esterasi).

Quando si inibisce un enzima che ha la funzione di idrolizzare il neurotrasmettore o comunque di modificare il neurotrasmettore affinché esso non sia più attivo, si va ad inibire un'inibizione: andando ad inibire l'acetilcolina esterasi è come se aumentassero i livelli di acetilcolina.

Tali molecole vengono definite agonisti indiretti (l'agonista è la molecola che attiva il recettore in seguito ad interazione con esso, mentre in questo caso le molecole sopra descritte non attivano il recettore interagendo con esso ma, aumentano la concentrazione del neurotrasmettore che a sua volta attiva il recettore).

La colina che si forma a carico dell'idrolisi dell'acetilcolina esterasi sull'acetilcolina, è una molecola idrofila e di conseguenza per attraversare la membrana necessita di un trasportatore, il quale provoca il re-uptake della colina, la riporta all'interno del neurone pre-sinaptico e questo fa sì che la colina venga poi acetilata ad acetilcolina ed immagazzinata.

DETTAGLIO DI COSA SUCCede A LIVELLO DEI VARI DISTRETTI PER STIMOLAZIONE DEI RECETTORI COLINERGICI

SUL MUSCOLO SCHELETICO (curiosità: il recettore nicotinico muscolare è stato il primo recettore nicotinico studiato, successivamente sono stati classificati gli altri sottotipi recettoriali).

Nel sistema volontario il ganglio è assente, si ha la diretta innervazione della muscolatura scheletrica dove sono presenti recettori nicotinici muscolari, i quali sono recettori eccitatori (una volta che l'acetilcolina ha interagito con un recettore nicotinico muscolare, si verifica l'apertura del canale, entrata di sodio, depolarizzazione ed evento di contrazione muscolare). Il catione principale è il sodio ma le dimensioni del poro canale permette anche l'ingresso del calcio.

SUGLI ORGANI EFFETTORI DEL SISTEMA NERVOSO PARASIMPATICO. I recettori muscarini sono di 5 sottotipi (M1-M5), possiedono un'attività diversa dal punto di vista di inibizione ed eccitazione, a seconda del distretto preso in esame: questo normalmente succede per il sistema simpatico e parasimpatico per bilanciare la loro attività su uno stesso organo.

In particolare, i recettori del sottotipo M2 innervano il cuore dove hanno azione inibitoria, per cui danno effetto cronotropo e inotropo negativi, il contrario succede su altri distretti.

I recettori M1 e M3 hanno un effetto stimolatorio della contrazione a livello di organi diversi, es. tratto broncopolmonare, intestinale, vescicale e ghiandolare: sono broncocostrittori, aumentano la contrazione vescicale, aumentano la motilità gastrica e intestinale ed infine incrementano la secrezione ghiandolare.

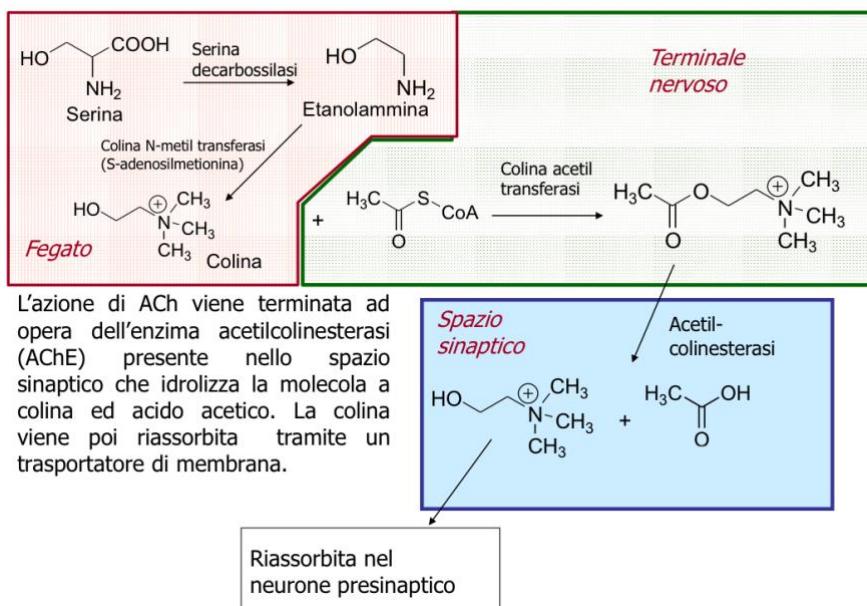
Il sistema adrenergico, sugli stessi organi, generalmente ha effetto contrario: sul cuore stimola, sui bronchi e sui visceri dilata.

SUI GANGLI DEL SISTEMA SIMPATICO E PARASIMPATICO. A livello del ganglio si hanno recettori nicotinici gangliari. Tuttavia sia il ganglio simpatico, sia il ganglio parasimpatico possiedono gli stessi tipi di recettori → problemi di selettività di uso dei farmaci che agiscono a livello di gangli dove presenti i recettori nicotinici gangliari. Farmaci che una volta venivano usati come ganglioplegici, ossia ai farmaci che agivano sui recettori nicotinici gangliari, sono stati completamente abbandonati.

MIDOLLARE DEL SURRENE. Possiede dei recettori nicotinici che vengono stimolati da una fibra pregangliare colinergica ma la stimolazione che fa seguito all'attivazione di tali recettori porta alla produzione del neurotrasmettore del sistema simpatico, definito neuromone: adrenalina.

A LIVELLO CENTRALE. Non dobbiamo dimenticare che sia i recettori nicotinici che muscarini sono presenti a livello centrale, dove presiedono principalmente ai processi cognitivi, di memoria e di apprendimento, hanno un effetto di modulazione su altri neurotrasmettitori (es. il nicotinico modula le fibre dopameriche e infatti ad oggi gli unici farmaci utilizzati nella neurodegenerazione della patologia di Alzheimer agiscono centralmente sul sistema colinergico).

BIOSINTESI DEL NEUROTRASMETTITORE

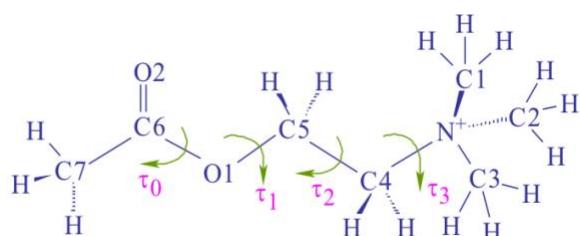


La neurotransmissione avviene per biosintesi del neurotrasmettore a livello di un preciso terminale sinaptico ma in alcuni casi vi sono dei precursori che sono sintetizzati altrove: questo è il caso dell'acetilcolina, perché la colina, ossia l'alcol da cui poi per acetilazione porta alla formazione dell'acetilcolina, parte dalla serina (amminoacido). In seguito si verifica la decarbossilazione della serina ad etanolammmina, la quale tramite la colina N-metiltransferasi si verifica il trasferimento dei metili sul gruppo amminico primario (donatore di metili è S-adenosilmethionina), si forma la colina a livello epatico.

Poi la colina attraverso un trasportatore entra all'interno della fibra colinergica e a livello del terminale nervoso colinergico, con l'aiuto della colina acetiltransferasi, si verifica il trasferimento del gruppo acetile dall'acetil-CoA sul gruppo OH della colina e si forma così l'acetilcolina.

Nello spazio sinaptico dove viene liberata l'acetilcolina, l'acetilcolina esterasi ha il compito di terminare la sua azione, idrolizzando l'acetilcolina in colina e acetato, la colina nuovamente subisce re-uptake grazie al suo trasportatore (si ha il recupero dell'acetilcolina).

CONFORMAZIONI DELL'ACh



“... i movimenti non esistono mai del tutto, sono passaggi, sono intermediari tra due esistenze, intervalli.”

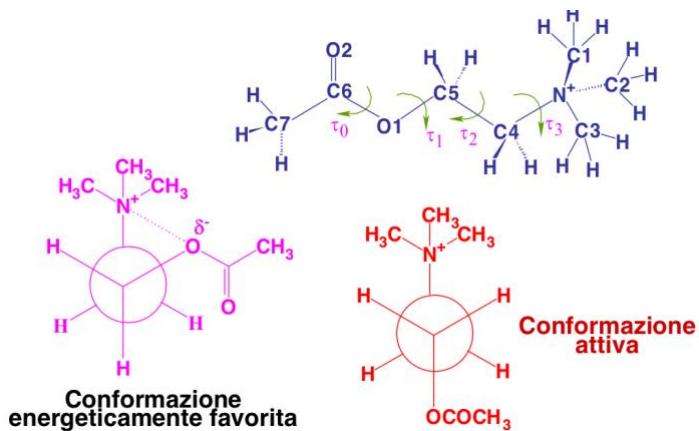
J.-P. Sartre, (La Nausea, 1938)

Una molecola flessibile come l'acetilcolina ha una grande libertà conformativa e dà origine a varie conformazioni → quale è la conformazione favorita per l'interazione con il recettore?

Sono stati fatti vari studi e uno dei metodi utilizzati è fare analoghi rigidi, congelare attraverso legami una conformazione rispetto ad un'altra e andare a vedere se le conformazioni rese rigide attivano il recettore oppure perdono l'attività.

Questo è stato fatto per la molecola dell'acetilcolina, dove la conformazione energeticamente favorita è quella sfalsata (gauce), perché si forma uno legame intramolecolare tra la carica positiva e l'ossigeno del gruppo acetossilico parzialmente carico negativamente.

Viceversa, dagli studi fatti, si è visto che la conformazione attiva a livello del recettore è la conformazione anti, dove il gruppo acetossilico e il gruppo ammonico quaternario sono collocati da parti opposte.



La conformazione attiva non sempre coincide con quella energeticamente favorita.

Questo perché l'interazione farmaco-recettore deve essere produttiva, nel senso che l'avvicinamento del ligando al recettore forma legami che determinano l'abbassamento dell'energia libera del sistema.

Prendendo singolarmente le molecole, la conformazione energeticamente favorita è quella che vede la stabilizzazione della conformazione grazie ai legami che vengono ad instaurarsi all'interno della molecola.

Tuttavia nelle vicinanze del recettore, quella che rappresenta la conformazione maggiormente favorevole per avere la complementarietà e la formazione di legami che portano ad un'interazione ottimale, potrebbe essere una conformazione diversa da quella che se presa isolatamente la molecola, costituisce la conformazione energeticamente più favorita.

Per condurre gli studi, occorre congelare la porzione centrale dell'acetilcolina, che rappresenta la parte dotata di maggiore flessibilità (catena etilenica + legame semplice tra carbonile e ossigeno).

Per avere il congelamento della struttura, la catena centrale è stata inserita all'interno di un ciclopropile: il gruppo amminico e il gruppo acetossilico, possono stare sia in cis (stessa parte) che in trans (parti opposte). Si è visto che soprattutto per il recettore M3 è favorito l'analogo rigido ciclopropilico con i 2 sostituenti da parti opposte (forma trans), la quale costituisce la forma congelata della conformazione anti.

La forma cis è più vicina alla conformazione energeticamente favorita ma a livello recettoriale quest'ultimo è meno attivo nell'attivare il recettore: da ciò si è dedotto che la conformazione attiva è quella trans.

N.B Spesso quando si realizzano analoghi rigidi emergono problemi ulteriori: la formazione di analoghi rigidi prevede l'inserimento di altri elementi nella struttura di partenza, e questi ulteriori elementi non è detto che influenzino negativamente l'interazione con il recettore (non è automatico che con l'analogo rigido, tutto sia di facile comprensione: prendendo in considerazione il sistema dopaminergico, tutti gli analoghi rigidi

funzionano come la dopamina ma per molti altri sistemi recettoriali non è stato possibile compiere studi con risultati inequivocabili perché il substrato del recettore viene ingombrato stericamente e l'inattività potrebbe essere dovuta ad altri fattori).

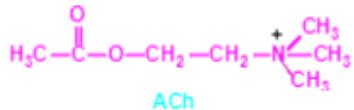
Lezione di Chimica Farmaceutica II #4 del 18/10/2023

Docente: Anna Minarini

Sbobinatore: Beatrice La Notte

Revisore: Benedetta Anichini

Caratteristiche elettroniche:



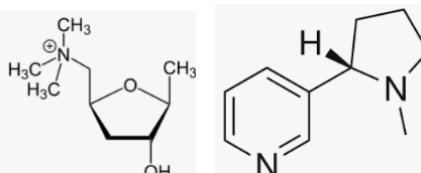
- azoto quasi neutro
- atomi di ossigeno con carica parziale negativa
e carbonio carbonilico con parziale carica positiva
- CH_3CO con una piccola carica positiva totale

La carica positiva è diffusa anche sui metili ad essa legati e costituisce la sfera di carica positiva che andrà ad interagire con la controparte recettoriale dando il legame principale con il recettore. È presente anche una catena flessibile che non può essere modificata e, dal punto di vista elettronico, un gruppo acetossilico che presenta con carbonile (carbonio legato ad un ossigeno con doppio legame e ad un ossigeno etereo). Il gruppo estero, nella somma, avendo due ossigeni che attirano su di sé gli elettroni, fanno sì che il carbonio sia parzialmente carico positivamente. Anche i due ossigeni sono fondamentali con l'interazione con il recettore, infatti non basta esclusivamente la presenza della testa ammonica quaternaria per dare l'interazione. Nel caso del recettore muscarinico la testa ammonica interagisce con l'aspartato del dominio transmembrana. In altri casi e per altri target, la testa ammonica è principalmente soggetta ad una interazione catione- π con anelli aromatici.

I recettori del sistema colinergico:

Da cosa derivano i termini nicotinico e muscarinico?

Risalgono al 1914 quando Sir Henry Dale scoprì che l'attività dell'acetilcolina era mediata da due tipi diversi di recettore: il recettore nicotinico, che aveva una affinità maggiore per un alcaloide naturale, la nicotina (immagine a destra) e il recettore muscarinico, che aveva una maggiore affinità per un alcaloide naturale presente nella amanita muscaria detto muscarina (immagine a sinistra).



Le strutture della nicotina e della muscarina sono diverse ma la muscarina, in particolare, assomiglia molto all'acetilcolina perché ne rappresenta l'analogo rigido: la catena etilica ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) è come se fosse stata congiunta con il CH_2 della catena laterale.

Inoltre entrambe le molecole presentano dei centri chirali e la chiralità è molto importante soprattutto per il recettore muscarinico in quanto più restrittivo riguardo le modificazioni che vengono fatte sull'acetilcolina, rispetto al recettore nicotinico. Anche in quest'ultimo ho un centro chirale e l'enantiomero S è un po' più attivo dell'enantiomero R (di circa 10 volte).

La nicotina è costituita da un anello metil-pirrolidinico che in posizione 2 (centro chirale) è sostituito con una piridina.

La muscarina invece è costituita da un anello tetraidrofuranico che è sostituito in posizione 2 con un metile, in posizione 3 con un ossidrile e in posizione 5 con il gruppo metiltrimetilammonico (stesso gruppo presente nell'acetilcolina).

I due alcaloidi attivano dei recettori con caratteristiche strutturali diverse: la nicotina attiva un recettore canale detto recettore nicotinico, recettore canale della classe 1 caratterizzato da 5 domini transmembrana e la muscarina attiva un recettore detto recettore muscarinico, recettore accoppiato a proteina G. Dei recettori accoppiati a proteine G, ad oggi, ne conosciamo cinque tipi.

Farmaci colinergici:

Quando si parla di molecole che agiscono su un sistema recettoriale, si deve sempre considerare la distinzione tra agonista, antagonista, agonista indiretto e, se esistono, antagonista indiretto.

Esempi di farmaci attivi sul sistema colinergico

Azione Colinergica	Meccanismo	Uso	Esempio
diretta	agonista M	antiglaucoma	Pilocarpina
		trattamento dell'atonia intestinale e della ritenzione urinaria	Betanecolo
indiretta	inibitore AChE	antiglaucoma	Fisostigmina
		trattamento della miastenia grave	Neostigmina
		trattamento del morbo d'Alzheimer	Rivastigmina

Gli AGONISTI muscarinici sono molecole utilizzate nel glaucoma questo perché i recettori muscarinici, soprattutto del tipo M1, sono presenti a livello dell'occhio dove provocano miosi che favorisce il deflusso dell'umor acqueo. Storicamente una molecola con azione muscarinica e di origine naturale è per esempio la pilocarpina.

Gli agonisti muscarinici vengono anche utilizzati per la loro attività di aumento della contrazione vescicale e gastroenterica, nell'atonia intestinale e nella ritenzione urinaria che si ha dopo interventi chirurgici, quindi per il ripristino delle funzionalità dei visceri. Una molecola precursore di tutti gli agonisti muscarinici è il betanecolo.

L'azione agonista può essere ottenuta dal sistema colinergico anche attraverso gli agonisti indiretti che, in questo caso, agiscono come inibitori dell'acetilcolina esterasi. Anche gli agonisti indiretti possono avere un utilizzo terapeutico analogo a quello degli agonisti diretti. In particolare, un altro alcaloide naturale, estratto dal physostigma velenosum, è la fisostigmina, usata per tanti anni come anti-glucoma e ora sostituita da farmaci più nuovi, ad azione muscarinica prevalentemente. È evidente che andando ad aumentare la concentrazione dell'acetilcolina, tramite la diminuzione dell'acetilcolina esterasi, si può avere anche un'azione nicotinica.

In particolare, nel trattamento della miastenia gravis (patologia auto-immune per cui si ha un deficit nella trasmissione a livello della giunzione neuromuscolare) si utilizza un agonista indiretto detto neostigmina. Nel trattamento della patologia di Alzheimer, i farmaci in terapia, tranne la memantina, sono tutti inibitori dell'acetilcolina esterasi. Questo perché nella patologia di Alzheimer si osserva, a livello centrale, un deficit della trasmissione colinergica quindi gli inibitori dell'acetilcolina esterasi che agiscono a livello centrale portano ad un aumento del livello di acetilcolina. Uno di questi farmaci usati nell'Alzheimer è la rivastigmina. Fisostigmina, neostigmina e rivastigmina terminano tutti con "stigmina", infatti gli ultimi due derivano strutturalmente dalla fisostigmina.

Esempi di farmaci attivi sul sistema colinergico

Azione Anticolinergica	Meccanismo	Uso	Esempio
diretta	<ul style="list-style-type: none"> - antagonista N gangliare - antagonista N muscolare - antagonista M 	<ul style="list-style-type: none"> - antiipertensivo - miorilassante (anestesia generale) - spasmolitico - antiulcera - midriatico, cicloplegico - antiparkinsoniano - antisecretorio - antidoto nella intossicazione da esteri fosforici 	<ul style="list-style-type: none"> Trimetafano Succinilcolina Propantelina Pirenzepina Omatropina Triesifenidile Atropina
indiretta	- riattivatore AChE	<ul style="list-style-type: none"> - antidoto nella intossicazione da esteri fosforici 	<ul style="list-style-type: none"> Atropina
			Pralidossima

Gli ANTAGONISTI sono generalmente molecole nicotiniche a livello gangliare per bloccare la trasmissione simpatica. Come già detto, l'acetilcolina si trova sia nel sistema simpatico che nel sistema parasimpatico e, bloccando i recettori nicotinici a livello gangliare, si otteneva soprattutto un'azione simpatica e quindi anti-ipertensiva. Ma se si vanno a bloccare i recettori gangliari, inevitabilmente si blocca sia il sistema simpatico che il sistema parasimpatico perché in entrambi si trovano gli stessi recettori gangliari. Tutte queste molecole, definite ganglioplegici e utilizzate come anti-ipertensivi, avevano troppi effetti collaterali perché andavano anche a bloccare la trasmissione muscarinica. Di conseguenza, ad oggi, si ha un unico farmaco che agisce come antagonista nicotinico gangliare detto trimetafano.

I nicotinici si trovano anche a livello della giunzione neuromuscolare e vengono detti antagonisti nicotinici muscolari. Essi sono ampiamente utilizzati in terapia. Nello schema sono presenti due classi con diverso meccanismo d'azione e ad azione miorilassante. Uno di questi è la succinilcolina. Gli altri vengono detti curaro simili perché assomigliano al curaro.

Il sistema colinergico va quindi ad innervare la muscolatura liscia, bronchiale, intestinale, cardiaca. Di conseguenza gli antagonisti vanno ad agire come antispasticci (quindi spasmolitici) come ad esempio nelle coliche epatiche (biliari) e nelle coliche renali diminuendo la contrazione. Inoltre aiutano anche a bloccare la contrazione muscolare negli eventi diarreici. I primi antimuscarinici più selettivi per il sistema gastroenterico sono stati usati anche come anti-ulcera. Contrariamente agli agonisti, gli antagonisti provocano nell'occhio midriasi. Quindi ad un paziente che soffre di glaucoma non si somministra mai un antimuscarinico. Questi midriatici cicloplegici sono usati per la diagnosi del fondo dell'occhio usando un antagonista muscarinico che abbia un'azione breve. Normalmente l'insorgenza dell'azione avviene dopo circa 15/20 minuti. Si usa generalmente l'omatropina, derivante dall'atropina ottenuta dall'atropa belladonna che provoca la midriasi (dilatazione) della pupilla ed era solito essere segno di bellezza nella donna.

Gli anticolinergici vengono utilizzati come farmaci nel parkinson indotto da farmaci (reversibile) quindi quando vengono utilizzati gli antipsicotici tipici. In quel caso, se insorge una sindrome parkinson simili si controlla attraverso l'utilizzo degli anticolinergici, osservando l'azione dell'acetilcolina sul motoneurone.

L'atropina è l'anticolinergico per eccellenza. È stato il primo ad essere stato studiato ed è il prototipo di tutta la classe. I suoi derivati sono utilizzati soprattutto come spasmolitici e come broncodilatatori. È inoltre il farmaco di elezione nella intossicazione da gas nervini e da organo fosforici quindi è considerato un farmaco salvavita.

Al giorno d'oggi si associa un altro antidoto, infatti vengono dati in combinazione, detto PAM (acronimo di pralidossima). È un riattivatore dell'acetilcolina esterasi. Nell'intossicazione da organo fosforici si ha il blocco dell'acetilcolina esterasi (irreversibile), quindi si deve somministrare un farmaco che spiazzi l'acetilcolina sia in giro che a livello centrale perché si hanno delle crisi convulsive che provocano un blocco respiratorio per contrazione del tratto bronco polmonare e possono portare a morte. Insieme a questa molecola che antagonizza l'acetilcolina, si deve anche somministrare un riattivatore dell'acetilcolina esterasi per riprendere l'attività di idrolisi dell'acetilcolina.

Recettori nicotinici:

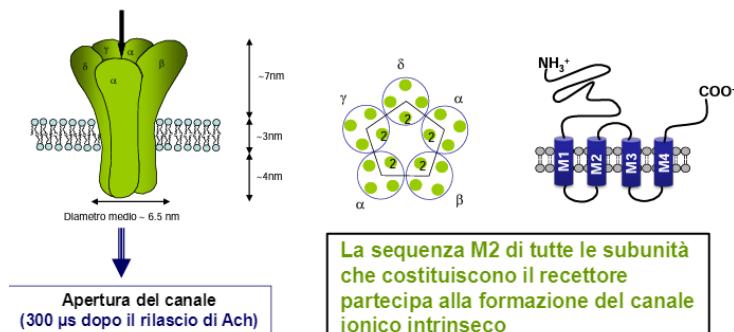
Il recettore nicotinico presenta 5 subunità.

Esso ricorda il quadro di Matisse - “la danza” oppure ancora la forma di un peperone ma questo dipende da quanto è abbondante la parte extracellulare rispetto alla parte intracellulare del recettore. Chiaramente le danzatrici hanno un significato e cioè che la danza avviene in cerchio esattamente come tutte e cinque le subunità si devono muovere insieme per dare origine all’apertura e chiusura del canale quindi al suo funzionamento.

Il canale nicotinico presenta una porzione extracellulare più abbondante di amminoacidi perché sia la porzione N-terminale che C-terminale di tutte le subunità è extracellulare. Mentre nella porzione intracellulare si hanno solo dei piccoli loop meno caratterizzati da catene amminoacidiche. In seguito sono presenti le misure che riguardano il recettore nicotinico muscolare, il recettore più studiato. Il fatto che sia un recettore muscolare si capisce dalle subunità che lo compongono: definite α , β , γ , δ . Nel recettore nicotinico la stichiometria è di 2 subunità α , 1 β , 1 γ e 1 δ .

Affinché un recettore nicotinico funzioni e sia attivato dall’acetilcolina, deve avere almeno due subunità α . Quelle del recettore nicotinico muscolare, siccome è stato il primo ad essere stato caratterizzato, si chiamano $\alpha 1$ e $\beta 1$. Successivamente vennero riclassificate altre subunità α e altre subunità β che sono quelle che caratterizzano il recettore nicotinico gangliare e i recettori nicotinici centrali dove non si hanno le subunità γ e δ , ma solo α e β . Sono quindi recettori di tipo diverso, non solo per localizzazione ma anche per caratteristiche. Tutti i recettori nicotinici sono formati da 5 subunità e ogni subunità è costituita da 4 domini transmembrana. Per cui, prendendo e srotolando ognuna di queste subunità, si osserveranno i 4 domini transmembrana definiti M1-M2-M3-M4, con una abbondante porzione N-terminale e con un gruppo C-terminale (entrambi extracellulari). I domini si dispongono con una forma a cilindro e in maniera tale da porgere il dominio transmembrana M2 verso il poro canale. Il poro canale è quindi costituito da tutti gli M2 delle 5 subunità. Le caratteristiche che deve avere M2 riguardano la permeabilità agli ioni Na^+ . Infatti una volta che l’acetilcolina si è legata alle subunità α (dove risiede il sito attivo), il canale si apre, entra sodio e si ha una depolarizzazione molto veloce perché l’apertura del canale permette una attivazione in 300 microsecondi dopo il rilascio di acetilcolina. Chiaramente in un recettore accoppiato a proteina G, l’attivazione è più lunga perché c’è il trasferimento di altre molecole come il secondo messaggero, quindi risulta più lenta. Con la depolarizzazione, dovuta all’entrata del sodio nel canale, si ha un evento eccitatorio. Siccome deve entrare del sodio, devono esistere degli amminoacidi sul cilindro M2 di ogni subunità ed essi si devono trovare in forma anionica a pH fisiologico, ovvero aspartato e glutammato. Infatti il Na^+ tramite successivi legami elettrostatici viene pompato dall’esterno all’interno e il segnale passa da extracellulare all’attivazione di tutta la cascata intracellulare. È quindi necessario avere nel canale amminoacidi che facilitino la discesa del catione dall’esterno all’interno. Viceversa, con anioni che devono permeare il canale come il recettore del GABA (entra Cl^-), la subunità M2 è formata da amminoacidi carichi positivamente.

Un’altra caratteristica che hanno i recettori nicotinici, appartenenti alla classe 1, è il Cys-loop. Nel caso specifico, sono 13 amminoacidi nella porzione extracellulare, delimitati da due cisteine che, avendo due gruppi SH-, formano un ponte disolfuro in modo da formare un loop.



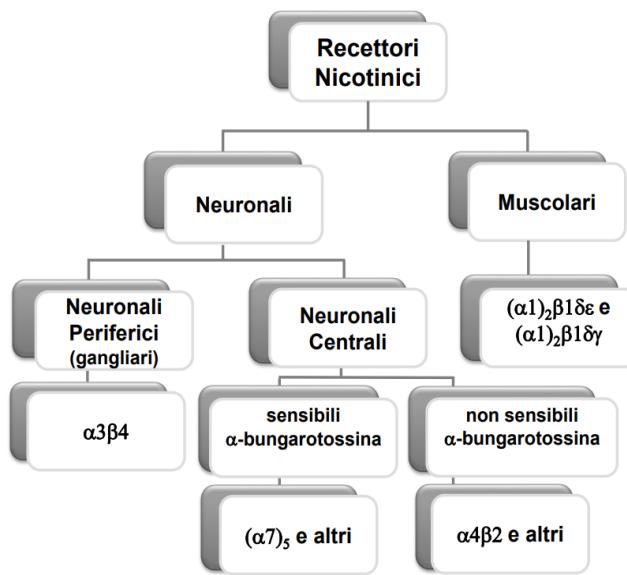
RECETTORI NICOTINICI

Recettori ionotropi

Il recettore nicotinico appartiene ai recettori ionotropi di **classe I** che sono dei pentameri con la porzione amminica e carbossilica extracellulare, le 5 subunità che compongono i recettori di questa classe sono diverse tra loro salvo eccezioni come il recettore $\alpha 7$, questi recettori sono inoltre caratterizzati dalla presenza di un cys-loop e da 4 domini trans-membrana per ognuna delle 5 subunità; ai recettori di classe I appartengono oltre al recettore nicotinico anche il recettore del GABA, della glicina e il recettore 5HT3 della serotonina. Tra i recettori canale mediati da ligando oltre a quelli di classe I ci sono anche quelli di **classe II** costituiti da 4 subunità che hanno terminale amminico extracellulare e terminale carbossilico intracellulare ognuna delle 4 subunità è composta da 4 domini trans-membrana, il secondo dominio trans-membrana (M2) è importante per il poro canale ed ha una particolare conformazione a “forcina” all’interno della membrana; un esempio di questi recettori è il recettore dell’N-metil D-aspartato (NMDA) permeabile agli ioni calcio quindi eccitatorio, viene attivato dal glutammato ed è regolato dallo ione magnesio, questo recettore è importante perché uno dei farmaci usati per l’Alzheimer è un’antagonista non competitivo di questo recettore. Infine, ci sono i recettori di **classe III** a cui appartengono i recettori purinergici con cui interagiscono ADP e ATP, i recettori di questa classe sono formati da 3 subunità ognuna delle quali è costituita da 2 domini trans-membrana, le subunità hanno una estesa porzione extracellulare che rappresenta il loop che collega i domini M1 e M2 e sia il terminale amminico sia il carbossilico sono intracellulari. Oltre ai recettori canale operati da ligando ci sono i recettori accoppiati a proteina G con 7 domini trans-membrana che hanno terminale amminico extracellulare e carbossilico intracellulare, ci sono infine i recettori ad attività tirosin-chinasica che di norma dimerizzano una volta attivi e hanno il terminale amminico extracellulare e quello carbossilico intracellulare.

Classificazione dei recettori nicotinici

Inizialmente si conosceva solo il recettore nicotinico muscolare quindi le sue subunità α e β hanno preso il numero 1, successivamente si sono scoperte nuove tipologie di recettori nicotinici e si è proceduto alla loro classificazione. I recettori nicotinici si dividono in recettori nicotinici **muscolari** e **neuronali** questi ultimi si suddividono poi in **neuronali periferici** (gangliari) e **neuronali centrali**. I recettori nicotinici muscolari sono pentameri: $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\gamma$ e nella fase embrionale $(\alpha 1)_2\beta 1\delta\epsilon$, sono i recettori della giunzione neuromuscolare. I recettori nicotinici neuronali gangliari sono invece rappresentati principalmente da subunità $\alpha 3\beta 4$ con stechiometria $(\alpha 3)_2(\beta 4)_3$, hanno una stechiometria diversa rispetto ai muscolari e grazie a ciò si possono avere ligandi selettivi per i recettori gangliari e per i muscolari; in ogni caso tutti i recettori nicotinici devono avere almeno due subunità α per far sì che due molecole di acetilcolina possano interagirvi per dare l’attività biologica. I recettori neuronali centrali sono stati classificati



sulla base della sensibilità o meno per la α -bungarotossina, che è in grado di bloccare il recettore canale, il sottotipo ($\alpha 7$)₅ è sensibile alla tossina e sembra essere coinvolto in patologie cognitive, mentre il sottotipo $\alpha 4\beta 2$ maggiormente rappresentato a livello centrale non è sensibile alla tossina, ha stochiometria ($\alpha 4$)₂($\beta 2$)₃ e regola l'analgesia (senza coinvolgere i recettori oppioidi), la memoria, l'apprendimento e la dipendenza da nicotina essendo un eterocettore delle fibre dopaminergiche.

I diversi sottotipi neuronali del recettore nicotinico sono coinvolti in numerose vie a livello del SNC e presiedono funzioni sia fisiologiche che patologiche, perciò sono molto studiati al fine di sviluppare farmaci come farmaci per la malattia di Alzheimer oltre che analgesici e farmaci per la disassuefazione da fumo, in quest'ultimo caso è coinvolto il sistema mesolimbico, sistema che si estende dall'area ventrale tegmentale al nucleus accumbens e che è fondamentale per il meccanismo di rinforzo positivo delle droghe d'abuso.

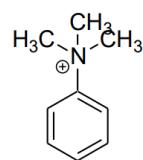
Sono stati quindi raccolti i potenziali usi terapeutici degli agonisti nicotinici:

- Demenza senile in particolare la malattia di Alzheimer;
- Malattia di Parkinson;
- Stati di ansia e depressione;
- Schizofrenia;
- Analgesia: effetto scoperto grazie all'epibatidina analogo rigido della nicotina molto potente ($EC_{50} \sim 10^{-9}$), ma non utilizzato a causa dei suoi effetti tossici poiché agisce anche sui recettori periferici
- Disassuefazione da fumo: viene usata la vareniclina agonista parziale dei recettori $\alpha 4\beta 2$ centrali
- Miastenia grave;

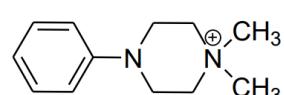
Quest'ultima è una patologia autoimmune che comporta un'anomala neurotrasmissione a livello della giunzione neuromuscolare e per cui in realtà i farmaci che esistono non sono agonisti diretti, ma sono inibitori dell'acetilcolina esterasi, quindi agonisti indiretti.

Agonisti e antagonisti nicotinici

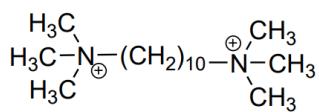
La prima distinzione nella classificazione dei recettori nicotinici è stata tra recettori nicotinici gangliari e muscolari, a rendere possibile questa distinzione sono stati i ligandi selettivi per l'uno e per l'altro recettore, la selettività si è potuta ottenere grazie alle differenze strutturali dei due recettori.



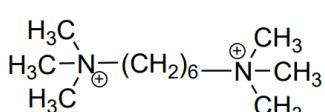
PTMA (feniltrimetil-ammonio):
agonista del recettore di placca



DMPP (dimetilfenil-piperazinio):
agonista del recettore gangliare



Decametonio: antagonista
del recettore di placca



Esametonio: antagonista del
recettore gangliare

Nella trattazione del capitolo verranno approfonditi principalmente gli antagonisti del recettore nicotinico muscolare ovvero farmaci miorilassanti e gli antagonisti del recettore nicotinico gangliare che hanno più un interesse storico. Una caratteristica degli antagonisti ad entrambi i recettori è che sono molecole semplici simili all'acetilcolina, infatti si tratta di molecole simmetriche con due teste cationiche poste a distanze differenti: negli antagonisti al recettore nicotinico muscolare la distanza è di 10 Å (circa 10 metileni: decametonio), mentre negli antagonisti del recettore nicotinico gangliare la distanza è di 5/6 Å (circa 6 metileni: esametonio); in realtà non è solo la lunghezza del linker a differenziare i due antagonisti, ma anche il meccanismo d'azione: gli

antagonisti del recettore di placca correlati al decametonio sono antagonisti non competitivi, invece gli antagonisti gangliari correlati all'esametonio sono antagonisti competitivi.

Malattia di Alzheimer

La malattia di Alzheimer ha un'origine multifattoriale, gli elementi patologici principali sono: l'aggregazione della proteina β -amiloide che da origine alla formazione di placche amiloide e la proteina tau iperfosforilata che provoca la formazione di grovigli neurofibrillari. Il sistema colinergico è coinvolto poiché le placche amiloide e i grovigli neurofibrillari inficiano la trasmissione colinergica a livello della corteccia che di norma presiede le funzioni cognitive (come memoria e apprendimento); questa è detta ipotesi colinergica della patologia di Alzheimer, di fatti oggi i farmaci in uso oggi per questa patologia aumentano la concentrazione di acetilcolina a livello centrale (inibitori dell'acetilcolina esterasi) e sono rivastigmina, donepezil, galantamina, inoltre è usato un'antagonista non competitivo del recettore del glutammato, si tratta comunque di farmaci palliativi che riducono la progressione della malattia, ma non la curano. Recentemente sono stati scoperti anche due anticorpi monoclonali diretti contro la proteina amiloide, si è visto che sono in grado di bloccare la deposizione di β -amiloide, ma non si è osservato nei pazienti il miglioramento sperato, questi anticorpi sono stati approvati dalla FDA, ma l'EMA li ha bloccati quindi in Europa non sono utilizzati.

Ipotesi colinergica

A livello della corteccia nella neurotrasmissione di un neurone colinergico si hanno recettori post-sinaptici sia muscarinici del sottotipo M₁ e in misura minore M₃, sia nicotinici del sottotipo $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$; sono presenti anche recettori presinaptici (autocettori), in particolare il recettore nicotinico presinaptico se stimolato ha un effetto di modulazione positiva sul rilascio di acetilcolina, crea così un loop positivo; quindi un agonista nicotinico sarebbe positivo sia per la sua azione post sinaptica di aumento della trasmissione sia per la sua azione presinaptica sul rilascio di ulteriore acetilcolina. Per i recettori muscarinici la situazione è diversa, infatti gli M₁ postsinaptici quando interagiscono con l'acetilcolina sono stimolati e quindi danno origine ad una trasmissione positiva, ma se l'agonista non è selettivo per gli M₁ può andare ad interagire anche con i recettori muscarinici presinaptici M₂ che hanno un effetto inibitorio sul rilascio di acetilcolina, quindi in questo caso la molecola ideale per avere azione agonista dovrebbe essere un'agonista M₁ e un antagonista M₂; la selettività per M₁/M₂ è difficile però da ottenere poiché i recettori muscarinici hanno un'elevata omologia strutturale.

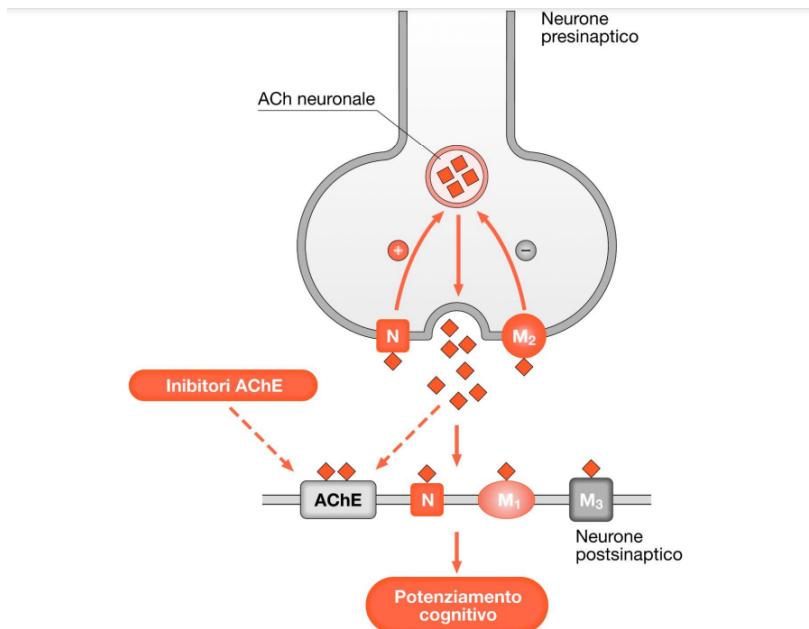


Figura 15.2 Meccanismi d'azione del neurotrasmettore acetilcolina (ACh) nelle sinapsi colinergiche.

Recettori canale

I recettori canale esistono in 3 stati:

- Stato chiuso**, ma attivabile dal ligando;
- Stato aperto** quando due molecole di acetilcolina interagiscono con il recettore e ne permettono una modificazione conformazionale che porta all'apertura del poro canale
- Stato desensitizzato o refrattario** quando il recettore è in stato aperto e si ha una continua stimolazione, in questo stato anche se la stimolazione continua il recettore non risponde, questo è un sistema di difesa nei confronti di un'attività che potrebbe essere tossica; da questo stato poi il recettore torna allo stato chiuso, ma attivabile.

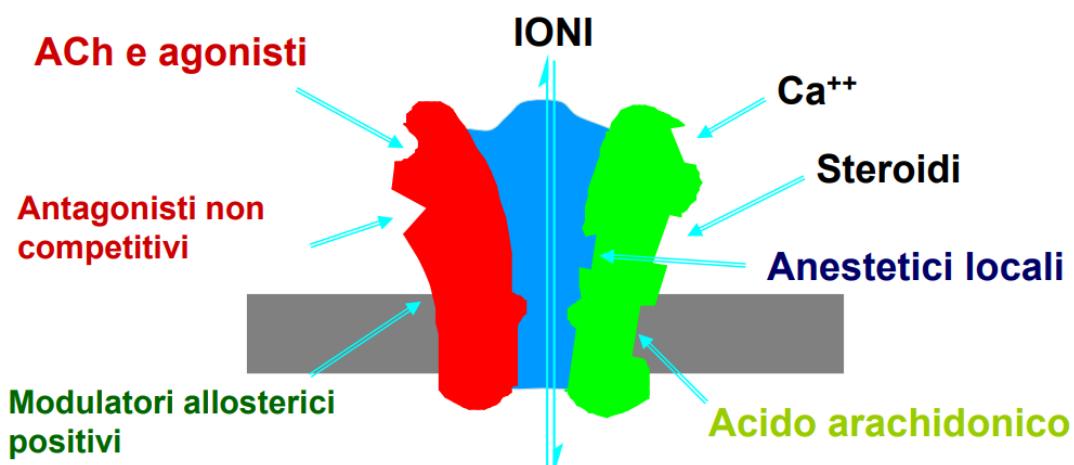
Nel caso del recettore nicotinico l'apertura del poro canale causa l'ingresso di sodio e calcio in minor misura, si ha quindi una depolarizzazione della membrana postsinaptica che porta a un evento di contrazione.

La regolazione di un recettore canale può avvenire anche attraverso un sito allosterico ovvero un sito del recettore diverso dal sito ortosterico, ma strettamente interconnesso con esso; quindi, il legame di un modulatore allosterico al suo sito può provocare due differenti situazioni:

- Nel caso di un **modulatore allosterico positivo (allosterismo positivo)** si ha una modifica-
- zione conformazionale del recettore tale per cui il ligando agonista ha una **maggior** affinità per il sito ortosterico, si parla quindi di agonisti allosterici;
- Nel caso di un **modulatore allosterico negativo (allosterismo negativo)** si ha una modifica-
- zione conformazionale del recettore tale per cui il legame dell'agonista con il sito ortosterico è impedito, si parla quindi di antagonisti allosterici;

In generale l'agonismo allosterico svolge un ruolo importante perché, quando ho una classe di recettore come i muscarinici che hanno un'elevata omologia strutturale è difficile avere agonisti selettivi poiché tutti i siti ortosterici sono simili; si è visto invece che i siti di modulazione allosterica hanno caratteristiche diverse tra loro; quindi, trovare un agonista allosterico positivo e **selettivo** per uno dei sottotipi dei recettori muscarinici è possibile.

Come gli altri recettori canale anche i nicotinici sono caratterizzati dal sito per l'acetilcolina e gli agonisti, ma anche da numerosi altri siti di regolazione allosterica positiva e negativa.



In particolare, si ha un sito di modulazione allosterica positiva per il calcio a livello extracellulare, sono presenti inoltre anche siti di regolazione a livello del poro canale, sono siti che legano antagonisti non competitivi e per poter essere raggiunti dal loro ligando necessitano del recettore in conformazione aperta. Anche gli anestetici locali bloccano il canale nicotinico a questo livello. Ci sono poi dei siti di modulazione negativa i cui ligandi sono molecole lipofile come l'acido arachidonico, perciò, si trovano nella porzione transmembrana del recettore. Il recettore nicotinico ha anche un sito di modulazione negativa a carico di steroidi.

Agonisti nicotinici

Inizialmente si pensava che il recettore nicotinico per interagire con la testa cationica dell'acetilcolina dovesse avere un gruppo aspartato, in realtà tramite cristallizzazione si è visto che la testa cationica dell'acetilcolina interagisce con un cluster di aminoacidi aromatici tramite legami π -catione. I primi studi fatti sul sito ortosterico dell'acetilcolina nel recettore nicotinico hanno evidenziato la subunità α come quella in cui risiedono i siti ortosterici (si hanno due subunità α che legano due molecole di acetilcolina), in particolare erano stati identificati residui tirosinici vicino alle cisteine 192 e 193 come responsabili del legame; approfondendo questo aspetto nel recettore nicotinico muscolare si è visto che un'acetilcolina si lega all'interfaccia tra α e γ e l'altra all'interfaccia tra α e δ . Più di recente è stata purificata una proteina detta acetylcholine binding protein da alcuni molluschi, si tratta di una proteina omomomerica ovvero formata da 5 subunità uguali ed è somigliante al recettore nicotinico $\alpha 7$; è stata cristallizzata con diversi agonisti nicotinici e si è quindi potuto osservare che la testa cationica dell'acetilcolina intrattiene legami π -catione con una serie di tirosine (190,193,198) e anche con l'anello indolico di un triptofano confermando che l'interazione acetilcolina-recettore nicotinico è stabilizzata da un gruppo di aminoacidi aromatici del sito attivo.

Lezione di Farmaceutica II #5 del 19/10/2023

Docente: Anna Minarini

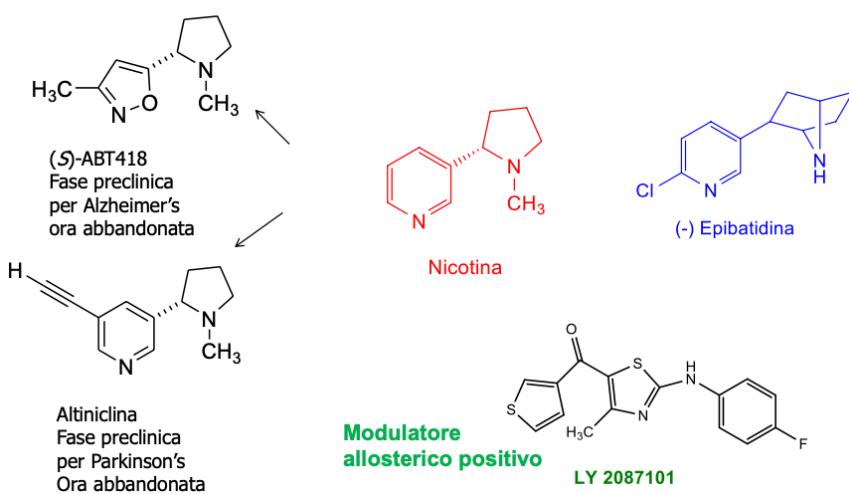
Sbobinatore: Alida Giandomenico

Revisore: Chiara Laghi

Agonisti nicotinici

SAR: Nicotina e analoghi

Agonisti Nicotinici (SAR: nicotina e analoghi)



Negli ultimi anni si sono scoperti nuovi ligandi soprattutto per i recettori nicotinici centrali, al momento non ci sono stati grandi successi. In foto vi sono rappresentate delle molecole che sono state in studio per molti anni per trattare la patologia di Alzheimer, morbo di Parkinson. Questa prevede una modifica nella struttura della nicotina che solitamente è associata ad effetti negativi, soprattutto sul sistema cardiovascolare. La nicotina è anche uno stimolante, aumenta le capacità cognitive ed è gradevole per i fumatori, è difficile

abbandonare il fumo perché le sensazioni medicate dalla dopamina sono positive. La nicotina è una metilpirrolidina a cui è legata una piridina in posizione 2' dell'anello pirrolidinico, ha un' enantioselettività e un centro chirale in 2', l'enantioselettività è limitata in quanto l'enantiomero S è poco più attivo dell'R, da essa sono state derivate delle molecole andando a modificare l'anello piridinico e ad inserire gruppi bioisosterici tipo metilossazoli e analoghi o andando ad inserire un gruppo alchilico nell'anello piridinico.

Per ottenere attività più selettive nei confronti del recettore nicotinico neuronale, le molecole non hanno raggiunto la fase clinica perché hanno effetti collaterali periferici analoghi a quelli della nicotina. Sono stati cercati modulatori allosterici positivi, soprattutto per il recettore alfa4 beta2 che è maggiormente coinvolto nei processi cognitivi, l'amminotiazolo opportunamente sostituito ha dato buoni risultati nei confronti della modulazione allosterica dei recettori nicotinici neuronali alfa 4 beta 2.

L'**epibatidina** è stata estratta dalle pelli di una rana di colore verde chiamata Epipedobates anthonyi da qui il nome epibatidina. Questa è un agonista estremamente potente del recettore nicotinico nell'ordine dei 10^{-9} - 10^{-10} , ha potentissimo effetto analgesico, il meccanismo dell'effetto non è stato chiarito ma sicuramente non è mediato dai recettori opioidi. Negli studi di binding si è visto che è un potente ligando dei recettori alfa4 beta2, ma ha attività anche sui recettori nicotinici muscolari, per questo è estremamente tossica.

L'entantiomero attivo è levogiro, rappresenta l'analogo rigido della norisonicotina, l'anello ha una parte pirrolidinica uguale alla pirrolidina della nicotina. L'anello piridinico nella metilpirrolidina è legato in posizione 2', qui l'anello è legato in 3, si chiama isonicotina. Norisonicotina perché l'epibatidina manca del metile, è l'analogo rigido della norisonicotina, questo cambia le distanze.

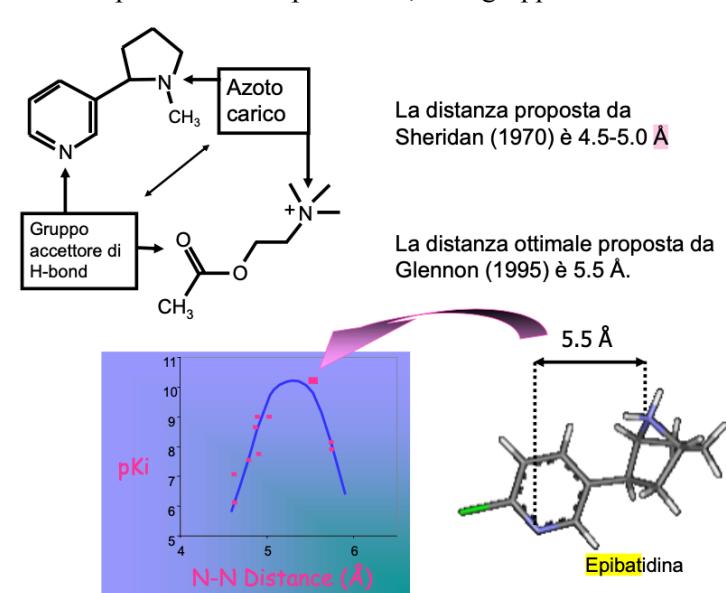
L'azoto protonabile a pH fisiologico è più distante dall'anello piridinico rispetto alla nicotina. Nei primi studi sulla nicotina, l'azione si è paragonata alla struttura dell'acetilcolina perché agiscono sullo stesso sito, devono avere dei siti di interazione analoghi. In particolare i due siti: per l'azoto della pirrolidina è quello che si protona a pH fisiologico e funge da azoto carico positivamente come la testa cationica dell'acetilcolina, questo è l'attacco primario di ancoraggio, nel caso del recettore nicotinico è un cluster di amminoacidi aromatici. Il resto della molecola è rappresentato dal gruppo carbonilico accettore di legami ad H, come lo è l'azoto piridinico.

Nel 1970 è stato fatto il primo modello farmacoforico dell'interazione dell'acetilcolina in paragone alla nicotina per il recettore nicotinico, si era definita come distanza tra centro carico che dà legami eletrostatici catione-pi greco e il gruppo accettore di legami ad H 4.5-5 Å.

Con la potenza dell'epibatidina, un gruppo americano del professor Glennon ha rivisto il modello

farmacoforico in quanto la distanza dell'azoto dell'epibatidina è maggiore rispetto al gruppo accettore di legami ad idrogeno che è l'azoto dell'anello piridinico ed è di 5.5° Å.

Lo studio è avvenuto mediante studi di binding con il recettore nicotinico di una serie di derivati della nicotina e della norisonicotina compresa l'epibatidina. Si è andato a vedere, in funzione della distanza tra i 2 azoti ovvero il centro di protonazione carico positivamente e il centro accettore di legami ad idrogeno, come andava l'andamento della costante di inibizione. Nel binding si misura una Ki per lo spiazzamento del radio ligando.

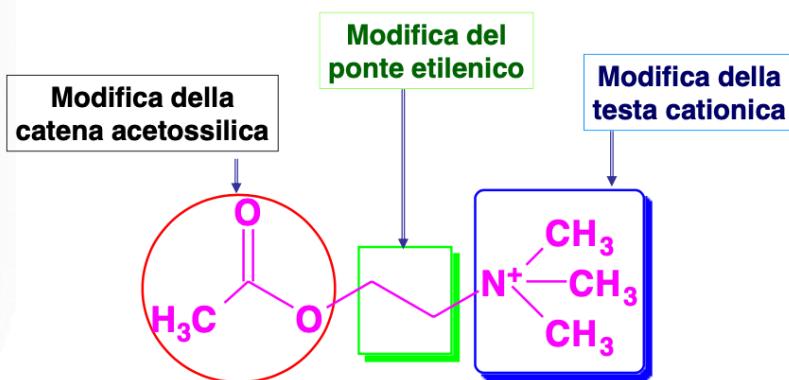


Nel grafico a campana, in questa zona c'è nicotina e norisonicotina, man mano che la distanza aumenta fino ad arrivare ad una distanza di 5.5 Å si ha un deciso aumento della pKi ovvero l'affinità, il Ki è 10. In realtà l'ottimale distanza per il modello farmacoforico dell'attività sul recettore nicotinico è rappresentata da una distanza di 5.5 tra i due centri di interazione. La scoperta di ligandi potenti aiuta alla caratterizzazione e alla definizione fine del modello farmacoforico.

Agonisti nicotinici SAR

ACh e analoghi

Agonisti Nicotinici (SAR: ACh e analoghi)



doppietto elettronico dell'azoto, una conseguenza è che la molecola ha una durata d'azione maggiore. Nell'interazione con il recettore nicotinico e muscarinico non cambia niente, il carbacolo ha la stessa reattività dell'acetilcolina ma è più stabile, è sia agonista nicotinico e muscarinico. Il recettore muscarinico è molto meno permissivo del nicotinico e se si mantiene solo il carbonile e si elimina l'ossigeno l'attività nicotinica rimane, ma si perde la muscarinica; eliminando il carbonile e lasciando l'ossigeno etero l'attività nicotinica resta anche se in modo interiore, la muscarinica no.

Ponte etilenico, è il punto flessibile della molecole, può essere ramificata. Quando si inserisce un metile in posizione alfa rispetto all'atomo di azoto si mantiene l'agonismo nicotinico ma si perde il muscarinico, la sostituzione è deleterio per il muscarinico. Se si inserisce un metile in quella posizione c'è un centro chirale che non è importante per il nicotinico R e S hanno stessa attività. Quando si inserisce un metile in beta rispetto all'atomo di azoto si ottiene una selettività per il recettore muscarinico, ovvero si perde l'affinità per il nicotinico e si aumenta leggermente quella per il muscarinico; la stereochimica è importante e deve essere S, la molecola che ne deriva si chiama metacolina che è un agonista del recettore muscarinico.

La contemporanea sostituzione del CH_3 con NH_2 (carbacolo) e la sostituzione del metile in posizione beta rispetto all'atomo di azoto dà origine al betanecolo, un farmaco agonista muscarinico, maggiore stabilità e selettività per il recettore muscarinico. Con il carbacolo si è solo aumentata la stabilità senza avere selettività, il carbacolo è attivo per il nicotinico e il muscarinico, andando ad inserire il metile in beta con configurazione S si ottiene il betanecolo agonista muscarinico e non nicotinico.

La testa cationica, per quanto riguarda l'attività agonista, si devono mantenere piccoli sostituenti come i metili. Se aumentano le dimensioni della testa cationica con, ad esempio, degli etili è deleterio sia per il nicotinico che muscarinico. Anche se si modifica la testa cationica con il sale di solfonio (diemtilsolfonio) si perde attività perché non basta solo al carica positiva, ma dipende anche dalle dimensioni della testa cationica e lo zolfo è grande.

Antagonisti parziali nicotinici

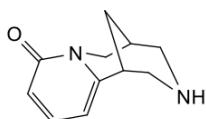
L'unica molecola usata come antagonista parziale è la nei confronti del recettore $\alpha 4\beta 2$, è la varenicilina è un antagonista parziale e l'attività intrinseca è tra 0.4 e 0.6. La varenicilina è una molecola di sintesi usata nella disassuefazione da fumo, l'altra molecola è il bupropione che agisce su un sistema recettoriale diverso, la varenicilina è un antagonista degli alfa4 beta2 centrali localizzati presinapticamente a livello delle fibre dopaminergiche nell'area mesolimbica.

Come è stata modificata la molecola dell'acetilcolina per ottenere migliori agonisti nicotinici, la catena acetossilica è un punto labile, è il motivo per cui non si può usare come farmaco l'acetilcolina. Come modifica è stata trasformato il gruppo estero in carbammato, il carbacolo è un farmaco ottenuto per modificazione del gruppo CH_3 in NH_2 , sostituzione bioisosterica che trasforma gruppo acetossilico in carbammato. Il vantaggio è avere un'idrolisi molto più lenta perché il carbonio carbonilico è meno elettropositivo per delocalizzazione del

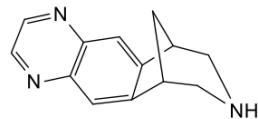
La ciclisina è quasi un agonista pieno, è un alcaloide naturale che aveva un effetto positivo nei confronti del rilascio di dopamina a livello dell'area mesolimbica. Sono state fatte modificazioni strutturali per mantenere l'aza biciclo fondamentale con l'atomo di idrogeno protonabile a pH fisiologico e fondamentale per l'interazione con gli $\alpha 4\beta 2$. La porzione aromatica è stata maggiormente ingombrata (la molecola è lipofila e attraversa la barriera ematoencefalica come desiderato) e l'azobicilo è stato sostituito con la benzopirazina. La stimolazione da parte della nicotina dei recettori nicotinici neuronali $\alpha 4\beta 2$ localizzate presinapticamente a livello dendritico sulle fibre dopaminergiche, aumenta il rilascio di dopamina nel nucleo accumbens, il rilascio si ha anche con le droghe d'abuso in modo più evidente ed è alla base del meccanismo di rinforzo positivo delle droghe, alla base dell'assuefazione e dipendenza dalle droghe.

Agonisti Parziali Nicotinici

Agonisti parziali selettivi ($\alpha = 0.6-0.4$) ad alta affinità del recettore $\alpha 4\beta 2$ sono efficaci nella terapia della disassuefazione dal fumo, confermando così il ruolo centrale di questo recettore nella dipendenza da nicotina



Citaline (naturale)



Varenicline (sintesi)

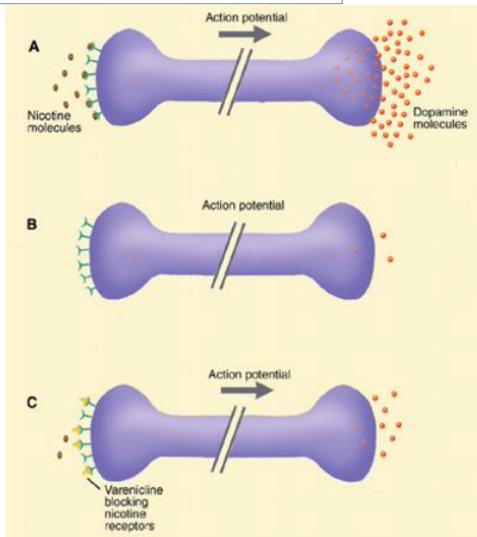
L'attivazione dei nAChR centrali aumenta il rilascio di dopamina nel nucleus accumbens dell'area mesolimbica dando così il senso di appagamento tipico delle sostanze da abuso

Agonisti parziali nicotinici

Meccanismo vereniclina

La nicotina è un agonista pieno e quando agisce sui recettori $\alpha 4\beta 2$ presinaptici, se i recettori sono su una fibra dopaminergica si chiamano eterocettori perché sono dei recettori stimolati da un ligando ovvero un neurotrasmettore, diverso da quello rilasciato dalla fibra dove sono presenti ovvero il neurone dopaminergico. Gli eterocettori $\alpha 4\beta 2$ se stimolati dalla dopamina danno origine ad un rilascio della dopamina che dà assuefazione alla nicotina. Quando i recettori non sono stimolati la dopamina non viene rilasciata. Quando i recettori legano la varenicline, che è un agonista parziale, spiazza la nicotina e quando il neurone è stimolato dall'azione della varenicline sui recettori nicotinici $\alpha 4\beta 2$ non raggiunge il massimo di

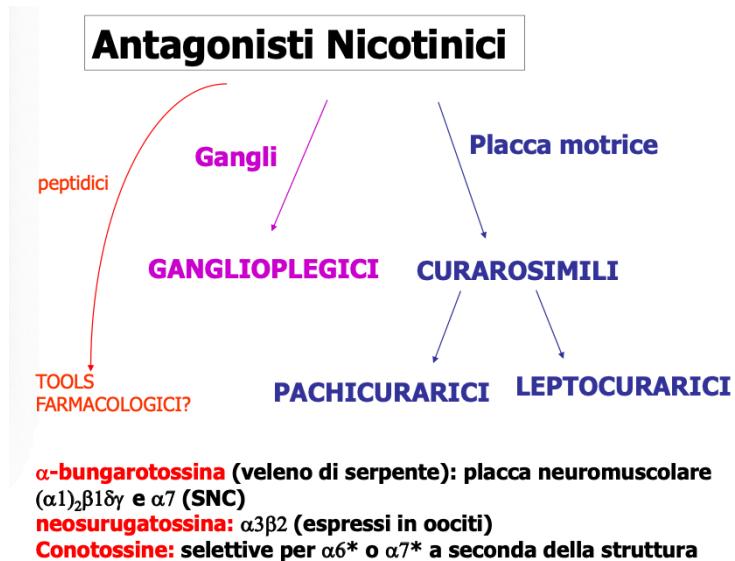
Agonisti Parziali Nicotinici Meccanismo Vareniclina



stimolazione perché è un agonista parziale e libera meno dopamina rispetto alla nicotina. Per avere l'effetto di disassuefazione c'è un regime terapeutico che prevede l'utilizzo del farmaco per settimane, si vuole evitare la crisi di astinenza, si parte da dosi iniziali sostenute e mano a mano nei giorni va a scalare la concentrazione quotidiana portando ad una notevole diminuzione nella liberazione di dopamina fino a raggiungere l'effetto

desiderato. Se si usasse l'antagonista si avrebbe improvvisamente un effetto forte sul paziente, con la varenicrina i risultati sono stati buoni perché il farmaco è un agonista parziale in questo caso è una aspetto positivo.

Antagonisti nicotinici



Per la localizzazione diversa del recettore nicotinico a livello gangliare e muscolare si dividono in ganglioplegici che antagonizzano l'effetto dell'acetilcolina a livello dei gangli e curarosimili che agiscono come antagonisti della placca neuromuscolare. I due recettori hanno caratteristiche diverse e sono state ottenute molecole selettive per l'uno e per l'altro.

I ganglioplegici hanno un interesse storico e inizialmente erano usati come antipertensivi, si bloccano i recettori a livello del ganglio in modo che la trasmissione simpatica non proceda fino ai vasi. In realtà le molecole hanno molti

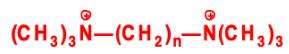
effetti collaterali, il ganglio vede gli stessi recettori nicotinici gangliari sia il ganglio simpatico che parasimpatico, ci sono effetti anticolinergici sul sistema parasimpatico.

I curarosimili derivano dalla ditubocurarina, il curaro è un agente paralizzante e si dividono in 2 classi in base alla struttura: leptocurarici e pachicurarici. Lepto= sottile, sono molecole con struttura lineare, pachi=grossi molecole con struttura più ingombrante, si differenziano per il meccanismo d'azione, entrambe agiscono sul recettore nicotinico muscolare, i pachicurarici sono antagonisti competitivi, i leptocurarici sono antagonisti non competitivi. Sono le uniche molecole che agiscono sul recettore nicotinico come antagonisti, dal punto di vista terapeutico, prima per la classificazione del recettore nicotinico neuronale In alfa sette e $\alpha 4\beta 2$ sono servite molecole estratte per esempio dal veleno di serpente come l'alfa 4 bungarotossina, sono molecole più complesse e con struttura peptidica, non sono farmaci ma sono stati strumenti di indagine farmacologica per la classificazione dei recettori. Non sono le uniche, ci sono anche altre tossine che agiscono come antagonisti e quindi bloccanti dei recettori

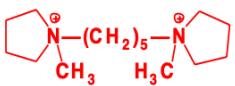
Antagonisti nicotinici

Ganglioplegici SAR

Antagonisti Nicotinici (ganglioplegici: SAR)



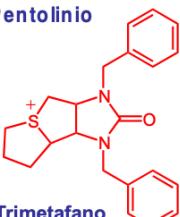
Esametonio: n = 6
Pentametonio: n = 5



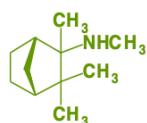
Pentolinio



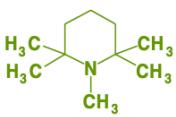
Cloroisondamina



Trimetafano



Mecamilamina



Pempidina

Ci sono molecole semplici come esametonio e pentametonio con 2 teste ammoniche quaternarie legate da un linker a 5-6 metileni e hanno una distanza tra le due teste di 5-6 Armstrong.

Il pentolinio è una ciclizzazione della testa cationica, si inserisce l'atomo di azoto nell'anello pirrolidinico che richiama quello presente nella nicotina.

Quelli in rosso sono antagonisti competitivi del recettore nicotinico gangliare. Il trimetafano è l'unico ancora usato in terapia nelle crisi ipertensive, ha un sale di solfonio che non va bene per l'azione agonista. La testa cationica ha un atomo di zolfo protonato.

Mecamilamina e pempidina in verde sono antagonisti non competitivi, sono bloccanti del poro canale.

Esametonio, pentametonio, pentolinio, trimetafano interagiscono sul sito ortosterico del recettore nicotinico gangliare e, aumentando la concentrazione di acetilcolina, possono essere spiazzati, sono antagonisti competitivi. Il fatto che abbiano una distanza di 5-6 Å fa sì che con al testa cationica si leghi il sito ortosterico dell'acetilcolina, con l'altra intercettano un sito accessorio fortificando il primo attacco. Il sito accessorio si trova nella porzione extracellulare del canale nicotinico gangliare ad una distanza di circa 5-6 Å. Aumentando la concentrazione di acetilcolina si spiazza dal sito ortosterico il ligando ripristinando la funzionalità recettoriale.

Domanda Qual è l'effetto del trimetafano?

Risposta Antipertensivo

ANTAGONISTI NICOTINICI

I recettori della placca vengono antagonizzati dai curaro simili, che si dividono in non depolarizzanti e depolarizzanti. Invece, quelli gangliari sono antagonizzati dai ganglioplegici.

I ganglioplegici hanno una classe di antagonisti competitivi. L'unico rimasto è il trimetafano, che non ha una testa ammonica quaternaria, ma un sale di solfonio.

Il meccanismo di azione è competitivo, perché una testa cationica interagisce con il sito ortosterico, dove va una molecola di acetilcolina; invece, la seconda testa cationica interagisce con un sito accessorio alla distanza di 5,5 Å.

Cosa si è visto su queste molecole, non più usate come antipertensivi?

Lo studio è servito a capire la distanza ottimale per avere un antagonismo competitivo nei confronti del recettore gangliare e anche per avere un antagonismo nei confronti del recettore nicotinico muscolare.

L'antagonismo nei confronti del recettore nicotinico muscolare è stato raggiunto con due meccanismi diversi, uno competitivo e uno non competitivo.

Si è visto che la distanza per aver un'azione antagonista è diversa nel recettore nicotinico muscolare e lo spunto per questo studio è derivato dalla molecola naturale d-tubocurarina, insieme allo studio sulle molecole dell'esametonio e del pentametonio.

Sui gangliari sono importanti le due teste ammoniche quaternarie, poste a una definita distanza per avere un'attività antagonista competitiva, che può essere sormontata e quindi superata dall'aumento di acetilcolina.

Per il recettore nicotinico gangliare la distanza ottimale è di 5-6 Å.

Per il reattore nicotinico muscolare la distanza ottimale è di 10 Å. Partendo dalla molecola dell'esametonio e del pentametonio si è progettata la molecola del decametonio. In questa nuova molecola la catena metilenica centrale, che separa le due teste cationiche, è formata da 10 metili.

La distanza maggiore che c'è negli antagonisti nicotinici muscolari è derivata anche dallo studio della D-tubocurarina.

La D-tubocurarina è una molecola molto grossa e ingombrata.

La D-tubo-curarina è stata analizzata in quanto è l'alcaloide presente nel curaro.

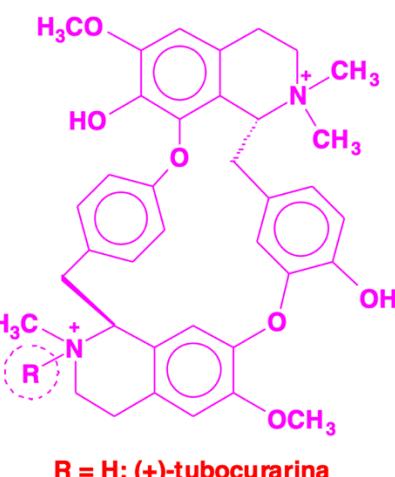
È una molecola nota da molto tempo, il suo uso risale al 16° secolo. Solo intorno al 1850 si è capito il suo sito di azione.

Nel 1935 King ha isolato il principio

attivo dalla droga. Questo principio attivo è stato caratterizzato. All'inizio venne compiuto un errore nell'attribuzione della struttura. Nel 1948, dopo essere entrata in terapia come miorilassante, gli era stata attribuita una struttura in cui tutti e due gli atomi di azoto erano quaternari. In realtà nel 1970 Everett corresse King facendogli notare come uno degli azoti fosse effettivamente quaternario, mentre l'altro fosse terziario. L'atomo di azoto terziario si protona a pH fisiologico, ma non è una carica positiva permanente.

Questo R che King aveva indicato come un gruppo CH₃ è un H, quando è protonato.

È una molecola con dei centri chirali, l'unica attiva è la D-tubocurarina (destrogiro).



- usata dal XVI secolo
- 1857: sito d'azione (Bernard)
- 1935: isolamento principio attivo (King)
- 1943: in terapia
- 1948: assegnazione della struttura (King)
- 1970: assegnazione della struttura corretta (Everett)

Questa molecola, nonostante la struttura ingombrata, è stata uno dei punti di partenza nello studio del decametonio. Analizzando questa struttura si è visto che la distanza tra l'azoto quaternario e quello terziario è di circa 10 Å.

In questo caso la struttura non è flessibile. È una struttura ciclica dove i gruppi che interagiscono sono a una distanza bene definita.

Unendo la distanza di 5-6 Å dell'esametonio e verificando cosa succedeva allungando la catena dall'esametonio fino al decametonio, si è progettato il decametonio.

Si vide che mentre l'esametonio è un antagonista competitivo del recettore nicotinico gangliare, il decametonio, pur derivando dalla D-tubocurarina, è un antagonista competitivo del recettore nicotinico muscolare e ha un meccanismo di azione diverso.

Questo è il tipico esempio in cui con una semplificazione molecolare, con l'identificazione dei farmacofori (l'azoto quaternario e terziario) e con l'identificazione della loro distanza ottimale, si è riusciti a creare una struttura flessibile, ma con un meccanismo d'azione diverso.

Agiscono sullo stesso recettore, uno con meccanismo competitivo e l'altro con un meccanismo non competitivo.

Queste molecole flessibili vengono definite leptocurarici, cioè caratterizzati da un linker lineare tra i due farmacofori.

I curari sono detti pachi-curarci, cioè grossi.

Questi farmaci sono definiti bloccanti neuro-muscolari, poiché antagonizzano la trasmissione della giunzione neuromuscolare. Sono tutti usati come coadiuvanti negli interventi chirurgici.

In particolare, i lepto曲arici (derivati del decametonio e della succinilcolina) vengono usati per le manovre di intubazione endotracheale, per la ventilazione assistita e negli interventi di breve durata.

I lepto曲arici hanno un meccanismo di azione non competitivo, si definiscono depolarizzanti e la loro azione provoca paralisi spastica.

Essendo depolarizzanti, il primo evento che si ha è di contrazione, bloccano il canale dopo che è già avvenuta la depolarizzazione (cioè l'entrata di sodio attraverso il canale).

Essendo non competitivi, non sono sormontabili e quindi possono dare origine a tossicità, perché non esiste un antidoto. Somministrando un inibitore dell'acetilcolina esterasi, non si riesce a revertire la loro azione.

I pachicurari ci invece, come la D-tubocurarina e congiunti, hanno un meccanismo azione di antagonismo competitivo. Vengono definiti non depolarizzanti e quindi l'azione antagonista provoca sul muscolo una paralisi flaccida (muscolo viene paralizzato in rilassamento).

Questi a differenza degli altri, essendo competitivi, sono più sicuri nell'azione, hanno una durata d'azione maggiore e vengono usati negli interventi di lunga durata (come quelli osteo-articolari). In caso di sovradosaggio possono essere revertiti, somministrando un inibitore dell'acetilcolina esterasi, che alza i livelli di acetilcolina e li riesce a spiazzare.

Gli studi su queste molecole vengono effettuati attraverso saggi in vitro. L'organo che mima la contrazione della muscolatura è il muscolo retto-addominale di rana.

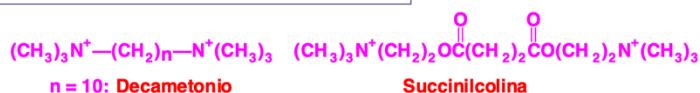
Gli studi di binding vengono fatti su recettori purificati da torpedo californica o su linee cellulari.

ANTAGONISTI NON COMPETITIVI DEPOLARIZZANTI (LEPTOCURARI CI):

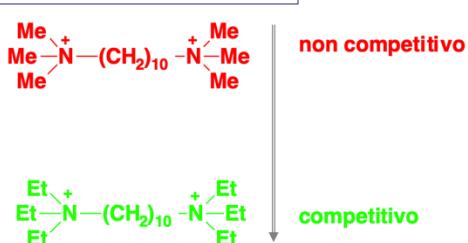
Hanno tutti una struttura lineare, assomigliante a quella dell'esametonio e del pentametonio, ma la catena che distanzia le due teste ammoniche quaternarie è di circa 10 Å.

Il farmaco più usato è la succinilcolina. Sono state migliorate alcune sue proprietà farmaco-cinetiche andando a introdurre al posto di una catena lineare di dieci metileni, due funzioni estere. Sono stati sostituiti due gruppi CH₂, da ogni lato, con un COO.

• antagonisti non competitivi depolarizzanti



• antagonisti competitivi non depolarizzanti



La parte centrale è l'acido succinico, di cui è stato fatto il diestere con la colina. Per questo motivo si chiama succinilcolina.

La distanza tra le due teste ammoniche quaternarie è sempre di dieci atomi, come nel caso del decametonio. La distanza è la stessa, ma con il gruppo estereo la molecola è stata resa più sicura. In caso di sovradosaggio intervengono le esterasi ematiche, rompono il legame estereo, portando alla degradazione della molecola.

Quando l'anestesista usa la succinilcolina deve sempre fare un dosaggio delle esterasi ematiche del paziente. Se le esterasi ematiche non sono in concentrazione sufficiente la molecola rimane con la tossicità del decametonio e in caso di sovradosaggio non si riesce a intervenire.

In questo caso è stata fatta una sostituzione bio-isosterica. È stata mantenuta la stessa attività biologica, pur non essendo un'isosteria classica.

Perchè sono antagonisti non competitivi?

Queste molecole interagiscono con il sito ortosterico, fuori dal canale, dove va normalmente l'acetilcolina e si legano con una testa cationica.

Questo primo evento fa sì che il canale si apra, che entri il sodio e che si abbia depolarizzazione.

Essendo una struttura molto lineare e sottile, l'apertura del canale permette l'ingresso di tutta la catena della molecola. Il canale si apre, la molecola ancorata al sito extra-cellulare riesce a infilarsi all'interno del canale, che ha già dato depolarizzazione.

Il canale nicotinico essendo permeabile agli ioni sodio ha la parete tappezzata di amminoacidi carichi negativamente. Di conseguenza l'altra testa cationica intercetta un altro sito anionico, all'interno del canale, dove da un'interazione additiva.

Essendo all'interno del canale, blocca il canale nella sua situazione di depolarizzazione, cioè in contrazione. Per questo si dice che danno paralisi spastica.

Se aumenta l'acetilcolina, quest'ultima mi sposta la testa cationica legata al sito ortosterico. Però tutto il resto della molecola blocca il poro del canale. È un antagonismo competitivo perché pur avendo come primo sito di interazione il sito ortosterico, la molecola comunque riesce a intercettare un altro sito da cui non si riesce a sbloccare.

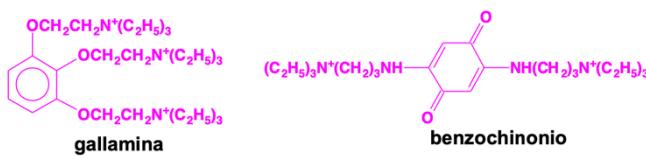
In questo caso anche se si somministra un inibitore dell'acetilcolina esterasi non si ottiene la scomparsa dell'azione della succinilcolina. L'unica cosa efficace è l'azione delle esterasi ematiche che rompono i legami esterei tra l'acido succinico e la colina. In questo modo si ripristina l'acido succinico e si libera la colina.

Come hanno fatto a capire quanto è importante la struttura a letto dei curari?

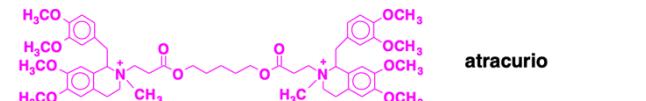
Hanno aumentato le dimensioni dei sostituenti sull'atomo di azoto, cioè sulla testa cationica.

Il decetaetonio, nonostante abbia una struttura vicina al decametonio, diventa un antagonista nicotinico muscolare competitivo, perchè non riesce ad entrare nel canale. Quindi, la seconda testa intercetta un sito accessorio, nella posizione extracellulare del canale. Questo è il meccanismo con cui agiscono tutti i pachicurarici.

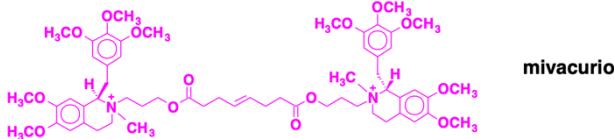
Antagonisti Nicotinici (curaro-simili: antagonisti competitivi)



benzochinonio



atracurio



mivacurio

Le molecole in figura sono usate in terapia.

Quelli che vengono più usati in terapia sono i derivati della tetraidropapaverina, cioè l'atracurio e il mivacurio. Gli atomi di azoto sono all'interno di due grandi gruppi ingombranti. Queste molecole non hanno dunque la possibilità di agire, come i leptocurarici all'interno del canale.

Per questo motivo l'antagonismo nei confronti del recettore nicotinico avviene nella porzione extra-cellulare. Si impedisce l'ingresso di sodio, non si ha la depolarizzazione iniziale (si ha paralisi flaccida).

Ci sono anche i derivati della malouetina, che ha la struttura del ciclopentanoperidrofenantrene. Questa struttura è stata modificata per avere dei farmaci più efficaci dal punto di vista farmaco-cinetico e farmaco-dinamico. Questi farmaci sono il pancuronio, il vencuronio, il pipecuronio e la D-tubocurarina, che è stata il prototipo dei pachicurarici.

Analizziamo la struttura dell'atracurio e del mivacurio.

Hanno una catena centrale con due funzioni estere.

La porzione ammonica quaternaria è costituita da due teste ammoniche quaternarie permanenti, cioè sempre caricate positivamente. Appartengono agli anelli di una struttura detta tetraidropapaverinica (perché uno dei due anelli della papaverina è stato saturato).

Nel mivacurio la catena centrale ha un doppio legame, con una configurazione trans.

Normalmente si usa l'atracurio besilato, però è stato visto che il cis-atracurio, con la configurazione 1R,2R è quello con la migliore attività.

Besilato cosa vuol dire?

Quando ci sono atomi di azoto da quaternarizzare, la quaternarizzazione avviene per trattamento della base libera con ioduro di metile. Non sempre si ottengono dei sali maneggiabili.

A volte trattando con ioduro o cloruro di metile si osserva la formazione di sali deliquescenti. Per questo motivo è necessario usare il contro-ione migliore, in modo da avere un sale che si riesce a maneggiare da un punto di vista farmaceutico (perché queste sono molecole che vengono somministrate per via endovenosa).

Nel caso dell'atracurio e del mivacurio sono stati fatti vari studi per capire quale contro-ione origina il miglior sale.

In questo caso il contro-ione migliore è il besilato, cioè si è fatto il sale con il benzene solfonato di metile.

Normalmente per fare questo si scioglie la base libera in acetone, poi si aggiunge lo ioduro di metile o il cloruro di metile e si aspetta la formazione dei cristalli. Se non avviene la formazione dei cristalli si può aggiungere dell'etere per facilitare la precipitazione del sale.

Spesso il sale però non è accettabile, non è filtrabile o non è ben isolabile.

Quindi si fanno altre prove con altri contro ioni, infatti l'atracurio viene commercializzato come atracurio besilato.

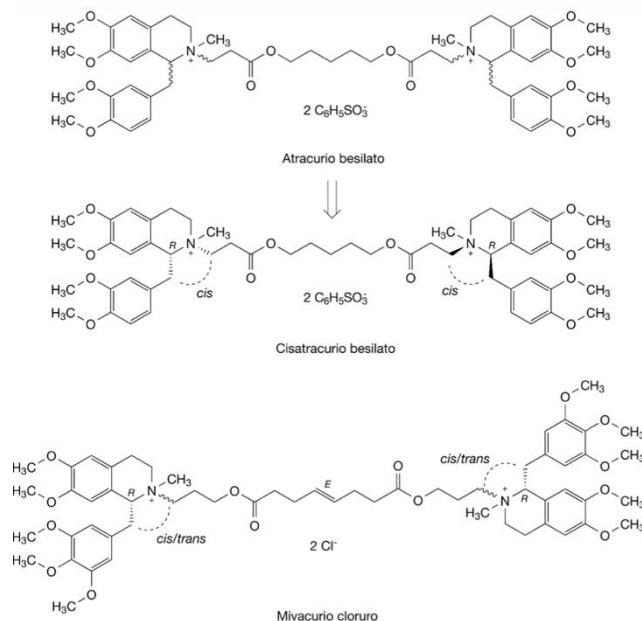


Figura 9.10 Bloccanti neuromuscolari a struttura benziltetraidroisoquinolinica.

Invece, nel caso del mivacurio il sale in forma di cloruro è quello usato in terapia.

La malouetina è una molecola naturale e ha un'azione antagonista nicotinica muscolare.

La molecola naturale ha già degli atomi di azoto quaternarizzati. Sono state fatte varie modifiche sulla sua struttura.

La modifica principale è stata quella di inserire gli atomi di atomi di azoto, che vengono poi quaternarizzati, in dei cicli.

I cicli nel caso del pancuronio e del vecuronio sono delle piperidine.

Nel pancuronio l'azoto è inserito in un metil piperidinio.

Nel vecuronio solo uno dei due gruppi è in forma di ammonio quaternario.

Nel pipecuronio l'azoto appartiene una piperazina.

L'altro aspetto importante in queste tre molecole è la presenza di due gruppi acetossilici, nella posizione 3 e 17 dell'anello del ciclopentanoperidofenantrene.

Questi due gruppi servono da uno punto di vista farmaco-cinetico.

I due gruppi in posizione 17 sono in beta, sopra al piano, mentre in posizione 3, sono in alfa, sotto al piano.

I curaro simili hanno una durata d'azione maggiore del sussametonio (sinonimo della succinilcolina).

Il sussametonio viene usato come cloruro, l'atracurio come besilato, il mivacurio come cloruro, invece il pancuronio, il vecuronio e pipecuronio come bromuro.

La quaternarizzazione di questi ultimi tre viene fatta con bromuro di metile.

Farmaco (Specialità medicinale®)	Mecanismo d'azione	Insorgenza dell'azione (minuti)	Durata d'azione (minuti)	Metabolismo
Sussametonio cloruro (<i>Midarine, Myotenis</i>)	depolarizzante	1 – 1,5	6 – 8	idrolisi da ChE plasmatiche
Atracurio besilato (<i>Tracrium</i>)	competitivo	2 – 4	30 – 40	degradazione di Hofmann; idrolisi da ChE plasmatiche
Mivacurio cloruro	competitivo (<i>Mivacron</i>)	2 – 4	12 – 18	idrolisi da ChE plasmatiche
Pancuronio bromuro (<i>Pavulon</i>)	competitivo	4 – 6	120 – 180	metabolismo nel fegato e clearance; eliminazione renale
Vecuronio bromuro (<i>Norcuron</i>)	competitivo	2 – 4	30 – 40	metabolismo nel fegato e clearance; eliminazione renale
Pipecuronio bromuro (<i>Arduan</i>)	competitivo	2 – 4	80 – 100	metabolismo nel fegato e clearance; eliminazione renale

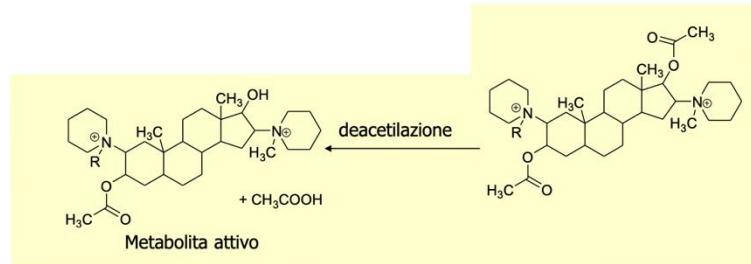
Come vengono metabolizzati?

Curaro-simili: metabolismo pancuronio

Le molecole del pancuronio hanno due gruppi acetossilici in posizione 3 e 17. Questi gruppi subiscono deacetilazione metabolica.

La deacetilazione non porta ad un calo di attività.

La molecola, anche quando deacetylata, rimane ugualmente attiva.



Un altro metabolismo a carico di queste molecole riguarda i derivati dell'atracurio.

Questi derivati hanno una catena centrale con dei gruppi esterei.

Le esterasi ematiche idrolizzano i gruppi esterei portando alla separazione della funzione tetraidropapaverinica dal resto della molecola.

L'altro metabolismo che avviene è la degradazione di Hofmann.

Questo meccanismo è opposto a quello della sintesi dell'atracurio.

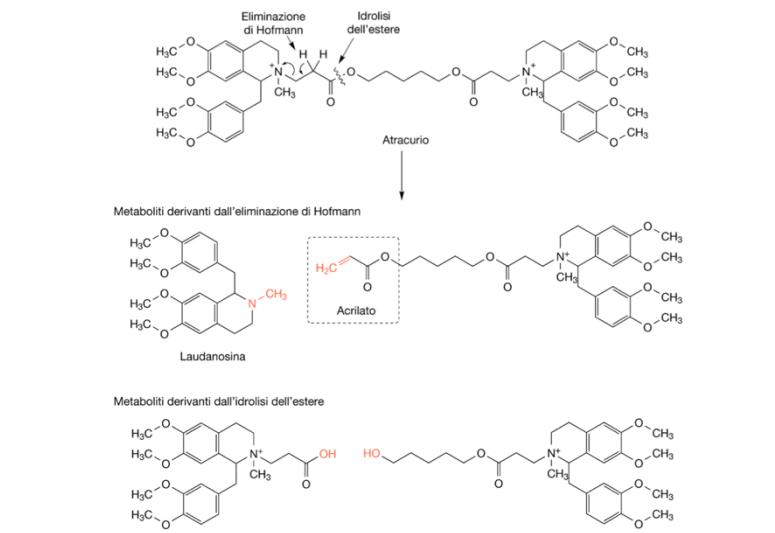
Nella sintesi dell'atracurio si ha l'attacco di un gruppo amminico su un carbonile $\alpha\beta$ insaturo, per dare origine al gruppo $\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$ -estere.

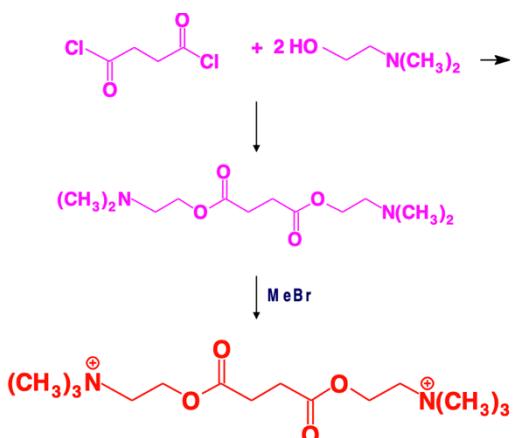
In vivo avviene la reazione opposta, cioè si ha la liberazione del gruppo amminico con la formazione dell'estere dell'acido acrilico. Il motivo è la debole acidità degli idrogeni adiacenti al gruppo carbonilico dell'estere. In seguito all'eliminazione di uno degli idrogeni si ha un riarrangiamento con la formazione di un doppio legame e la scissione del legame tra l'azoto e il CH_2 adiacente.

La base che si forma, derivato della tetraidropapaverina, si chiama laudanosina.

La stessa reazione può avvenire anche nell'altro frammento.

Metabolismo dell'atracurio: eliminazione di Hofmann e idrolisi dell'estere





SINTESI SUCCINILCOLINA

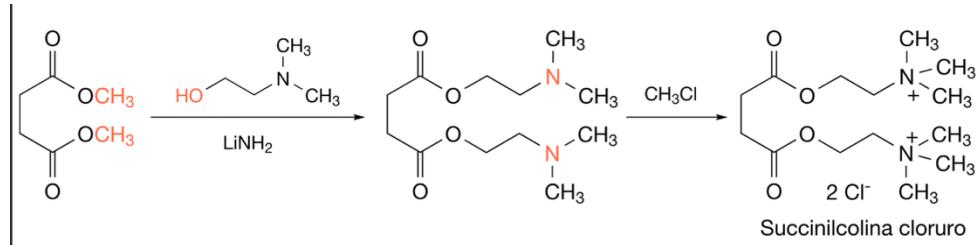
si tratta di un'esterificazione che si può fare o con il cloruro dell'acido succinico con il corrispondente alcol dimetilamminico (N,N dimetiletanolammina). Normalmente la reazione si fa in presenza di trietanolammina (reagisce con l' HCl che si libera nella reazione, può essere usato anche il diossano, cloruro di metilene) che sposta l'equilibrio verso destra. In questo caso viene utilizzato il bromuro di metile per la quaternarizzazione degli atomi di N

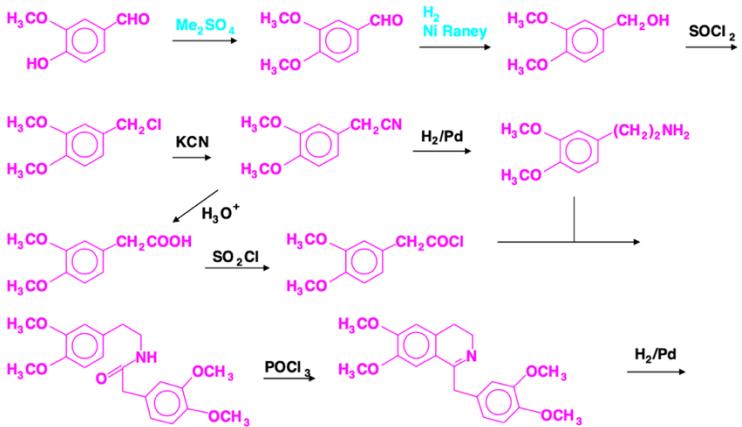
ottenendo così la succinilcolina bromuro.

SINTESI SUCCINILCOLINA ALTERNATIVA

La stessa reazione può essere fatta con una transesterificazione: si parte con un estere metilico dell'acido succinico poi si utilizza l'alcol che in questo caso viene attivato per farne l'alcolato con una base molto forte (litio ammide che serve a formare l'alcolato) che reagisce più facilmente con una reazione di transesterificazione, esce MeOH e si forma il diestere con l'alcol dimetil ammino etanolo.

Alla fine, utilizzo il metil cloruro (può essere utilizzato anche il bromuro di metile) e ottengo la succinil colina. A livello pratico si scioglie prima la base libera in acetone poi si aggiunge goccia a goccia il bromuro o cloruro di metile \rightarrow cristallizzazione e posso aggiungere etere e mettere in freezer per aiutare la cristallizzazione dopodiché filtro e ottengo la molecola desiderata.





SINTESI ATRACURIO

è in forma di besilato quindi alla fine la metilazione verrà fatta con il benzensolfonato di metile.

Prima di tutto è necessario formare i due sintoni che sono da un lato la porzione basica (tetraidropapaverina), dopodiché si costruisce il linker centrale e con una reazione finale si lega il gruppo amminico al linker centrale

Per la costruzione dell'anello tetraidropapaverinico: Si parte da un'aldeide (vanillina), avendo dei gruppi metossilici sugli anelli aromatici si trasforma l'OH fenolico in metossile per cui si effettua la metilazione del OH con dimetilsolfato ottenendo la 3,4 dimetossi benzaldeide che è il punto di partenza per costruire l'anello.

Successivamente viene ridotto la benzaldeide tramite idrogenazione catalitica con Ni Raney → ottenimento del corrispondente alcol benzilico (si potrebbe fare anche con NaBH_4) sull'alcol benzilico bisogna attivare l'OH trasformandolo con il cloruro di tionile nel corrispondente alogenuro alchilico → attivazione dell'alcol poiché bisogna trasformare la molecola nel corrispondente nitrile (da cloruro di benzile trattando con cianuro di potassio si ottiene il fenil acetonitrile). Reazione effettuata con molta attenzione poiché KCN non va mai usato in ambiente acido quindi reazione effettuata in ambiente neutro (altrimenti si avrebbe la formazione dell'acido cianidrico che è molto tossico). Il fenilacetonitrile è il punto di partenza per avere due strade:

- Riduzione del gruppo nitrile e ottenimento di una fenetilammina (esempio usando idrogenazione catalitica)
- Idrolisi del nitrile che può essere effettuato in ambiente acido e basico. Passa attraverso un intermedio (ammide e alla fine della reazione si arriva al corrispondente acido carbossilico) (nel basico avrò il carbossilato) → ottenimento acido fenilacetico. La scelta dell'acido in questo caso è molto importante poiché potrebbero ridare l'alegenuro e l'acido bromidrico potrebbe portare a demetilazione dei metossili quindi si utilizza l'acido solforico.

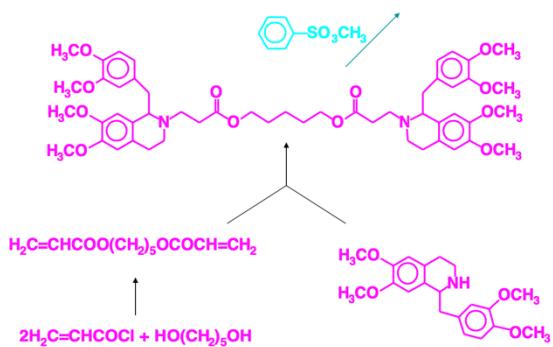
Ora l'ammina e l'acido devono reagire fra loro per la formazione dell'ammide, attivazione acido (cloruro di tionile) per avere il corrispondente del cloruro acilico.

Una volta impostata la molecola → si scaturisce l'anello tetraidropapaverinico tramite acilazione di Friedel Craft a carico del carbonile. Essendo un carbonile dell'ammide per essere un buon elettrofilo si utilizzeranno acidi di lewis che rendono il carbonile maggiormente elettropositivo: in particolare in questo caso si utilizza l'ossicloruro di fosforo che rende il carbonio carbonilico più δ^+ per essere attaccato dall'anello e questo comporta un'acilazione di friedel craft intramolecolare che serve per chiudere l'anello. L'attacco passa attraverso un intermedio alcolico: formazione di un gruppo OH, si parla di un carbonio benzilico e l'OH del carbonio benzilico in condizioni di POCl_3 disidrata spontaneamente; quindi, non si andrà a formare il derivato alcolico ma un derivato diidropapaverinico poiché nella papaverina si è ridotto il doppio legame.

Il doppio legame è coniugato all'anello aromatico quindi è favorita la disidratazione dell'alcol benzilico terziario.

Riduzione del doppio legame tramite idrogenazione ottenendo una tetraidropapaverina che ha il gruppo NH disponibile per dare la reazione finale che è un'addizione di Micheal.

Antagonisti Nicotinici (sintesi: atracurio)



Formazione del linker centrale con pentan-diol, reazione con due enoli di cloruro dell'acido acrilico con conseguente formazione del corrispondente estere che è caratterizzato da due gruppi carbonilici alfa beta insaturi, molecola simmetrica.

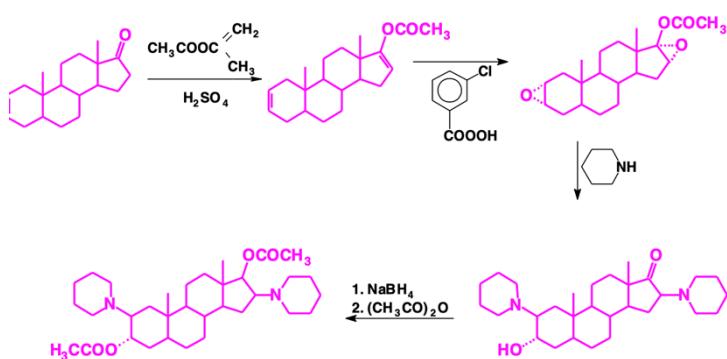
Il gruppo amminico da una addizione di micheal sul CH₂ dell'estere dell'acido acrilico da entrambe le parti.

L'addizione da origine alla molecola dell'atracurio.

Bisogna poi quaternarizzare gli atomi di N

utilizzando il benzilsolfonato di metile ottenendo la quaternarizzazione di entrambi gli atomi di N, questo inserisce ulteriori centri chirali.

SINTESI DEL PANCURONIO



si parte da un derivato dell'androstenedione in cui si ha un doppio legame in posizione 2,3 e un carbonile in posizione 17.

La prima reazione è quella di mettere tutto in ambiente acido (acido solforico) poiché favorisce la tautomeria chetoenolica del carbonile (enolo in posizione 16-17) bisogna favorirla poiché bisogna fare una transesterificazione con un estere a sua volta di un enolo, *chi è l'estere che uso?* Estere

acetico di un alcol isoprenilico (isoprenil acetato), l'enolo esterificato con acido acetico è il migliore a spostare l'equilibrio verso destra poiché dalla transesterificazione esce l'alcol isoprenilico che è il tautomero enolico dell'acetone. La reazione viene effettuata a caldo quindi man mano che si forma l'estere con l'androstenedione si libera alcol isoprenilico che è più stabile in forma di acetone ed è possibile allontanarlo: trasferimento del gruppo acetato sulla forma enolica dell'androstenedione.

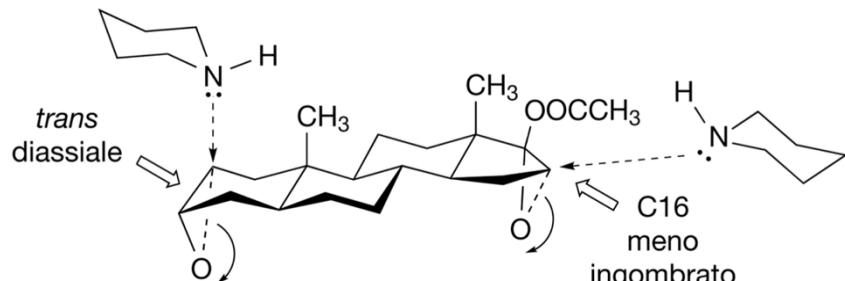
Ora si hanno due doppi legami: uno in posizione 16-17 e uno in 2-3.

Si prosegue con l'ossidazione dei doppi legami mediante peracido (acido metacloro perbenzoico) utilizzato poiché nel momento in cui l'acido agisce come ossidante si riduce ad acido benzoico che è un acido non troppo forte ed evita che gli epossidi che si formano per ossidazione dei doppi legami si

rompano subito dopo la loro formazione. Una volta formati i due epossidi si usa la base per aprire l'eossido, utilizzando la piperidina la quale andrà ad attaccare il pancuronio nelle due posizioni favorevoli.

Gli epossidi formatosi sono in alfa poiché il 16-17 si ha ingombro sterico del gruppo acetossilico in beta

Regio- e stereochimica dell'apertura del diepossido con piperidina



(quindi l'eossido si forma in alfa) e in posizione 2-3 poiché nella faccia beta si ha il metile che crea un certo ingombro sterico.

La piperidina attacca in 16 in beta poiché trova la faccia alfa occupata dall'eossido, nel caso della posizione 2-3 si ha l'attacco trans diassiale. (potrebbe

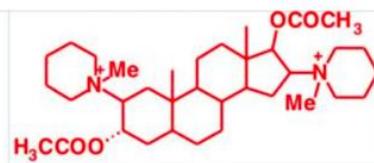
attaccare anche in 3), se si forma una piccola quantità dell'altro si dovrà procedere con una separazione. perché si forma di nuovo il carbonile in posizione 17? Quando si apre l'eossido si ha il gruppo acetossilico e l'OH in alfa. Il gruppo acetossilico sullo stesso carbonio fa idrolizzare l'estere ed è instabile: quindi spontaneamente idrolizza l'estere e si forma un gemdiolo sul carbonio 17 il quale disidrata subito per ripristinare il carbonile. Dalla reazione si ottiene direttamente il carbonile per instabilità del gruppo acetossilico presente sullo stesso carbonio del gruppo alcolico che favorisce la deacetilazione e il gemdiolo ritorna carbonile.

Come ultima reazione si prevede la formazione del gruppo alcolico dal carbonile in 17 (riduzione con NaBH_4) e doppia acetilazione utilizzando anidride acetica (acetilazione anche dell'OH in posizione 3 α). Perché l'OH in 17 è in beta? La reazione viene effettuata in NaBH_4 perché favorevolmente forma l'isomero con l'OH in beta poiché ingombrata dalla piperidina. Nella riduzione del carbonile la specie che deve attaccare il carbonile è l'idruro che trova il carbonile con adiacente in posizione 16 la piperidina che crea ingombro sterico quindi la faccia attaccata dall'idruro è in posizione alfa quindi sposta l'ossigeno in posizione beta e di conseguenza la riduzione porta alla formazione dell'OH in posizione 17 beta.

Riprendendo dalla lezione precedente concludiamo la sintesi del pancuronio considerando il fatto che è necessario quaternarizzare gli atomi di N; possono essere entrambi quaternarizzati (come nel caso del parcuronio) oppure possono essere uno quaternarizzato e l'altro sottoforma di N terziario che si protona a pH fisiologico (vecuronio).

e condizioni che dobbiamo stabilire al fine di ottenere o uno o l'altro sono relative alla temperatura: a temperatura ambiente e in quantità stecchiometricamente adeguate abbiamo solo il vecuronio mentre se saliamo a temperature di 40-50 gradi avremo il parcuronio.

Antagonisti Nicotinici (sintesi: pancuronio)



PANCURONIO

A caldo ottengo la quaternarizzazione
di entrambi gli N

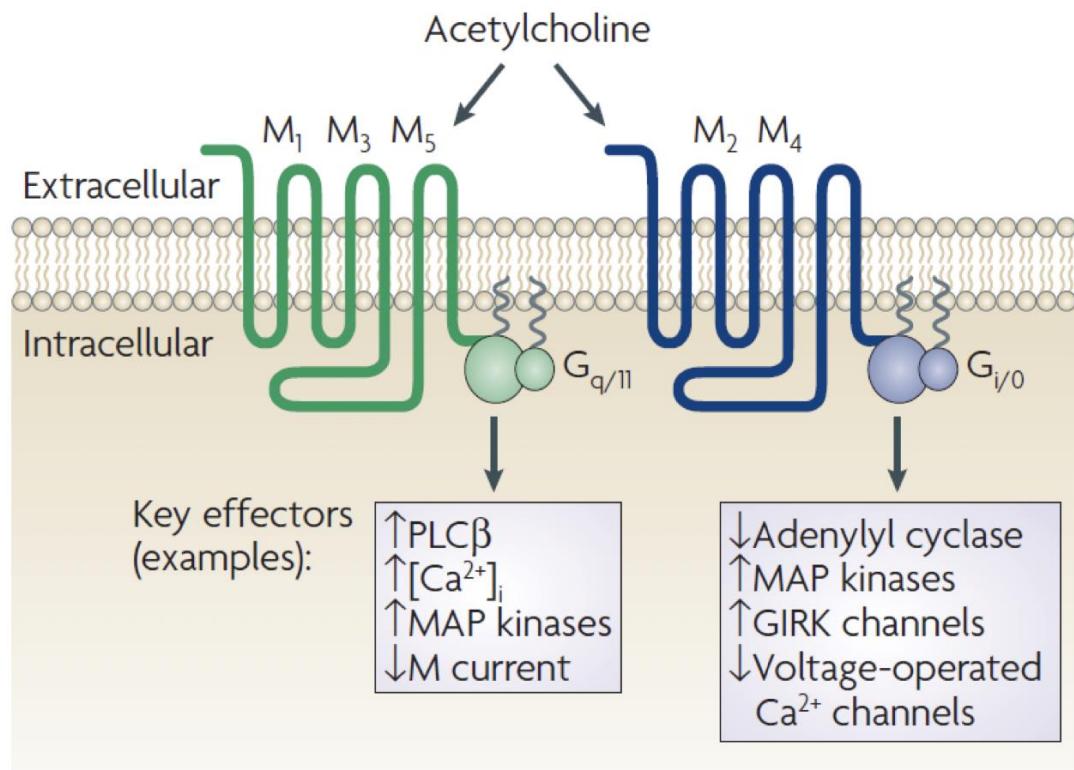
CH_3Br
 40°C



vecuronio

RECETTORI MUSCARINICI

Recettori Muscarinici



Introduciamo ora una nuova classe di farmaci che appartengono sempre al sistema colinergico e che coinvolgono i recettori muscarinici.

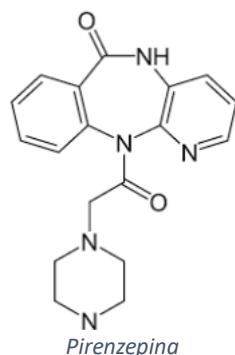
I recettori muscarinici sono stati molto studiati dal punto di vista strutturale; infatti piccole modifiche nella molecola dell'acetilcolina comportano una variazione nell'attività molto più marcata rispetto a quella che si osserva nel recettore nicotinico.

Sugli organi effettori sono presenti 5 sottotipi recettoriali, da M₁ a M₅:

- **M₁, M₃, M₅** sono recettori metabotropi accoppiati a proteina G_q, quindi aumentano la fosfolipasi C con i secondi messaggeri diacilglicerolo e inositol trifosfato. Inducono mobilizzazione del calcio intracellulare. Sono di natura stimolatoria.
- I recettori **M₂ e M₄** sono recettori metabotropi accoppiati a proteina G_i, quindi diminuiscono l'adenilato ciclasi e di conseguenza la produzione di AMP ciclico. Aumentano la conduzione attraverso i canali del potassio e diminuiscono l'apertura dei canali del calcio voltaggio dipendenti. Sono di natura inibitoria.

L'acetilcolina va ad attivare questi 5 recettori, che hanno il sito ortosterico analogo, ma hanno un'elevata omologia strutturale, quindi è difficile differenziarli e di conseguenza trovare dei ligandi selettivi per un sottotipo piuttosto che un altro.

La prima classificazione di questi 5 sottotipi risale alla scoperta della Pirenzepina, farmaco antiulcera, antagonista dei recettori muscarinici, caratterizzato da un triciclo, detto piridobenzodiazepinone, anello a 7 centrale con un anello piridinico e uno



benzenico. Legato poi ad un anello piperazinico. Questa molecola era in grado di discriminare due famiglie di recettori muscarinici, quella su cui aveva un'azione antagonista fu chiamata famiglia dei recettori M1, quella su cui non aveva azione fu chiamata famiglia dei recettori M2.

Più avanti negli anni si è visto che la classe M2 non era una classe omogenea di recettori perché si isolarono molecole con alta affinità per gli M2 ma non avevano affinità per un'altra popolazione di recettori che poi furono chiamati M3;

successivamente sono stati individuati altri due sottotipi recettoriali M4 e M5 che però non sono stati caratterizzati ampiamente dal punto di vista farmacologico ma più da un punto di vista biochimico;

Si è visto che i siti allosterici di questi sottotipi recettoriali variano, quindi è preferibile andare a modulare l'attività di questi recettori intervenendo con ligandi che agiscono sui siti allosterici invece che su quelli ortosterici che sono meno selettivi.

- - **M1:** presenti a livello postsinaptico centrale, sono responsabili a livello della corteccia della trasmissione colinergica che sta alla base dell'apprendimento e della memoria. Sono presenti anche a livello dello striato, dell'ippocampo e dei gangli. A livello delle ghiandole modulano la secrezione ghiandolare, soprattutto a livello delle cellule parietali gastriche dove modulano la secrezione dell'acido cloridrico (la pirenzepina è un antiulcera). Soprattutto gli M1 sono presenti a livello del muscolo ciliare dell'occhio, con funzione di creare con la loro stimolazione miosi (rstringimento della pupilla)
- - **M2:** prevalentemente presenti a livello cardiaco, dove hanno un effetto inibitorio, cronotropo, inotropo e batmotropo negativo, effetto contrario a quello che ha la noradrenalina a livello cardiaco. Localizzazione presinaptica, se sono autocettori hanno un effetto di diminuzione del rilascio di acetilcolina, come eterocettori (su fibre non colinergiche) portano ad una diminuzione di dopamina e glutammato.
- - **M3:** presenti negli organi effettori, ossia muscolatura liscia bronchiale, gastrointestinale e vescicale. Hanno effetto di contrazione, quindi gli antagonisti muscarinici di questi recettori sono gli spasmolitici e broncodilatatori. Sono presenti a livello delle ghiandole dove causano un aumento di secrezione ghiandolare. L'effetto esercitato dal parasimpatico sugli M3 è di contrazione (broncocostrizione), l'effetto esercitato dal simpatico sui beta2 è di broncodilatazione.
- - **M4:** non ci sono farmaci che agiscono in maniera specifica, localizzazione principalmente centrale, presenti in prevalenza a livello dello striato e modulano la sensazione dolorifica, quindi l'analgesia.
- - **M5:** presenti prevalentemente a livello della substantia nigra dove facilitano il rilascio di dopamina, mentre nell'area tegmentale ventrale sono coinvolti nella dipendenza da droghe.

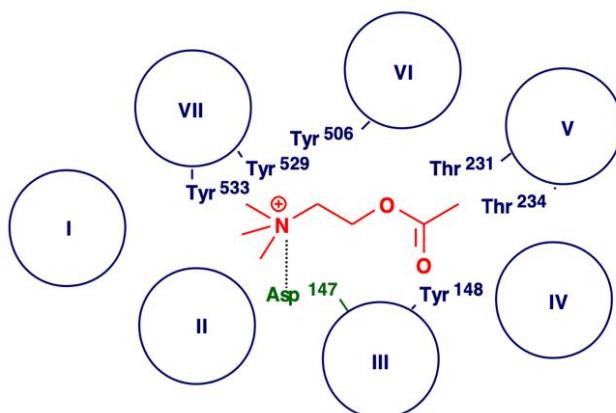
L'attivazione di un recettore accoppiato a proteine G è più lenta rispetto ai recettori canali perché nei recettori canali c'è l'attacco del ligando, l'apertura del canale, l'ingresso di sodio e la depolarizzazione mentre con recettori accoppiati a proteine G abbiamo una cascata di eventi.

Con gli agonisti muscarinici possiamo avere sia un'azione diretta che indiretta;

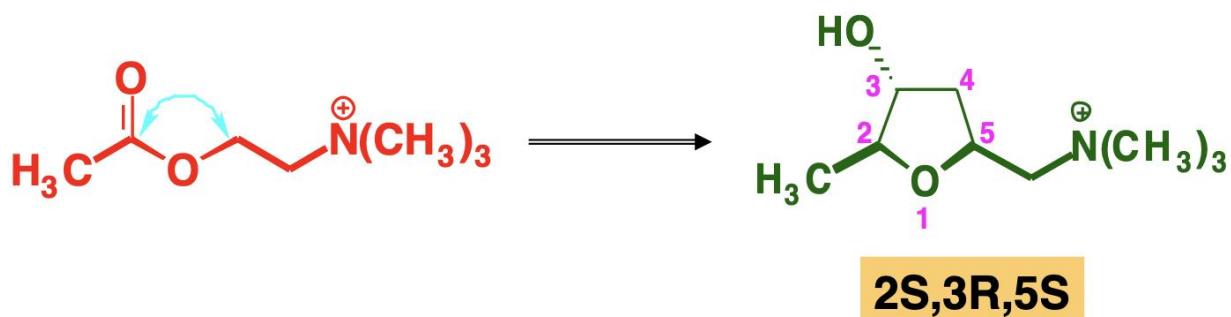
azione diretta → è evocata dagli agonisti muscarinici cioè che agiscono sullo stesso sito dell'ACh e attivano il recettore

azione indirette → riguarda gli inibitori dell'acetilcolina esterasi cioè aumentano la concentrazione di ACh

Per quanto riguarda l'interazione dell'ACh con i recettori, in particolare con M3, il fulcro dell'interazione è la testa cationica, ma mentre nel nicotinico si aveva un cluster di aa aromatici (interazione catione-pi greco), qui l'interazione avviene con un aspartato conservato nel terzo dominio transmembrana, quindi interazione ionica classica. Nel dominio 7 ci sono amminoacidi aromatici (tirosine) che aiutano l'interazione. Abbiamo poi il gruppo acetossilico che da ulteriori interazioni, in particolare quelle del gruppo estero sono legami a idrogeno (tirosina e trionina nel quinto e tirosina nel terzo dominio).



Muscarina



La muscarina rappresenta l'analogo rigido dell'ACh se si congiunge il carbonio carbonilico con il carbonio in posizione beta rispetto alla testa cationica.

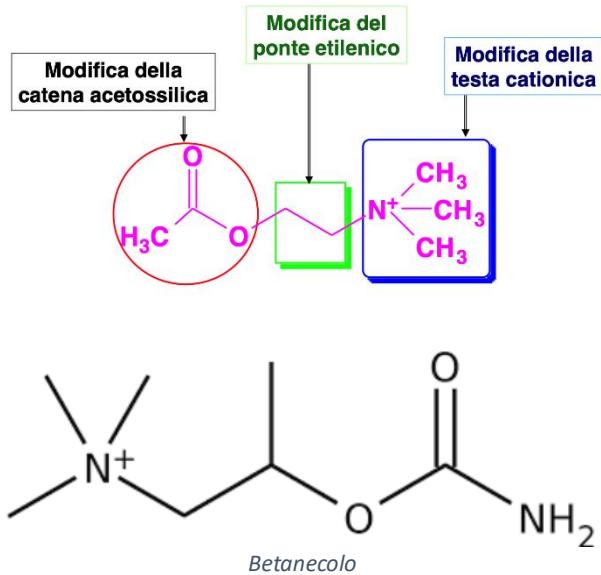
Posso fare un numero minore di modificazioni sull'acetilcolina perché il muscarinico è più stringente rispetto al nicotinico. La muscarina agisce sui recettori muscarinici ma non va sui nicotinici. Nella struttura c'è un'irrigidimento strutturale dell'acetilcolina, c'è un tetraidrofurano. La muscarina può dare origine a una minore flessibilità e da origine a 3 centri chirali (l'acetilcolina nessuno), posso modificarli poco. I centri chirali sono il 2S, il 3R e 5S. Il carbonile è diventato un OH in 3 alfa. Il metile in beta all'azoto dà azione muscarinica ma deve essere in configurazione S.

Se l'OH in 3 fosse in beta perderemmo l'attività, perché non intercetta la controparte nel recettore. Se però faccio l'ossidazione e il derivato è un carbonile planare, la molecola che ne deriva è il muscarone che ne mantiene l'attività biologica, questo implica che il legame ad idrogeno può essere sia accettore che donatore, se l'OH è in alfa c'è possibilità di dare legame a H, quando è sul piano la possibilità è mantenuta, se è in beta viene persa.

La posizione 5 è molto importante. Nell'acetilcolina l'inserimento di un metile in alfa rispetto all'N si ottiene un derivato con azione nicotinica, se invece metilo in beta rispetto ad N (posizione 5) si ottiene un agonista muscarinico ma solo se la stereochimica è S (metacolina). Questo viene mantenuto anche nella muscarina.

La metacolina ha un metile in beta in configurazione S, è solitamente un diagnostico perché induce broncocostrizione, quindi viene somministrata a dosaggi crescenti nelle analisi spirometriche, in pazienti con broncopneumopatia ostruttiva cronica da origine ad attacchi asmatici.

Devo aumentare la stabilità metabolica, andando a modificare la funzione esterea con un carbammato (carbacolo, sia nicotinico che muscarinico). Se contemporaneamente inserisco anche il metile in beta rispetto alla testa ammonica quaternaria, ottengo un agonista solo muscarinico cioè il betanecolo.



Essendo che la catena etilenica centrale è flessibile si è andato a vedere quale fosse la conformazione maggiormente favorita per vedere l'attivazione del recettore, e l'approccio è quello degli analoghi rigidi cioè di andare a congelare una struttura in grado di mantenere a una distanza e una posizione ben definita gruppi che definiamo importanti con l'interazione con il recettore cioè i gruppi farmacofori. Quello che è stato fatto avendo la catena etilenica nella porzione centrale è stato il congelare la libera rotazione dei CH_2 centrali inserendoli in un ciclopropile in cui abbiamo due centri stereochimici così che il gruppo acetossilico e la testa ammonica quaternaria possono stare dalla stessa parte o da parti opposte (cis/gauche o trans/anti) e da un punto di vista della stabilizzazione dei legami intramolecolari, quella gauche è energeticamente favorita, a livello invece di interazione con il recettori M3 la configurazione favorita è quella trans/anti.

Agonisti muscarinici (farmaci usati in terapia)

Vediamo gli usi di questi farmaci agonisti muscarinici:

Farmaco <i>(Specialità medicinale®)</i>	Struttura	Principale indicazione terapeutica	I recettori muscarinici principalmente presenti a livello periferico sono gli M3, che sono localizzati per lo più nella muscolatura liscia gastroenterica e vescicale. Ecco perché gli agonisti muscarinici sono utilizzati per riportare ad una normale contrazione queste muscolature viscerali, soprattutto in conseguenza all'atonia vescicale e intestinale osservate dopo gli interventi chirurgici.
Aceclidina cloridrato <i>(Glaunorm)</i>		Antiglaucoma	
Betanecolo cloruro <i>(Urecholine)</i>		Trattamento della ritenzione urinaria	
Carbacolo cloruro <i>(Mios)</i>		Miotico (in associazione)	
Pilocarpina cloridrato <i>(Dropil, Pilocarpina, Pilogel, Pilotonina, Liocarpina)</i>		Miotico, antiglaucoma	

Alcuni esempi:

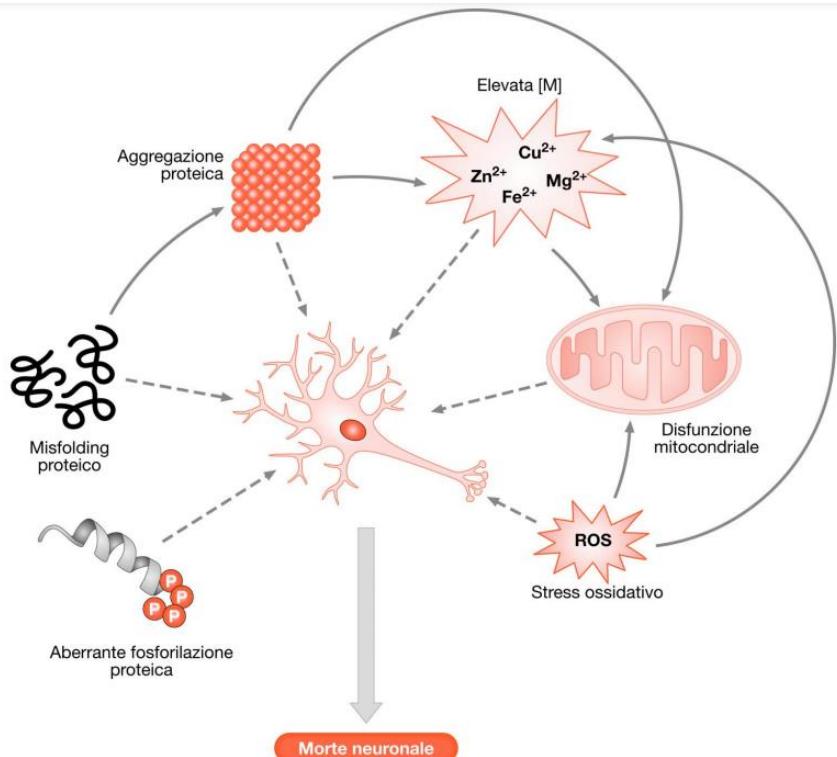
- **Il Betanecolo (si chiama urecolina)** viene utilizzato ad esempio nel trattamento della ritenzione urinaria, quindi per ripristinare la corretta contrazione della muscolatura liscia vescicale.

Uno degli usi terapeutici più desiderati da questi agonisti muscarinici è quello antiglaucoma, questo è possibile perché i recettori M1 sono prevalentemente presenti a livello del muscolo ciliare e capillare. Ciò nonostante, gli agonisti M1 non sono gli unici farmaci antiglaucoma e in futuro ne vedremo anche degli altri, ad esempio i Beta bloccanti.

Altri farmaci agonisti muscarinici sono:

- **Il carbacolo cloruro**, che normalmente si usa in associazione.
- **La pilocarpina cloridrato** è un alcaloide naturale del *pilocarpus jaborandi*. Si tratta di miotici e quindi favoriscono la contrazione sia del muscolo ciliare che del muscolo capillare, dando origine ad una facilitazione del deflusso dell'umore acqueo che per varie ragioni aumenta. Nel caso del glaucoma, è proprio l'aumentato deflusso a determinare l'incremento della pressione endoculare. Se non viene controllato, il glaucoma può portare anche a cecità, ecco perché nel momento in cui si scopre una pressione endoculare elevata, bisogna ricorrere subito all'uso di farmaci per controllarla, oppure ad un intervento chirurgico nel caso in cui non sia possibile farlo. La pilocarpina presenta un anello metil-imidazolico, in quanto l'imidazolo è sostituito con un metile, ed è congiunto ad un anello che mantiene un gruppo estereo, in questo caso ciclico. Per cui si tratta di un lattone ed è più stabile all'idrolisi rispetto all'estere dell'acetilcolina. La pilocarpina è usata in colliri contro il glaucoma.
- **Aceclidina cloridrato** anche esso è un analogo rigido, non ha un gruppo ammonico quaternario ma è un sale cloridrato. L'anello biciclico si chiama chinuclidinico ed è come se fosse una piperidina in cui l'N in 1 e il carbonio in 4 sono stati congiunti da un ponte etilenico. Anche in questo caso vale la regola del 5. Anch'essa viene somministrata in forma di colliri.

Sulla base dell'ipotesi colinergica della patologia d'Alzheimer, gli agonisti muscarinici sono in fase di studio anche per le patologie del sistema nervoso centrale, quelle viste fino ad ora invece erano molecole che agivano perifericamente. Vediamo quindi perché i recettori muscarinici centrali sono di interesse nella neurodegenerazione che si verifica nell' Alzheimer.



Questa patologia non la si può trattare in modo semplicistico pensando che il semplice intervento sul recettore muscarinico possa essere risolutivo; ecco perché ad oggi non ci sono molecole che curano queste patologie, ma solo che ne rallentano la progressione. Nella maggior parte di queste patologie neurodegenerative concorrono tanti eventi patologici e molti di questi sono strettamente interconnessi tra di loro. Per intervenire sull'evento patologico, ad esempio la deposizione di Beta-amiloide nell'Alzheimer o di Alfa-sinucleina nel Parkinson, si usano anticorpi monoclonali che però danno dei risultati molto scarsi seppure blocchino la l'aggregazione e la deposizione di Beta amiloide, ma comunque non è risolutivo per la patologia.

Tanti sono gli eventi patologici che concorrono allo sviluppo della malattia come:

- **L'aggregazione delle proteine**, tipo la beta amiloide
- **La fosforilazione della proteina Tau** che dà origine a questi grovigli neurofibrillari
- **La disfunzione mitocondriale** con l'intervento di specie reattive all'ossigeno, cioè di ROS.
- **Un'elevata concentrazione di metalli**.

Tutti questi eventi concorrono alla morte neuronale, in particolare nel caso dell'Alzheimer alla morte dei neuroni colinergici nell'area della corteccia principale.

Studio dei recettori M1

Nel caso della patologia d'Alzheimer le uniche terapie, che non sono curative ma si chiamano palliative, sono caratterizzate da inibitori dell'acetilcolina esterasi, cioè si aumenta la concentrazione dell'acetilcolina. Questa poi va ad interagire con i recettori M1 prevalentemente presenti a livello centrale, ripristinando momentaneamente la trasmissione, anche se il neurone degenera comunque. Inoltre, la stimolazione del recettore M1 provoca tutta una cascata di eventi che non si riducono solo alla trasmissione colinergica, ma è strettamente correlato ad alcune delle altre determinanti patologiche affrontate prima, come ad esempio l'aggregazione proteica e soprattutto la fosforilazione della proteina Tau.

Nell'immagine dell'ipotesi colinergica già vista, si nota che a livello della corteccia avviene la trasmissione colinergica che attiva sia i recettori nicotinici che muscarinici del sottotipo prevalentemente M1. Del recettore nicotinico ne abbiamo già parlato e farmaci che agiscono in questo modo ancora non ne abbiamo, se non inibitori dell'acetilcolina esterasi. Per quanto riguarda gli M1 e M2:

- La localizzazione degli M1 è prevalentemente post-sinaptica quindi in questo caso si tratta di agonisti M1 per aumentare la trasmissione colinergica.

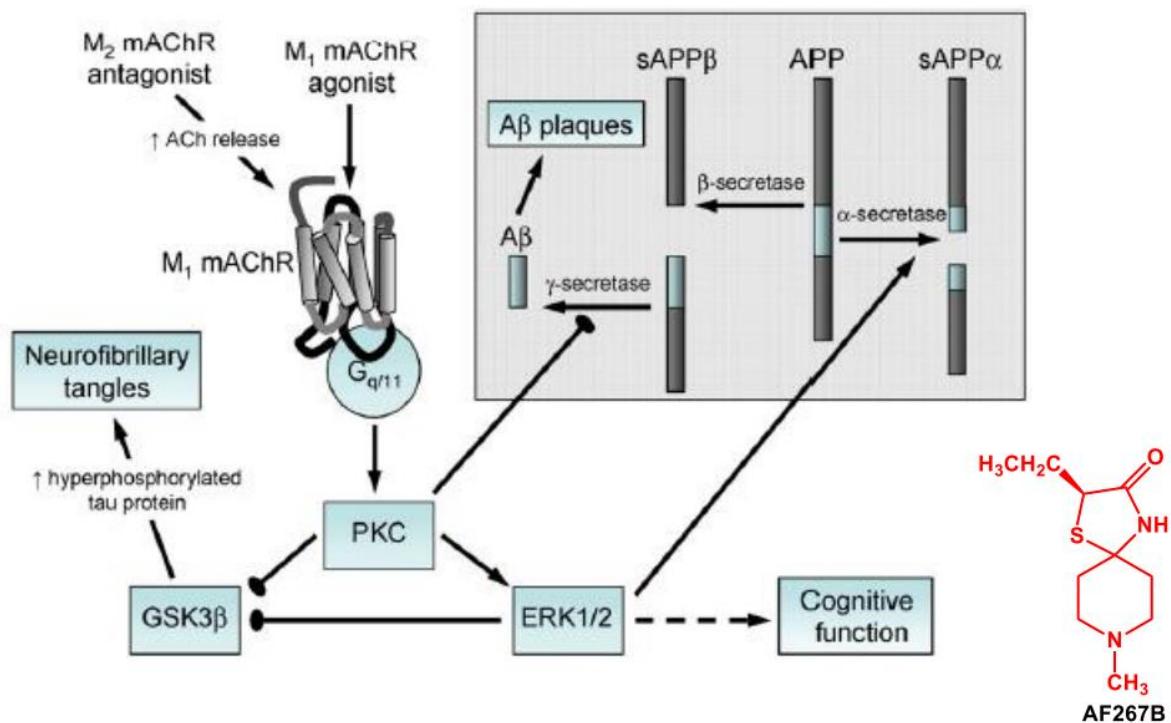
- Sulle fibre muscariniche è presente anche il recettore M2, che ha una localizzazione prevalentemente presinaptica e dà un effetto a feedback negativo, cioè, diminuisce la liberazione di acetilcolina.

Quindi se non si usa un agonista selettivo per i recettori M1, accade che si attivano anche i recettori M2 presinaptici. L'ideale è quindi avere un agonista M1 e contemporaneamente un antagonista M2, ecco perché la selettività è estremamente importante e ad oggi non c'è ancora una molecola ideale per raggiungere questo obiettivo.

Effetto dell'attivazione di M1 mAChR sulle componenti molecolari nella progressione dell'Alzheimer's disease.

Prima di procedere nella descrizione della figura specifichiamo che:

- La freccia con punta indica una stimolazione, attivazione di un percorso.
- Il segnale con un martelletto indica una via di inibizione di quel percorso.



Gli M1 sono **recettori accoppiati alla proteina Gq**, ed essa stimola, nella cascata delle chinasi, la **fosfochinasi C**. La stimolazione di queste fosfochinasi, in particolare della C, ha un effetto su due percorsi, sia quello amiloidogenico sia quello della fosforilazione della proteina Tau.

Percorso Amiloidogenico

Come tutte le proteine che si rispettano, anche la beta amiloide, che normalmente viene indicata B1 (40 - 42 residui) deriva da una proteina più grossa, cioè da una catena amminoacidica molto più grande che nel caso della beta amiloide viene chiamata proteina precursore dell'amiloide, che sta per **APP-alfa**. Per dare origine dalla APP-alfa alla beta amiloide, devono intervenire degli enzimi proteolitici che rompono questa proteina precursore in vari punti per portare al frammento della beta amiloide. Nel caso particolare della proteina precursore dell'amiloide ci sono 3 enzimi, che si chiamano **alfa, beta e gamma secretasi**.

- L'alfa secretasi agisce sulla proteina APP portando alla formazione di frammenti non amiloidogenici. Quindi diciamo che è la secretasi "buona".
- Mentre l'azione successiva prima della beta e poi della gamma secretasi, porta alla formazione del frammento amiloidogenico, cioè il frammento di aminoacidi che prima si aggrega in fibrille e poi queste si associano in placche di beta amiloide che precipitano e sono quelle che degenerano il neurone. La fosfochinasi C attivata dalla proteina Gq dal recettore M1, ha un effetto di inibizione sulla

gamma secretasi, e quindi sul secondo step di formazione della Beta amiloide. La fosfochinasi C non fa solo questo, ma determina anche la stimolazione di **ERK1/2** che ha un effetto di stimolazione positiva sulla alfa secretasi, cioè, sull'enzima che scinde la proteina precursore dell'amiloide nei frammenti non amiloidogenici; quindi, è coinvolta nella via di protezione.

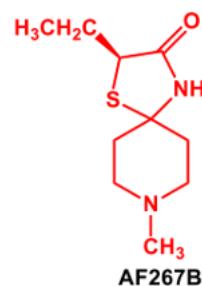
Fosforilazione della proteina Tau

Dall'altra parte la fosfochinasi C ha anche un effetto inibitorio nei confronti della attività della **GSK3beta**. Si tratta della **glicogeno sintasi chinasi**, GSK, che è una serina-treonina chinasi deputata alla fosforilazione di residui di serina presenti sulla proteina Tau. La fosforilazione della proteina Tau facilita la formazione dei grovigli neurofibrillari, ovvero l'altro importante evento che si ha nella patologia d'Alzheimer.

Quindi il recettore M1 è oggetto di studio non solo perché aumenta la trasmissione colinergica, ma anche perché attiva i due percorsi di inibizione dell'amiloidogenesi e della fosforilazione della proteina Tau. La ricerca per la patologia di Alzheimer è incentrata verso le chinasi coinvolte nella fosforilazione della proteina Tau e anche verso gli inibitori della beta secretasi e gamma secretasi, ovvero agli enzimi coinvolti nella formazione della via amiloide.

Data la grossa difficoltà che si ha nel trovare degli agonisti M1 selettivi a causa dell'elevata omologia strutturale degli M1 e degli M2, si cerca di intercettare i **siti di modulazione allosterica positiva** del recettore M1, cioè quelli che aumentano l'attivazione del recettore nel momento in cui interagisce con l'acetilcolina. Ad oggi si stanno iniziando a scoprire alcune molecole abbastanza selettive nei confronti del sito allosterico del recettore M1. Quindi la ricerca sta andando anche verso la direzione della scoperta degli agonisti allosterici che rappresentano una via di maggiore selettività rispetto a quella degli ortosterici.

Sulla destra è rappresentata una delle molecole in fase di studio, in quanto è un potente agonista allosterico del recettore M1. Si tratta di un lattame, un'ammide ciclica a struttura spiranica, poiché la giunzione degli anelli avviene attraverso un solo punto.



Usi terapeutici degli antagonisti muscarinici

Malattia di Alzheimer

Come abbiamo già detto per questa malattia, oltre all'uso di un agonista M1 si può pensare anche ad un antagonista M2 che blocca l'inibizione del presinaptico M2 sul rilascio di acetilcolina

Malattia di Parkinson

Fino ad una ventina di anni fa questi antagonisti colinergici muscarinici venivano usati per il Parkinson in modo più esteso, ora invece si sono scoperti dei farmaci che danno un minor numero di effetti collaterali su un anziano che presenta la patologia. Ad oggi questi antagonisti colinergici sono utilizzati per il **Parkinson iatrogeno**, cioè quello che si sviluppa in seguito all'uso degli antipsicotici e non si utilizzano più nel **Parkinson idiopatico**.

Il motoneurone è sotto il controllo di due neurotrasmettitori, ovvero l'acetilcolina e la dopamina. Nel Parkinson si osserva una degenerazione dopaminergica a livello psichiatrico. Quindi si manifestano discinesie, movimenti incontrollati, e rigidità muscolare dovuta ad una diminuzione del controllo inibitorio della dopamina. Si verifica uno sbilanciamento tra il controllo eccitatorio dell'acetilcolina e quello inibitorio della dopamina. Il primo intervento che si fa in caso di Parkinson è quindi la somministrazione di agonisti dopaminergici. Ma si potrebbe controllare anche con degli antagonisti muscarinici, solo che questi provocano vari effetti collaterali quali:

- Secchezza delle fauci
- Atonia intestinale e vescicale
- Inoltre, sono assolutamente controindicati nel glaucoma, infatti in questo caso si usano gli agonisti.

Fino a vent'anni fa venivano somministrati in associazione agli agonisti dopaminergici che attualmente sono anche dati in associazione con farmaci che agiscono sulla via dopaminergica con azione indiretta, che studieremo in futuro.

Gli antagonisti muscarinici sono ancora usati nel Parkinson indotto da farmaci. Questo si verifica in alcuni pazienti che devono assumere dosi elevate di antagonisti dopaminergici, cioè di antipsicotici per il controllo di malattie psichiatriche, soprattutto i farmaci di più vecchia generazione, in quanto sono i più attivi nei

confronti di queste patologie, tipo la clorpromazina. Essendo però antagonisti dopaminergici possono indurre Parkinson. Ovviamenete si tratta di un processo reversibile, in quanto non vanno a distruggere le fibre dopaminergiche, semplicemente diminuiscono la trasmissione dopaminergica. Quindi di norma o riducendo la terapia o usando un cocktail di farmaci per ridurre la concentrazione di un antipsicotico, questi effetti vengono un po' ridotti. Qualora queste patologie psichiatriche non si riescano a controllare, devono essere somministrati anche dei farmaci anticolinergici per il controllo del Parkinson indotto, e non si può somministrare un agonista dopaminergico in quanto sto dando un antagonista dopaminergico per il paziente psichiatrico. Quindi sono ormai confinati a questo utilizzo, e non più nel Parkinson idiopatico.

Ulcera

I recettori M1 e M3 sono a livello gastroenterico. Infatti, il primo antagonista muscarinico selettivo scoperto è la **pirenzepina**, che agisce come antiulcera per la localizzazione di questi recettori a livello delle cellule parietali e del ganglio del plesso mioenterico.

Secrezione ghiandolare

Sia i recettori M1 che M3 modulano la secrezione ghiandolare. Quindi gli antagonisti muscarinici sono degli **antisecretori**.

Patologie broncopolmonari

In particolare agiscono sull'asma, perché gli antagonisti muscarinici sono dei **broncodilatatori**. In genere sono usati in associazione con altri farmaci che studieremo nel sistema adrenergico, cioè di solito si somministrano degli antagonisti muscarinici insieme a degli agonisti Beta 2 adrenergici che danno lo stesso effetto.

Tono muscolare

I recettori M1 e soprattutto gli M3 si trovano a livello della muscolatura liscia intestinale e vescicale, quindi vengono usati come **antispastici**, ad esempio nelle coliche urinarie, nelle coliche biliari, in quelle epatiche o anche in presenza di diarrea dove è richiesta una diminuzione della motilità della muscolatura liscia intestinale.

Farmaci salvavita (uno degli usi più importanti)

In questo caso si usa l'atropina, nell'avvelenamento da organofosforici, gas nervini e da organoinsettici usati in agricoltura, che sono degli inibitori dell'acetilcolina esterasi. Questi aumentano l'acetilcolina e ciò può portare a convulsioni e paralisi respiratoria e quindi in questo caso si interviene con un antagonista muscarinico. Sono usati anche in presenza di **avvelenamento da funghi**: la muscarina è un alcaloide presente nell'*amanita muscaria*, e si interviene con un antagonista muscarinico.

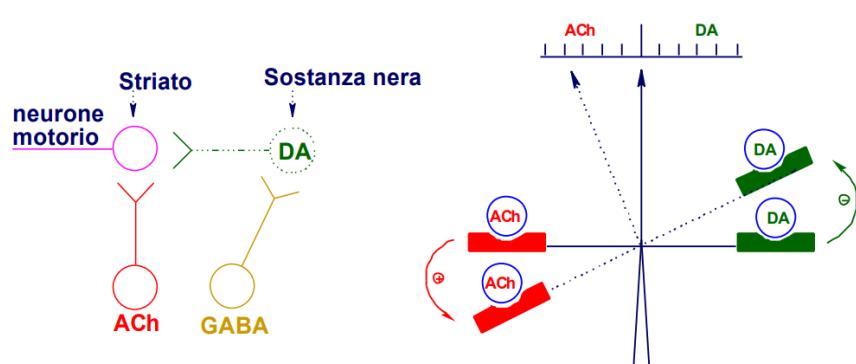
Bradicardia sinusale

In realtà non si usano per questa patologia nella maggior parte dei casi. Il recettore M2 è a livello del cuore dove esercita effetto inotropo e cronotropo negativi, ed è evidente che in questo caso bisogna somministrare un antagonista muscarinico, per aumentare la forza di contrazione del cuore. Invece, in terapia normalmente si somministrano, B1 adrenergici tipo adrenalina o noradrenalina.

Nello specifico della malattia di Parkinson

Il motoneurone è sotto il controllo sia delle fibre dopaminergiche che colinergiche. Le fibre dopaminergiche che hanno il corpo cellulare nella sostanza nigra proiettano verso lo striato e hanno un effetto inibitorio sul motoneurone, mentre le fibre colinergiche hanno un effetto eccitatorio. Nel Parkinson avviene una degenerazione delle fibre dopaminergiche per cui il controllo inibitorio sul motoneurone viene a mancare, provocando gli effetti motori classici del Parkinson. Quindi si ha uno sbilanciamento a favore del controllo colinergico eccitatorio, che deve essere riportato in equilibrio o tramite agonisti dopaminergici o tramite antagonisti colinergici. In tutti e due i casi bisogna avere a che fare con delle molecole che devono

• malattia di Parkinson



attraversare la barriera ematoencefalica; quindi, devono essere molecole abbastanza lipofile o comunque essere trasportate da un trasportatore che arrivi a livello centrale perché altrimenti l'effetto terapeutico non sarebbe possibile.

Nello specifico dell'ulcera

Nell'ulcera si hanno due effetti principali a carico del muscarinico.

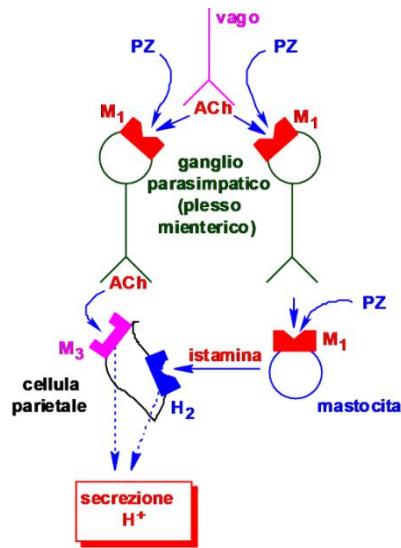
Per prima cosa **l'innervazione vagale del ganglio del plesso mioenterico** dove sono principalmente presenti i recettori M₁. La pirenzepina, che agisce come antagonista del recettore M₁, è stata usata per tanto tempo in terapia proprio come agente antiulcera. Questo perché innanzitutto blocca i recettori a livello del ganglio del plesso mioenterico e di conseguenza anche le **fibre postgangliari** che vanno ad innervare da un lato i **mastociti**, che sono quelli deputati alla liberazione di **istamina** e dall'altro le cellule parietali. Sui mastociti sono principalmente presenti recettori M₁ che attivati danno origine alla liberazione di istamina. Sulle cellule parietali invece sono principalmente presenti recettori M₃, per quanto riguarda il muscarinico. Però il ruolo più importante è svolto dai **recettori H₂ istaminergici**: infatti, sia il controllo della liberazione di istamina che a sua volta stimola la produzione di **acido cloridrico** da parte delle cellule parietali, che il controllo del ganglio del plesso mioenterico sono coinvolti nella diminuzione della secrezione di acido cloridrico.

I farmaci usati nel controllo dell'ulcera sono attualmente 2 (più che la pirenzepina che è stata abbandonata)

- **gli antagonisti H₂** che agiscono direttamente sui recettori H₂ istaminergici che stimolano la produzione di HCl
- **gli inibitori della pompa protonica**, che è sotto il controllo dell'istamina stessa, dell'acetilcolina e delle prostaglandine.

Quindi gli M₁ possono bloccare sia la via di trasmissione postgangliare che quella della liberazione di istamina.

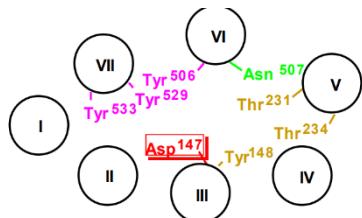
• Ulcera



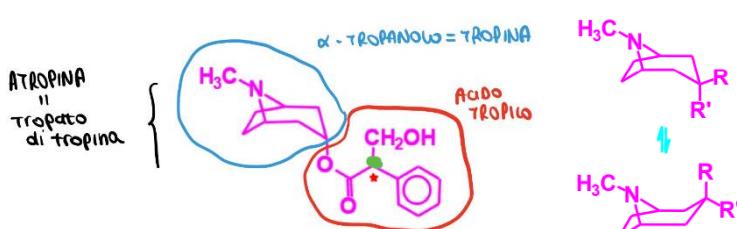
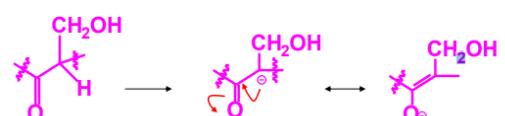
Riprendiamo e concludiamo il discorso avviato nella scorsa lezione sulla bradicardia sinusale, patologia caratterizzata da un effetto bradicardico, esercitato dal sistema parasimpatico, e tachicardico dal sistema adrenergico. In seguito a bradicardia sinusale è necessario riportare l'effetto cronotropo cardiaco a livelli fisiologici, per cui bisogna intervenire utilizzando antagonisti muscarinici selettivi per il recettore M2. In realtà i farmaci che si usano per la bradicardia sinusale, sono quelli che agiscono come agonisti adrenergici per il recettore β_1 , che è quello localizzato sulla muscolatura cardiaca.

A questo punto ci chiediamo: Cosa è necessario fare per avere un'interazione che porta ad un antagonismo muscarinico?

Il passaggio da agonista muscarinico ad antagonista, si può avere andando ad ingombrare la molecola di agonista, quindi andando ad inserire dei gruppi, solitamente aromatici, i quali danno delle interazioni addittive con il recettore. Normalmente, infatti, la costante di dissociazione, che per gli agonisti muscarinici si aggira intorno a 10^{-7} , per gli antagonisti, essendoci delle interazioni accessorie, sarà più piccola, per cui sarà maggiore l'affinità per il recettore. Quello che si è visto, andando a fare delle mutazioni sito-dirette sul recettore muscarinico (ovvero andando a mutare, sul recettore, degli amminoacidi che si pensa possano essere critici per l'interazione, come l'aspartato 147, importante per l'interazione con la testa cationica) è che nel sesto dominio transmembrana è fondamentale un residuo di Asparagina per l'attività antagonista (nel caso del recettore M3 è un'asparagina 507); se questa venisse mutata, comporterebbe la perdita dell'attività antagonista. Per il passaggio da agonista ad antagonista, la natura ci è venuta in aiuto perché i prototipi di questa classe di antagonisti competitivi ma non selettivi, sono degli **alcaloidi naturali** caratterizzati da un azabiciclo metilato, il cui gruppo OH esterifica l'acido tropico.



Atropina: è il prototipo vero e proprio di questa classe di antagonisti. È un alcaloide naturale che si estrae dall'Atropa Belladonna e strutturalmente è formato da acido tropico, esterificato con α -tropanolo, amminoalcol con gruppo OH in posizione α , che può essere chiamato anche "tropina". L'atropina è quindi un estere definito "tropato di tropina". Quando invece dell'OH in α , l'OH è in β , questo amminoalcol prende il nome di β -tropanolo o pseudotropina. L'Atropina viene anche definita (\pm)iosciamina, per cui è un racemo, è una miscela equimolare della S-iosciamina e della R+iosciamina, però nella pianta non è presente Atropina in forma racemica ma è presente l'enantiomero S, per cui per estrarre l'alcaloide dalla pianta si va prima a basificare e in ambiente basico l'atomo di H benzilico acido (in verde), viene strappato, formando un intermedio planare, successivamente si va ad acidificare e a questo punto l'H può legarsi nuovamente da entrambi i lati, dando origine al racemo.



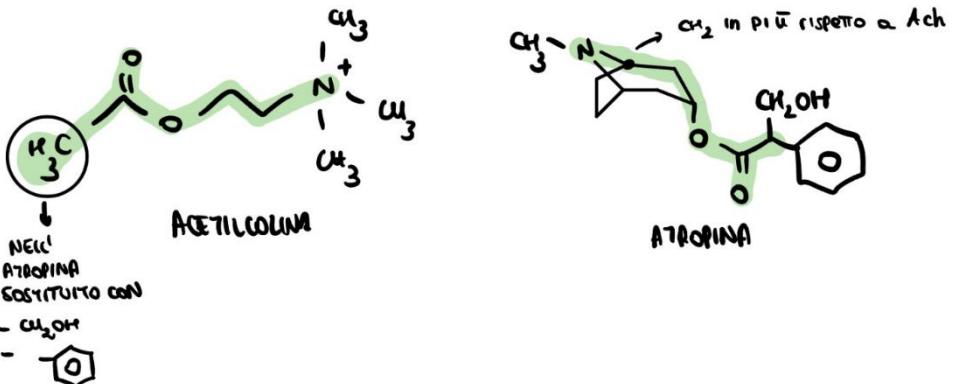
sedia, ovviamente la più stabile è quella a sedia.

Possiamo dire che nel processo di estrazione in realtà si ha la racemizzazione dell'atropina. L'atropina può essere utilizzata come racemo perché l'azione dei due enantiomeri non è tanto differente. Il biciclo si può trovare sia nella conformazione a sedia sia in quella a

Si può notare che l'atropina è una complicazione molecolare dell'acetilcolina; infatti, nell'atropina si è mantenuto lo scheletro dell'acetilcolina e lo si è modificato andando ad ingombrare:

- il CH₃ dell'acetilcolina, con un fenile e un gruppo idrossimetilico.
- L'N, inserendo la catena flessibile dell'acetilcolina all'interno di un anello rigido (anello metil pirrolidinico)

Si sono mantenuti invece il gruppo estereo e la catena di C che divide l'atomo di N dal gruppo estereo. La distanza tra O estereo e N è la stessa sia per acetilcolina, sia per atropina, nonostante in atropina ci sia un CH₂ in più, ma essendo all'interno di un ciclo le distanze sono inferiori. Si è mantenuta quindi la distanza tra i due gruppi farmacoforici.



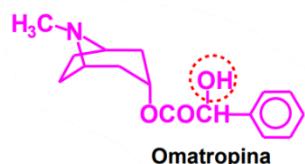
L'atropina è una base terziaria, è abbastanza lipofila da attraversare la barriera ematoencefalica, per cui ha anche un'azione centrale ed è utilizzata come antidoto nell'intossicazione da metalli organofosforici o gas nervini, poiché riesce a contrastare gli effetti tossici di queste sostanze. L'eccesso di acetilcolina, che si ha con gli organofosforici perché inibitori dell'acetilcolinesterasi, deve essere contrastato non solo perifericamente ma anche centralmente, e questo è possibile grazie all'atropina. È necessario contrastare l'eccesso di acetilcolina perifericamente perché potrebbe portare a paralisi respiratoria, ma anche centralmente perché potrebbe portare a convulsioni. Vanno contrastati ambedue i siti, centrale e periferico.

Modifiche sull' atomo di N dell'α-tropanolo di atropina e derivati:

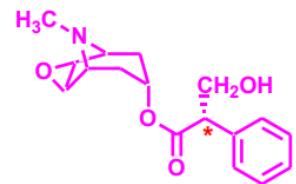
- **Quaternarizzazione dell'atomo di N dell'anello di α-propanolo:** grazie a tale modifica si ottengono delle molecole che raggiungono la periferia, perché portando la carica positiva ed essendo più ingombrate non riescono ad oltrepassare la barriera ematoencefalica, ma viene mantenuta l'attività colinergica (questo non è scontato). Questo approccio è vincente quando si vuole mantenere l'attività colinergica ed evitare effetti centrali. Questa è stata la strategia utilizzata per ottenere farmaci che agiscono a livello periferico, come broncodilatatori per asma, antispastici, farmaci per il controllo dell'incontinenza urinaria e ipermobilità gastrica. È possibile modulare il distretto che viene raggiunto da atropina e derivati, modificandone le caratteristiche dell'atomo di N.

È possibile inserire qualsiasi gruppo sull'N? È possibile inserire gruppi di dimensioni non maggiori dell'isopropile, quindi metile ed etile.

- **Ossidazione dell'N a formare N-ossido:** è possibile fare questa modifica, l'attività rimane ma non esistono farmaci di questo tipo, poiché in vivo l'N-ossido viene ripristinato ad atomo di N terziario.
- **Sostituzione del gruppo idrossimetilico con gruppo OH:** trasformazione dell'estere dell'acido tropico in estere dell'acido mandelico (se viene fatta ad atropina otteniamo l'**omatropina**). Questa modifica è stata fatta per ottenere farmaci con una durata d'azione inferiore, utile soprattutto per quei farmaci che hanno azione midriatica, utilizzati per l'analisi del fondo oculare; in questo caso è desiderata una durata d'azione più breve per evitare che la pupilla rimanga per troppo tempo dilatata e offuschi la vista.

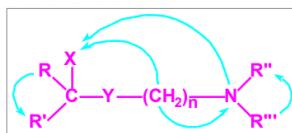


Scopolamina: analogo dell'atropina, presenta un azabaciclico con gruppo epossido. Anche in questo caso la scopolamina rappresenta una miscela racemica di S(-) e R(+)ioscina, ma in natura si trova sottoforma di S(-)-ioscina. Anch'essa come l'atropina, racemizza nel processo di estrazione. Agisce anche come antistaminico, azione amplificata andando a fare delle opportune sostituzioni sulla molecola, ma anche come anticinetosico, contro il mal di movimento, per chi soffre di mal d'auto, mal di mare, perché controlla il centro della nausea.



È importante notare come in atropina, scopolamina e omatropina, legato al C benzilico troviamo o un gruppo OH o un gruppo idrossimetilico, comunque un gruppo in grado di dare interazioni a H.

L'atropina è stato il punto di partenza per lo studio delle SAR per avere attività antagonista muscarinica. È una molecola che ha quindi una struttura generale comune sia agli anticolinergici, sia agli antistaminici, per cui è necessario vedere le differenze tra le due classi, per capire come si è potuto separare l'attività dell'una e dell'altra. Vediamo la struttura generale



Y = O, COO, CH₂

n = 2, 3 (1 se Y = CH₂)

R, R₁ = gruppi ciclici alifatici e/o aromatici

X = H, OH, CONH₂

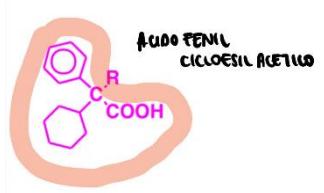
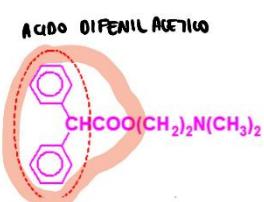
R₂, R₃ = gruppi alchilici (o ciclici, come pirrolidina o piperidina)

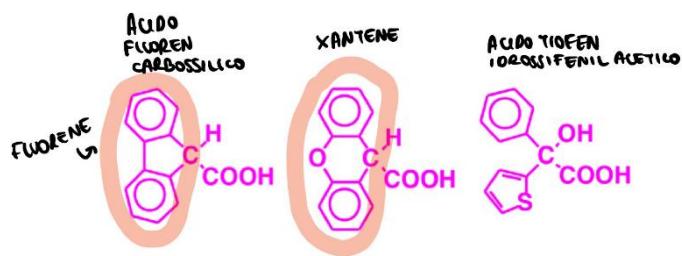
Se R ≠ R₁ si ha forte stereoselettività!

- **N terziario:** l'atomo di N è terziario, nel caso degli anticolinergici può essere quaternarizzato, nel caso degli antistaminici ciò non è possibile, soprattutto perché la modifica degli antistaminici sposterebbe l'attività verso il colinergico, facendo aumentare gli effetti collaterali indesiderati. L'atomo di N può anche essere inserito in un ciclo, normalmente è un ciclo piperidinico o pirrolidinico.
- **Gruppi R e R':** per gli anticolinergici R e R' possono essere anelli aromatici, eteroaromatici ma anche alifatici e in particolare sono preferibili i cicli alifatici e possono essere entrambi aromatici, entrambi eteroaromatici, uno alifatico e uno aromatico o entrambi alifatici. Per gli antistaminici i due sostituenti devono essere aromatici, l'unica sostituzione possibile può avvenire con una piridina, ma normalmente sono anelli benzenici. Questi due gruppi possono anche essere inseriti in un triciclo (fluorene o xantene), questo può avvenire sia per i colinergici ma anche per gli istaminergici. La distanza ideale tra l'atomo di N e il C che porta gli anelli aromatici, è di 2-3 metileni (come quella presente anche nell'atropina). Gli anelli aromatici come sostituenti non possono mai essere sequenziali, ma devono essere legati allo stesso atomo di C; se fossero in sequenza si creerebbe un ingombro sterico non accettato dal recettore. L'anello aromatico può essere aperto, ma deve avere una lunghezza tale da potersi ripiegare, in modo tale da mimare un anello, quindi una catena alchilica lineare, purché sia flessibile, può accomodarsi e alloggiarsi sul recettore come un cicloesile.
- **X:** è normalmente un gruppo in grado di dare legami a H (OH, CH₂OH, CONH₂) e qualora in quella posizione non ci sia un gruppo OH (molto raro) deve esserci assolutamente un gruppo estereo in catena laterale, in modo da avere sempre un carbonile in grado di dare dei legami a H. Se manca il gruppo OH, Y deve essere necessariamente un C=O.

Tra i derivati con questa struttura di base, troviamo:

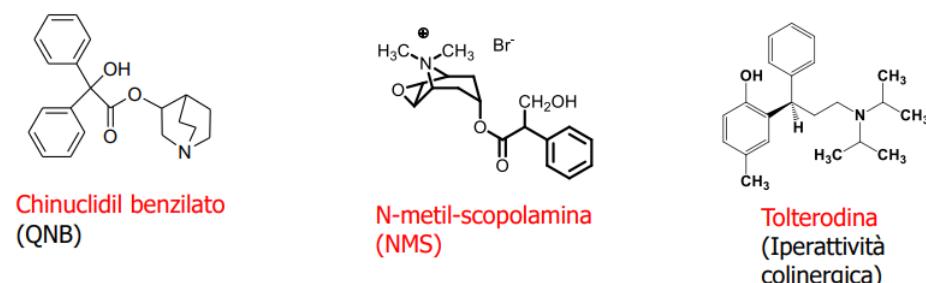
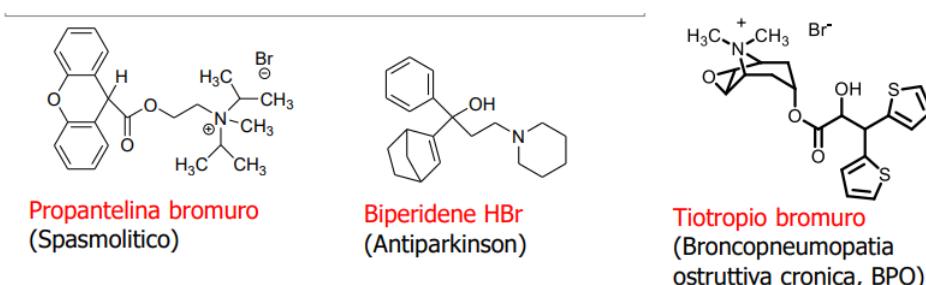
- Derivati dell'acido difenilacetico
- Derivati dell'acido fenilcicloesilacetico
- Derivato dell'acido fluorencarbossilico
- Derivati xantenici
- Derivati dell'acido tiofen idrossifenil acetico





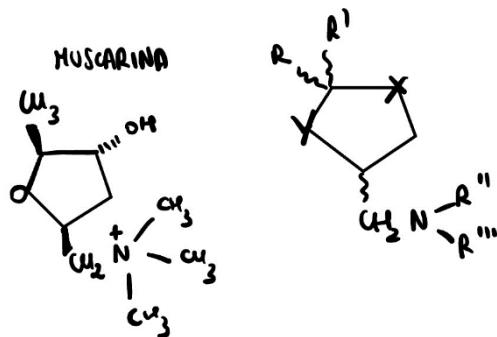
Derivati sintetici:

- **Propantelina bromuro:** è uno spasmolitico, ha un'azione periferica, per cui si realizza una quaternarizzazione dell'atomo di N, in modo da avere la perdita dell'attività centrale. È un derivato xantenico, ha gruppo estereo e N quaternario legato ad un metile e due isopropili.
- **Tiotropio bromuro:** derivato della scopolamina, è caratterizzato dall'OH e da due gruppi tiofenici (bioisosteri dei fenili) legati all'atomo di C. L'atomo di N è quaternarizzato perché deve avere un'azione periferica a livello del tratto broncorespiratorio; infatti, questa molecola è utilizzata come broncodilatatore nell'asma e nella broncopneumopatia ostruttiva cronica. Normalmente vi vengono associati agonisti β_2 adrenergici che svolgono un effetto broncodilatatore; non viene mai somministrato un unico farmaco, ma per evitare la desensitizzazione dei recettori, si utilizza un cocktail di farmaci che agiscono su due sistemi diversi: i β_2 adrenergici e gli antagonisti muscarinici.
- **Biperidene HBr:** è un farmaco utilizzato per il Parkinson iatrogeno, quel tipo di patologia che si sviluppa come effetto collaterale di alte dosi di antidopaminergici; è un farmaco che deve arrivare a livello centrale, quindi, ha una maggiore lipofilia; manca l'estere ma per compensare questa perdita c'è un gruppo OH al suo posto, in grado di dare legami a H. In generale però molecole utilizzate per il Parkinson devono essere molto lipofile per poter attraversare la BEE e la loro lipofilia è data dalla presenza di tricicli, mancanza di quaternarizzazione, mancanza del gruppo estereo (vedi metixene, bipiridene).
- **Tolterodina:** il gruppo OH non si trova sulla catena, nella sua classica posizione, ma si trova come sostituente dell'anello aromatico. Utilizzata per incontinenza urinaria.
- **Chinuclidil benzilato:** ha l'anello chinuclidinico (già visto anche per gli agonisti), attraversa bene la barriera ematoencefalica.
- **N-metil-scopolamina:** rappresenta la quaternarizzazione della scopolamina. Assieme al chinuclidil benzilato, è uno dei ligandi triziati maggiormente utilizzato negli studi di binding sui recettori muscarinici. Più che farmaci, questi ultimi due, sono tools farmacologici.



Le stesse modifiche che si sono apportate alla molecola dell'acetilcolina andando ad ingombrare la struttura, applicate alla muscarina, portano ad antagonismo muscarinico?

Si, la muscarina è l'analogo rigido dell'acetilcolina e può essere modificata per dare attività antagonista muscarinica. A partire dalla muscarina, si è notata negli antagonisti muscarinici l'importanza del diossolano come anello centrale, in cui X= O e Y= O. D'altra parte l'ossigeno X, mima esattamente il gruppo OH che ho nella muscarina, cioè rappresenta un accettore di legami a H. Anche in questo caso R e R' possono essere 2 anelli aromatici, un anello aromatico e un cicloesile o due ciclosili, come abbiamo visto per i derivati non ciclici. Anche in questo caso l'atomo di N può essere quaternarizzato e R'' e R''' possono essere metili o etili fino ad arrivare ad isopropili, quindi valgono le stesse SAR anche su questi derivati ciclici.



Antagonisti muscarinici selettivi

M1 selettivi

Pirenzepina : si caratterizza da un anello triciclico chiamato Piridobenzodiazepinone.

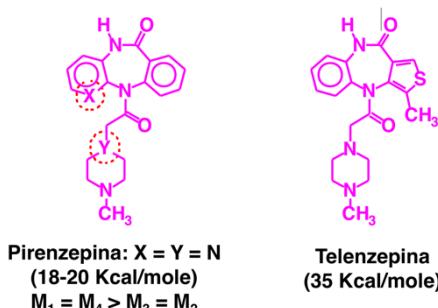
Pirido= piridina (la x è un N)

Benzo= benzene

Diazepin= diazepina (ciclo a 7 con 2 N)

One= carbonile chetonico attaccato alla diazepina

Legato all'N si ha una catena legata con un gruppo ammidico ad un anello azotato che è una metil piperazina (Y è un N).

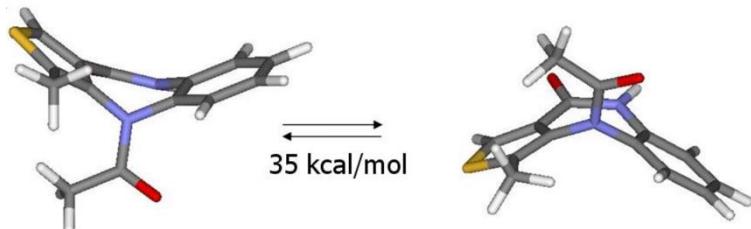


Questa molecola ha portato a dividere i recettori muscarinici in due classi: M1 e M2; con le scoperte future si notò che con gli M2 non c'era omogeneità nella classe, infatti sono stati riclassificati in M2 e M3, ma poi furono scoperti anche gli M4 e gli M5. La pirenzepina è vero che da un lato è più selettiva per gli M1 rispetto che degli M2 e M3, ma ha anche un'affinità per il recettore M4. È stata usata in terapia come antiulcera per gli effetti che l'M1 ha a livello mastocitario ed è caratterizzata da elementi che sono fondamentali per l'interazione con il recettore muscarinico; l'azoto che si protona a pH fisiologico (che è l'azoto 4 della piperazina, è il più basico perché risente dell'effetto del CO legato al metile).

18-20 Kcal/mole sta ad indicare che l'anello triciclico (6-7-6) si può trovare in forma ripiegata a butterfly; le due forme sono interconvertibili a T ambiente dato che l'energia è bassa per il ripiegamento, e quindi non si possono separare.

Telenzepina: Un analogo che ha gli stessi effetti e la stessa selettività per il recettore M1 è la telenzepina, che al posto di uno degli anelli aromatici ha un metiltiolfene. e non è interconvertibile perché si crea ingombro sterico per la presenza del metile, e infatti ha un'energia maggiore.

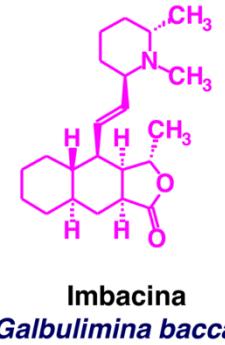
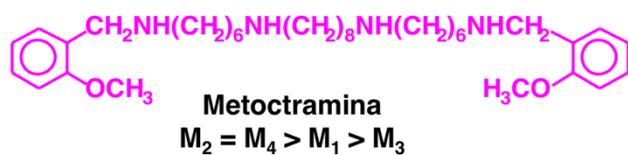
La pirenzepina è servita a capire dove sono le aree di interazione dell'azoto protonato a pH fisiologico.



Su queste molecole sono stati fatti tanti studi di SAR, di modellistica molecolare e si è visto che per avere la selettività per i recettori M1 è importante che l'N protonato si trovi in questa area (y). Sono state individuate in particolare 3 aree: una favorevole per l'M1, una per l'M2 e una per l'M3. Da qui sono sorti degli studi portati avanti da ricercatori tedeschi che hanno modificato la molecola di pirenzepina deducendo che quando l'atomo di N che si protona a pH fisiologico si trova in una posizione diversa da quella fissa ciclica che si ha nelle molecole pirenzepina e telenzepina, si modifica la selettività delle molecole e si passa da selettività M1 a M2.

M2 selettivi

Antagonisti muscarinici (SAR: M₂ selettivi)



Si è portato l'atomo di azoto della pirenzepina al di fuori dell'anello e ha portato a questi derivati. Hanno mantenuto inalterata tutta la struttura, ma hanno inserito una catena laterale sulla piperidina e hanno posizionato l'azoto fuori dal ciclo in una catena maggiormente flessibile. In questo caso l'azoto ha la possibilità di raggiungere un sito più favorevole per l'M2. Mentre la pirenzepina è più selettiva per l'M1, questa molecola modificata è più selettiva per l'M2.

Questa classe prevede molecole a struttura poliamminica: Metocramina e triptamina, che sono tetraammine.

Metocetamina ha una selettività M2, ha un pA2 intorno a 10^{-8} , quindi potente, ed è un antagonista competitivo anche per M4, minore per M1 e M3.

Nella **tripitramina** si è fatto un ibrido strutturale tra metocetamina e pirenzepina, introducendo sugli atomi di azoto terminali della metocetamina il triciclo della pirenzepina. Questa molecola è l'antagonista M2 competitivo più potente conosciuto, non è un farmaco ma è usato per gli studi recettoriali (pA2 fra 9 e 10). L'**imbacina** è un alcaloide di origine naturale estratta dalla Galbulimina baccata, la quale ha un gruppo lattonico quindi una stabilità metabolica bassa e si caratterizza da un triciclo legato con una catena a 3 C con un N basico che si protona a pH fisiologico. È un antagonista competitivo che ha una selettività maggiore nei confronti di M2.

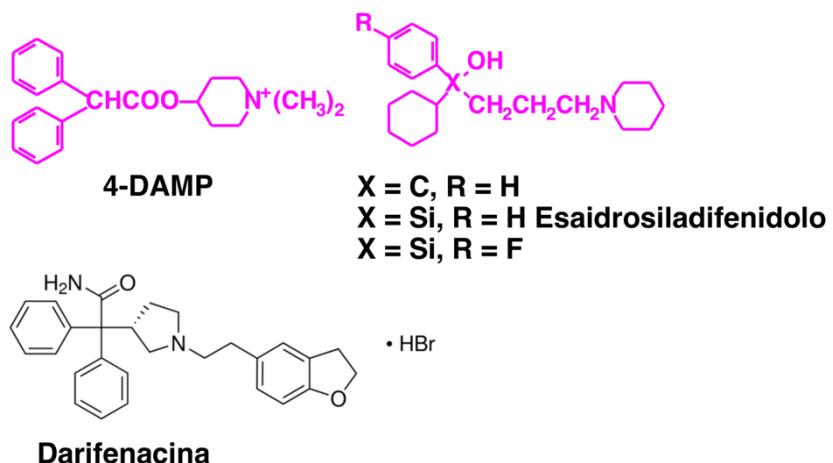
La **gallamina** era anche un antagonista non competitivo del recettore nicotinico muscolare, con azione miorilassante negli interventi chirurgici (curarosimile) ma è anche un antagonista competitivo dei recettori muscarinici M2.

M3 selettivi

Il prototipo per la classe M3 è 4-DAMP che ha le caratteristiche classiche della struttura generale ma per renderlo selettivo nei confronti di M3 si è sostituito ad un atomo di carbonio un atomo di silicio (più elettropositivo) e sostituendo ai due anelli aromatici un ciclosile ottenendo

Esaidrosiladifenidolo. Su questa molecola è stato fatto un derivato sostituendo un H con un F ottenendo il **fluoro**

Esaidrosiladifenidolo. Le molecole non presentano gruppo estereo ma hanno un OH per dare legami ad H; entrambi sono Antagonisti M3 selettivo. Da questi studi nasce l'antagonista M3 più selettivo ovvero la Darifenacina.



Darifenacina: è il più selettivo per gli M3, presenta tutte le caratteristiche appena descritte a parte l'inserimento di una catena sull'atomo N un po' più ingombrante; l'ammide può dare legami a H, poi c'è una lunga catena che termina con un anello benzodiidrofuranico. La distanza ottimale tra N e i 2 anelli aromatici è di 3 atomi di C. La Darifenacina è un farmaco usato nell'incontinenza urinaria.

Aspetti sintetici: per fare esterificazione si può usare:

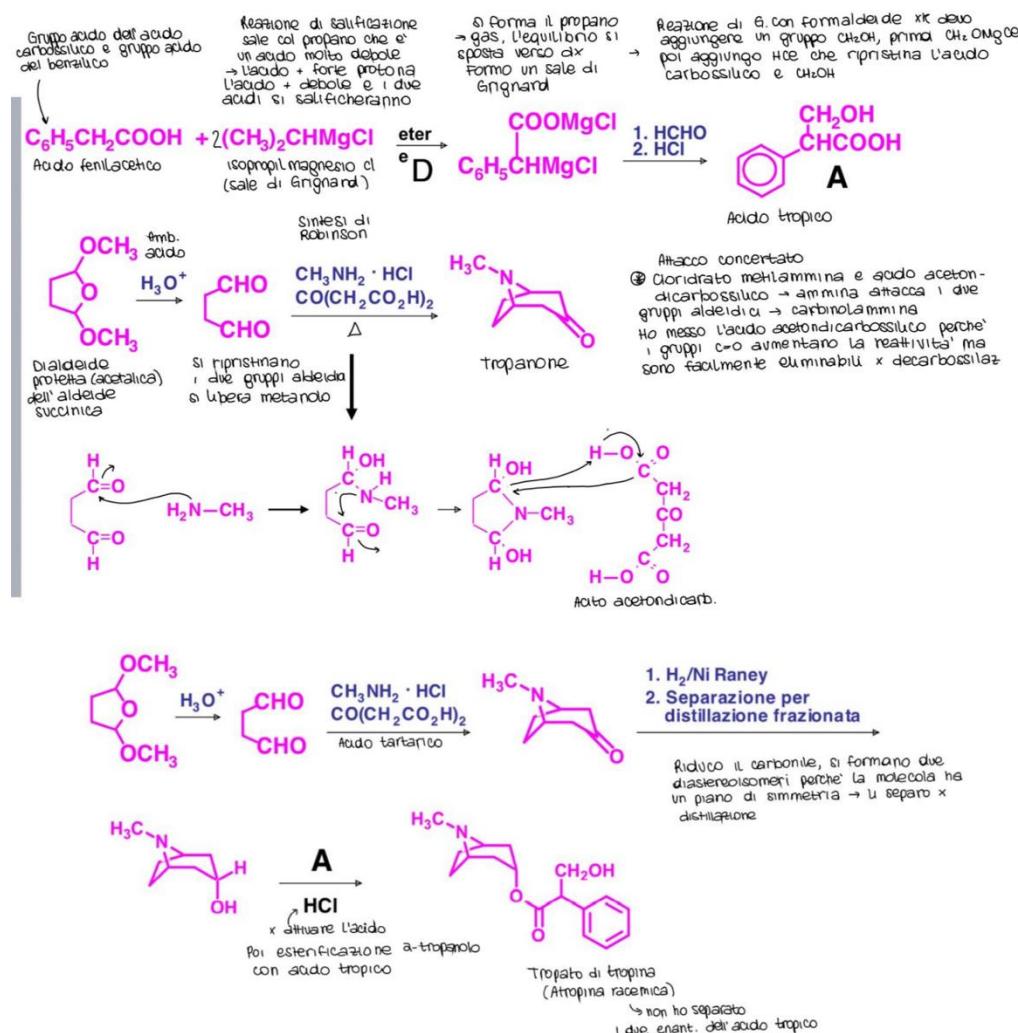
Una transesterificazione facendo reagire con un'altro estere.

Cloruro acilico + amminoalcol (in tal caso).

Sale sodico dell'acido e si fa reagire con l'ammino-alogenuro alchilico in forma di cloridrato.

(Non importa saperle tutte, l'importante è saperne 3/4 ma che rappresentino correttamente le relazioni struttura attività di cui abbiamo parlato)

Sintesi atropina



L'atropina oggi viene sintetizzata, non viene estratta dalla pianta. Essa è costituita dall'alpha propanolo, dall'acido tropico e alla fine si esterificano i 2 sintoni.

Bisogna in primis costruire l'intermedio che è il propanone, ovvero l'amminochetone precursore del propanolo.

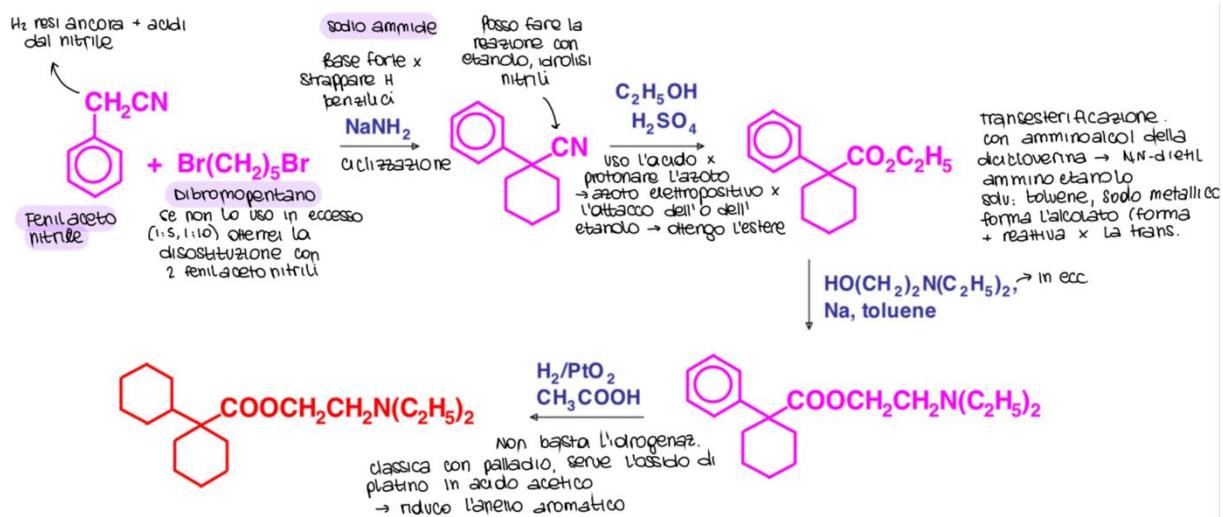
- 1) Si parte dall'acido fenilacetico, bisogna modificarlo in modo da ottenere un reattivo di Grignard, perché bisogna inserire il gruppo CH₂OH. La prima reazione è una reazione di salificazione con due moli di isopropil-magnesio cloruro. Questa reazione si fa a caldo in etere, in etere così precipita il sale desiderato. Nell'acido fenilacetico ci sono 2 gruppi acidi: l'H dell'acido carbossilico e l'H del CH₂ benzilico che è reso ancora più acido dalla presenza del gruppo elettron attrattore COOH. Quando si tratta con isopropil magnesio cloruro si forma il sale dell'acido più forte: si salificano i 2 gruppi acidi dell'acido fenil acetico e per trasferimento dell'H⁺ sul isopropil magnesio cloruro si forma il propano, un gas volatile, acido debolissimo, e l'equilibrio è completamente spostato a destra perché il gas viene eliminato dall'ambiente di reazione; si forma così un reattivo di Grignard. L'etere facilita la precipitazione e si può filtrare e isolare. La reazione è quantitativa e il propano viene allontanato.
- 2) Si fa poi una reazione di Grignard con formaldeide perché si deve aggiungere il gruppo CH₂OH; si formerà CH₂OMgCl. Si tratta in ambiente acido con HCl in un secondo momento, perché se si aggiungesse HCl insieme alla formaldeide si riformerebbe il sale che ritorna all'acido fenil acetico. L'aggiunta di HCl trasforma il CH₂OMgCl in CH₂OH con formazione di acido tropico.
- 3) Si deve ora formare il tropanone: la **reazione di Robinson** parte dall'aldeide succinica che è instabile, motivo per cui si deve formare in situ partendo dal 2-5 dimetossi-THF, forma acetalica con il metanolo della succinaldeide. In ambiente acido si forma la succinaldeide e si libera metanolo. La succinaldeide si fa reagire con la metilammmina in forma di cloridrato (si usa il cloridrato perché altrimenti la metilammmina

sarebbe troppo volatile). Si fa una reazione unica: non si mette prima la metilammina cloridrato e poi l'acetondicarbossilico ma la reazione di Robinson è one pot; dalla reazione si ottiene il propanone. La reazione prevede un doppio attacco del gruppo amminico sui gruppi aldeidici della succinaldeide ottenendo una di-carbinolammina. La di-carbinolammina reagisce con i gruppi CH₂ dell'acido acetondicarbossilico perché i gruppi carbossilici rendono più reattivi i CH₂. Si potrebbe pensare di chiudere questo ciclo con acetone ma risulterebbe poco reattivo per cui si usa l'acido acetondicarbossilico, che ha i CH₂ più reattivi per via dell'effetto elettron-atrattore del COOH, che decarbossilano a caldo (quindi più facilmente eliminabili). Si ottiene così il tropanone. C'è bisogno dell'alcol però, non del chetone, motivo per cui si riduce il CO con idrogenazione che porta a 2 isomeri: alpha tropanolo o tropina e al beta-tropanolo o pseudotropina. Le molecole non sono 2 enantiomeri ma due isomeri strutturali; infatti, le molecole hanno un piano di simmetria, motivo per cui posso separare per distillazione frazionata.

Si ottiene il tropato di tropina, ovvero l'atropina in forma di racemo, perché non sono stati separati gli enantiomeri dell'acido tropico. Si possono separare attraverso sali diastereoisomeri che si formano a partire dall'acido tartarico, i 2 sali hanno caratteristiche diverse: uno precipita e uno rimane in soluzione. Dopo di che si filtra il sale, si cristallizza più volte fino ad ottenere potere rotatorio costante, poi si libera la base dal sale, si basifica e si estrae.

Digressione sulla parte generale: quando si hanno due enantiomeri di cui uno molto più attivo dell'altro, quello più attivo si chiama entomero, quello meno attivo distomero.

Sintesi Dicicloverina



Si parte dal fenilacetonitrile dove i CH₂ benzilici sono resi ancora più sostituibili dal nitrile. In questa sintesi è molto importante la stechiometria perché il fenilacetonitrile ha la possibilità di avere la sostituzione in ambedue le parti andando a formare un dimero, conseguenza indesiderata; bisogna infatti effettuare una reazione di ciclizzazione in maniera tale da creare un ciclosile.

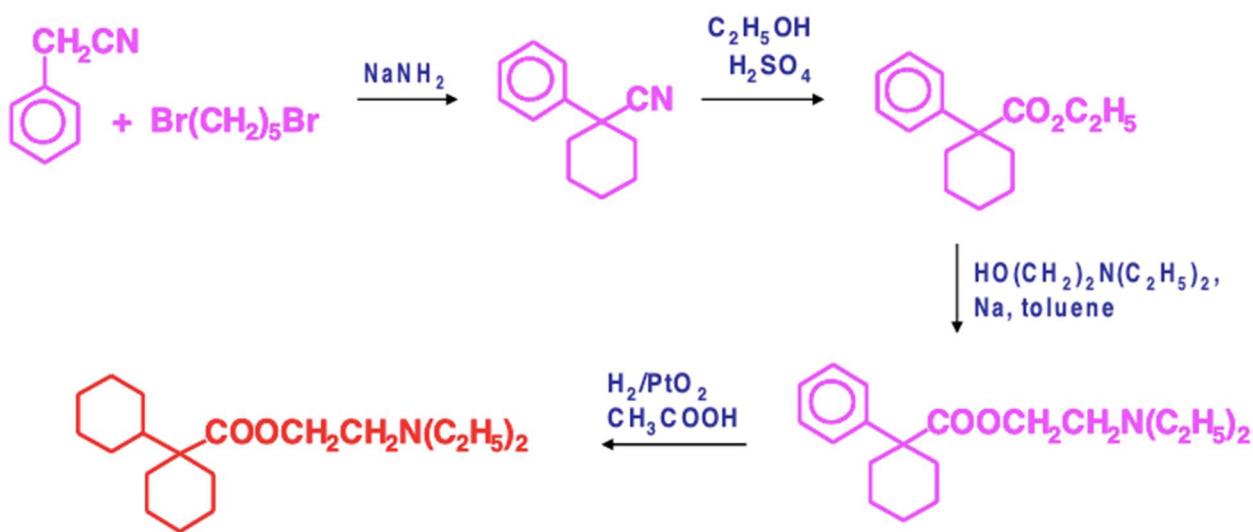
- Per ottenere la ciclizzazione al posto della dimerizzazione si usa come reattivo la sodioammide (base forte) per strappare i 2 protoni benzilici del fenilacetonitrile, e si lavora in eccesso di dibromo pentano e in difetto di fenilacetonitrile, altrimenti si avrebbe la sostituzione sui 2 C legati all'alogenuro e si avrebbe la dimerizzazione. Con la sodioammide si stacca il secondo e si ha la seconda sostituzione con chiusura del ciclosile. Il nitrile è comodo per 2 motivi: attiva i 2 CH₂ benzilici rendendoli più acidi, e inoltre il nitrile per idrolisi da origine ai derivati degli acidi carbossilici.
- Idrolisi acida dei nitrili: il solvente è l'etanolo, che permette di ottenere direttamente l'estere etilico. Quindi per reazione di idrolisi in ambiente acido (H₂SO₄) si ottiene il COOH che in presenza di etanolo esterifica (l'etanolo funge sia da solvente che da reattivo).

3. Avendo ottenuto un estere, si aggiunge l'amminoalcol (dietililetinolammina) e si fa una reazione di transesterificazione in ambiente basico per Na in toluene (il sodio è la base per formare l'alcolato). Esce etanolo e si forma l'ammino alcol che rappresenta la catena della dicicloverina.
4. La dicicloverina però presenta due anelli alifatici (due cicloesili), e qui si ha ancora un anello aromatico. Si fa quindi una riduzione catalitica con PtO₂ (ossido di platino) ottenendo così il secondo cicloesile.

Si riprende brevemente l'ultima sintesi affrontata, la **sintesi della dicicloverina**. Si sta parlando delle varie tipologie di antagonisti muscarinici ovvero, partendo dall'alcaloide naturale (atropina), passando per la dicicloverina (dove si ritrova il gruppo estereo), per il triesifenidile (contiene anche questo una funzione esterea, si userà la reazione di Grignard) e infine si vedrà una molecola che ha funzione ammidica (tropicamide).

SINTESI DI DICICLOVERINA

Si parte da una molecola con un gruppo aromatico, un anello benzilico (fenileacetonitrile). Il fenileacetonitrile è già stato visto nella sintesi dell'atracurio, dove era il punto di partenza per i due sintoni: da un lato il fenileacetonitrile veniva attaccato in ambiente acido per ottenere idrolisi del nitrile ad acido fenilacetico e dall'altro si poteva ridurre il nitrile con un'idrogenazione catalitica.



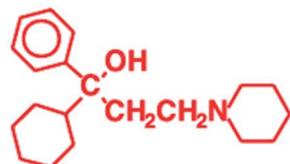
È necessario innanzitutto fare una reazione di idrolisi del nitrile sul fenileacetonitrile, che si fa anche in questo caso in ambiente acido (come già detto può avvenire sia in ambiente acido che in ambiente basico). Il fenileacetonitrile si tratta con una base forte, la sodioammide, poiché ha la possibilità di strappare i protoni benzilici perché sono resi ancora più acidi dalla presenza di un gruppo elettronattrattore: il nitrile serve quindi sia perché dalla sua idrolisi si ottiene l'estere desiderato sia perché rende più reattivo il gruppo benzilico. È necessario agire in modo tale da ottenere un solo prodotto (quello desiderato) e si può fare giocando sulla stechiometria della reazione. Se si lavora in eccesso di fenileacetonitrile il dialogenuro (dibromopentano) può attaccare le due estremità e quindi non si ottiene solo il composto desiderato. Per questo motivo, visto che l'obiettivo è ottenere un cicloesile, è necessario fare in modo che il fenileacetonitrile sia in difetto rispetto al reattivo: si lavora quindi in grande eccesso di dibromopentano o in grande difetto di fenileacetonitrile (è la stessa cosa), il rapporto è sempre 1:5/1:10. Alla fine della reazione poi sarà da recuperare.

Si ha quindi un primo attacco solo su un'estremità del dibromopentano, dopodiché la sodioammide strapperà anche l'altro protone benzilico e il ciclo si chiuderà. A questo punto, bisogna fare la idrolisi del nitrile che si

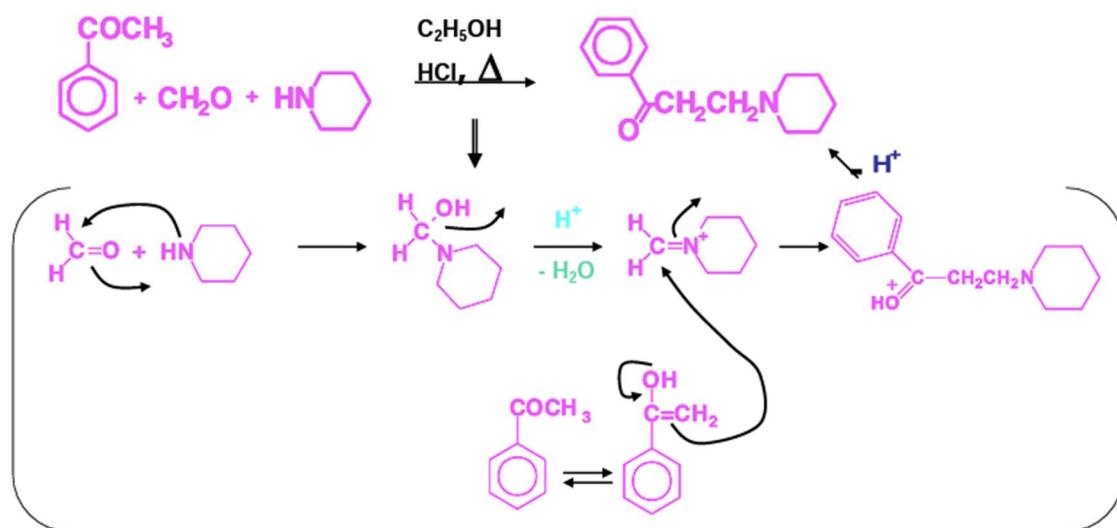
fa in ambiente acido. Se si lavorasse solo con acqua in ambiente acido il nitrile si trasformerebbe in gruppo carbossilico, ma visto che si vuole ottenere direttamente l'estere per poter poi fare una transesterificazione, si può lavorare in ambiente acido con etanolo come solvente. In questo modo, l'acido ha la funzione di rendere più elettropositivo l'azoto (carica positiva si delocalizza poi sul carbonio) e può subire più facilmente l'attacco dell'OH dell'alcol etilico. Si ottiene così quindi l'estere. Si fa ora una reazione di transesterificazione lavorando in eccesso di dietilamminoetanolo con toluene come solvente e in ambiente basico per sodio metallico (che è molto morbido, simil pasta, e si mette a pezzi prima con l'alcol per formare l'alcolato e poi con l'estere per fare transesterificazione). Questo è necessario per avere l'estremità dietilata, come spesso gli antagonisti muscarinici hanno. Ovviamente esce alcol etilico e si ottiene l'esterificazione con l'amminoalcol voluto.

A questo punto, è necessario ridurre il ciclo aromatico ancora presente a ciclosile: negli antagonisti muscarinici sono permessi cicli alifatici, come nel caso della dicicloverina. In questo caso si usa l'ossido di platino (fa da catalizzatore), come solvente nelle idrogenazioni catalitiche si usa acido acetico e questa reazione si fa in presenza di idrogeno che trasforma l'ossido di platino in *nero di platino*, che è il vero catalizzatore di questa reazione. Dopodiché si ottiene la riduzione dell'anello aromatico e si ottiene il ciclosile della dicicloverina.

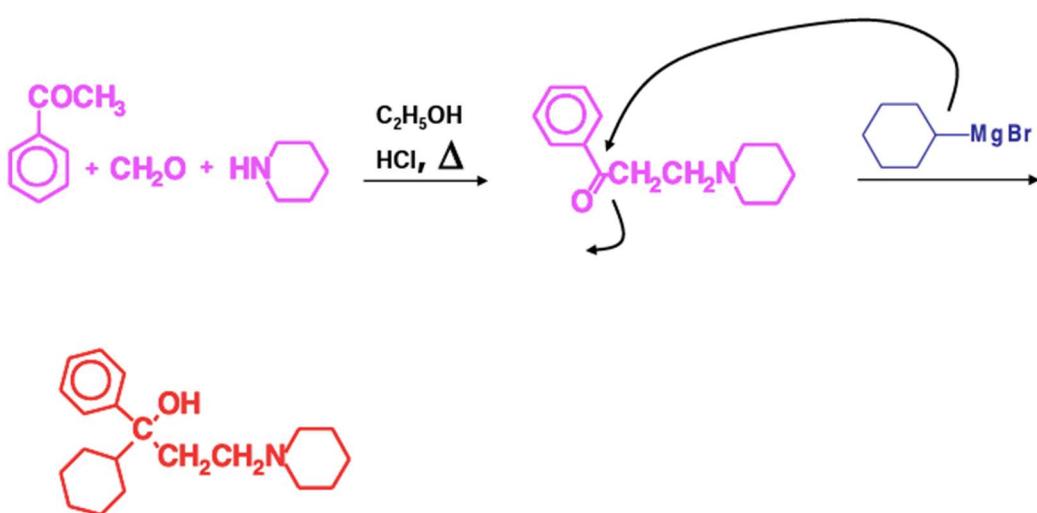
SINTESI DI TRISESIFENIDILE



È una delle sintesi più facili, avviene in soli due passaggi. Si ha contemporaneamente sull'atomo di carbonio un ciclo aromatico e un ciclosile, ma non si ha più l'estere, si ha solamente un gruppo -OH. Questo gruppo -OH è in realtà indispensabile per mantenere il legame idrogeno con il recettore, se manca il gruppo estero. In questo caso la molecola è più lipofila e più resistente alle esterasi perché non contiene dei gruppi esteri e infatti il triesifenidile è una delle molecole che viene utilizzato anche come antiparkinson nel parkinson iatrogeno.



È necessario fare una amminometilazione di Mannich sull'acetofenone, la reazione di Mannich si fa in ambiente acido che catalizza la formazione dello ione imminio e a caldo, come solvente si utilizza etanolo. Nella reazione si ha il gruppo amminico che appartiene all'anello della piperidina (devo inserire), l'aldeide è la formaldeide e il chetone è l'acetofenone. La differenza fra i due gruppi carbonilici è che uno dei due è enolizzabile (acetofenone), mentre quello della formaldeide non lo è. La reazione avviene in ambiente acido per formare lo ione imminio, che dà origine alla specie intermedia, prima la carbinolammina, che poi per disidratazione dà origine allo ione imminio. La carica positiva dello ione imminio è sì sull'atomo di azoto, ma viene chiaramente delocalizzata anche sul carbonio adiacente ed è proprio questa carica positiva sul carbonio che dà una reazione con l'acetofenone (con la sua forma enolica in realtà, che è favorita ulteriormente dall'ambiente acido), si ha quindi l'attacco sul carbonio reso elettropositivo dalla vicina carica positiva e si ha la amminometilazione (si è allungata di un metilene la catena dell'acetofenone e si è inserita anche la ammina). Si è costruita quindi la porzione della molecola che include anello aromatico, carbonile e la catena etilamminica dove il gruppo amminico è interno alla piperidina.



A questo punto bisogna inserire il ciclosile: visto che il carbonile già è nella posizione corretta si può fare una reazione di Grignard con il ciclosilmagnesiobromuro. Ovviamente il carbonio legato al magnesiobromuro ha parziale carica negativa e quindi può attaccare il carbonile formando il corrispondente gruppo alcolico legando la funzione ciclosilica.

La sintesi conta quindi solo 2 passaggi:

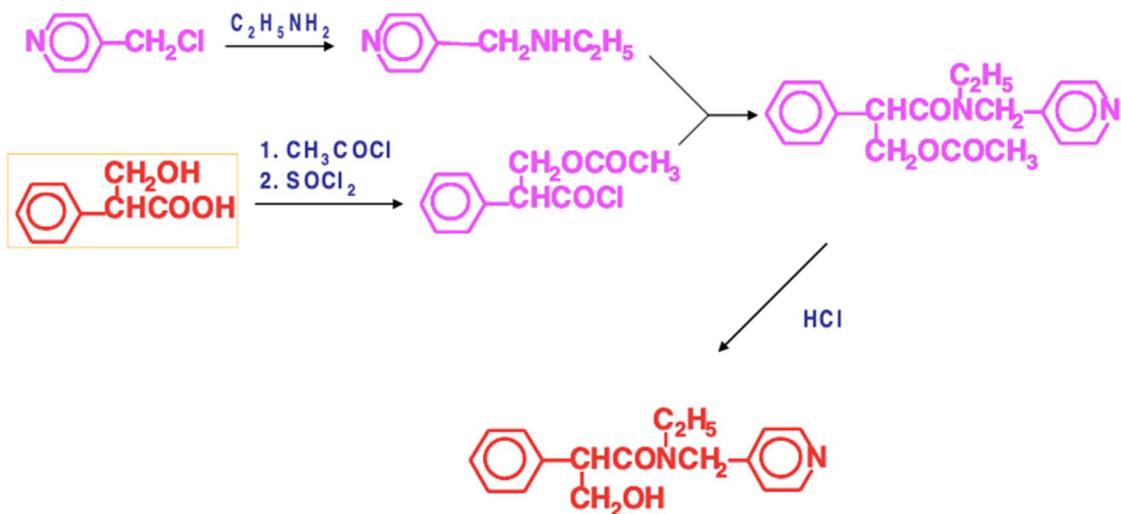
- Metilamminazione di Mannich, con la piperidina e formaldeide su acetofenone
- Reazione di Grignard sull'intermedio carbonilico ottenuto prima con un ciclosilmagnesiobromuro

SINTESI DI TROPICAMIDE

Questa molecola presenta un gruppo ammidico, e come tutte le molecole con un gruppo ammidico che funzionano presenta un gruppo alcolico (idrossimetile in questo caso) con funzione di formare un legame idrogeno. Il gruppo ammidico ha una stabilità molto maggiore rispetto al gruppo estero (la scala è esteri, carbammati e ammidi).

Nella tropicamide vedremo le due porzioni che si faranno reagire al termine della reazione:

- 1) Piridina sostituita con un clorometile in posizione para: si fa una semplice reazione di sostituzione nucleofila con l'etilammina. Sull'azoto della tropicamide si ha una funzione etilica, che viene inserita immediatamente a questo livello della sintesi utilizzando il corrispondente anello clorobenzilico (piridina) e si fa il primo passaggio con rese praticamente quantitative per dare origine all'ammina.
- 2) Siccome l'ammina deve essere fatta reagire con il corrispondente acido per dare origine alla funzione ammidica, si va ora a costruire l'acido necessario. La sintesi di questo acido è già stata vista quando sono state trattate altre sintesi, perché questo è l'acido tropico (ultima lezione, sintesi di atropina, a partire da acido fenilacetico). L'acido tropico necessita di essere protetto, perché è necessario attivare il gruppo carbossilico per dare la reazione di ammidazione trasformando l'acido nel corrispondente cloruro acilico. Se si andasse direttamente a trattare l'acido tropico con cloruro di tionile (reattivo per formare i cloruri acilici), anche il $-\text{CH}_2\text{OH}$ potrebbe trasformarsi in alogenuro alchilico (cosa non desiderata), quindi prima di trattare con cloruro di tionile si protegge l' $-\text{OH}$ in forma di acetato facendolo reagire con l'acetilcloruro. Si utilizza l'acetilcloruro per proteggere questo $-\text{OH}$ perché poi la rimozione è facile e selettiva. Prima quindi si fa acetilazione, in seconda battuta si tratta con cloruro di tionile e si ottiene il corrispondente cloruro acilico.
- 3) A questo punto abbiamo la funzione amminica che è stata creata precedentemente con la reazione di clorometile con etilammina che viene fatta reagire con il cloruro acilico ottenuto, reazione che si fa in cloruro di metilene e trietilammina per spostare l'equilibrio verso destra per l'HCl che si forma e si ottiene la corrispondente ammide con acido tropico protetto.
- 4) L'ultima reazione consiste nella deprotezione del gruppo acetile. È importante quindi nella scelta dei gruppi protettori sceglierne alcuni tali che la loro rimozione non dia reazioni interferenti con la molecola finale. Questa reazione è da fare come idrolisi in ambiente acido per HCl a freddo, mentre l'estere si idrolizza facilmente a freddo, l'ammide si idrolizza a caldo e quindi se si scaldasse si rischierebbe di ripristinare il gruppo idrossimetilico dell'acido tropico. In questo caso si ottiene la tropicamide, che è un'ammide con l'acido tropico. Viene utilizzata soprattutto nei colliri ad azione midriatica.



Richiesta di chiarimento su argomento precedente (antagonisti diclorosimili):

C'è una iniziale contrazione perché si va in depolarizzazione ma successivamente il canale non risponde più perché il letto furarico ha la capacità, essendo così sottile, di entrare all'interno del canale e fungere da bloccante del canale aperto; però agisce come antagonista non competitivo perché intercetta un sito oltre a quello ortosterico che, anche se si aumenta l'acetilcolina, stacca il sito ortosterico ma rimane legato agli amminoacidi carichi negativamente che contornano la parete del canale.

INIBITORI DELL'AChE

Gli inibitori dell'acetilcolina esterasi sono l'ultimo argomento relativo al sistema colinergico, sono in realtà una classe che agisce sul sistema colinergico per via indiretta, cioè non sono molecole che agiscono direttamente sul recettore o nicotinico o muscarinico, ma agiscono andando ad aumentare la concentrazione di acetilcolina (ACh). Sono già stati affrontati ma ora si andrà più nel dettaglio, anche valutando le relazioni struttura-attività. È inevitabile che ogni volta che si parla di sistema nicotinico o muscarinico non si vada anche sull'argomento dell'acetilcolina esterasi, perché l'instabilità di questa molecola e dei suoi derivati è dovuta proprio alla presenza di questa esterasi, che funziona nella terminazione della funzione dell'acetilcolina ma che rappresenta un elemento di instabilità per queste molecole.

Le azioni degli inibitori dell'AChE richiamano quelle già viste per gli agonisti diretti ma, quando vengono utilizzati per la terapia nella malattia di Alzheimer, non si hanno ancora degli agonisti solo nicotinici o solo muscarinici. Gli unici inibitori in terapia per la AD sono gli inibitori dell'AChE, quindi degli agonisti indiretti sia dei recettori nicotinici che dei recettori muscarinici centrali.

Gli altri usi terapeutici ricalcano esattamente tutte le attività che sono state viste per gli agonisti muscarinici e nicotinici.

Per quanto riguarda l'azione muscarinica (come gli agonisti muscarinici), questa agisce sulla contrazione della muscolatura liscia sei seguenti sistemi:

- Atonia intestinale
- Ritenzione urinaria
- Glaucoma (azione di miosi nell'occhio)

Altre azioni sono:

- Terminazione dell'effetto dei curari: il sovraddosaggio di curaro simili e competitivi (atracurio, pancuronio, vecuronio, cisatracurio, mivacurio) può essere revertito somministrando un inibitore AChE perché ripristina alti livelli di acetilcolina. Sono antidoti in caso di effetti tossici da sovraddosaggio.
- Miastenia grave: patologia autoimmune che porta a una diminuzione della trasmissione a livello della giunzione neuromuscolare e quindi riguarda prevalentemente il recettore nicotinico muscolare. Farmaci usati in questa patologia agiscono come inibitori AChE e alzano i livelli di ACh a livello periferico. Sono spesso palliativi e, se in fase precoce, anche curativi; agiscono ripristinando la corretta trasmissione nella giunzione neuromuscolare.

- Insetticidi: l'eliminazione di parassiti, soprattutto in agricoltura, prevede l'utilizzo di sostanze che sono tossiche anche per l'uomo essendo inibitori AChE. L'utilizzo è concesso solo dietro patentino. Ancora ci sono decessi da organofosforici se non utilizzati in maniera corretta. Gli organofosforici sono ancora considerati come le più potenti armi chimiche (gas nervini), utilizzate nelle guerre chimiche e per le quali sono necessari degli antidoti.

Il saggio biologico più comune che si fa per vedere l'azione di inibizione della AChE è il **saggio di Ellmann**. In questo saggio si utilizza un reattivo che è un ditioacido-bis-nitrobenzoico, che è una molecola simmetrica.

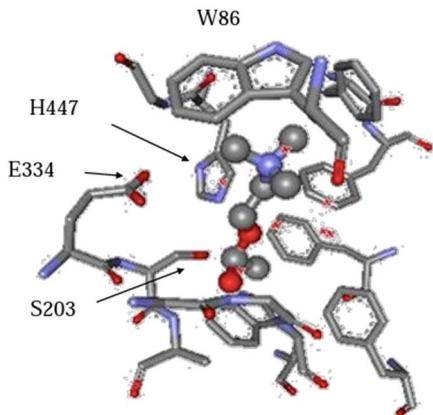
Come si studia l'effetto di un inibitore AChE?

Come substrato al posto della acetilcolina si usa l'acetiltiocolina, si fa l'estere della tiocolina dove al posto dell'-OH della colina c'è il -SH. È un tioestere che serve nel momento in cui ha azione l'acetilcolina esterasi su questa acetiltiocolina non si libera la colina, ma la tiocolina. Si libera la tiocolina, la quale dà una reazione di interscambio solfuro-disolfuro con il reattivo di Ellmann, in questa reazione la tiocolina reagisce con metà della molecola portando alla formazione di un nuovo ponte disolfuro e liberando la porzione del reattivo iniziale rimasta che è metà della molecola (funzione tionitrobenzoica). Questa funzione indicata in verde è colorata in giallo, ha un assorbimento a 412 nm. Questo è quello che succede quando si fa reagire l'acetiltiocolina con AChE e si tratta con reattivo di Ellmann, se la reazione è andata a buon fine (se la AChE idrolizza la acetiltiocolina) si formerà la tiocolina che reagisce con il reattivo di Ellmann e si apprezza un assorbimento del residuo formato.



Quando si studia un inibitore AChE, normalmente la AChE viene immobilizzata in colonna e, se si usa un inibitore AChE la prima reazione non avviene più e inibisce l'enzima che produce la tiocolina; quindi meno tiocolina c'è e meno reazione si ha con il reattivo di Ellmann e quindi meno formazione del residuo colorato in giallo. Se l'inibitore non funziona non si ha alcuna variazione.

Questo è il primo saggio da effettuare nello studio di questo tipo di inibitori.



La struttura della AChE è stata molto studiata, la struttura 3D è derivata dal cristallo della AChE umana e si sanno esattamente sia le caratteristiche di questo enzima sia le modalità con cui l'ACh interagisce con questo enzima (quali legami si formano).

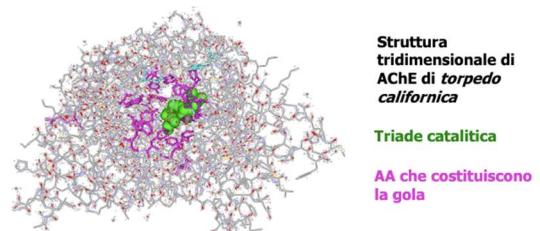
La AChE è una serina idrolasi, perché l'amminoacido che ha la funzione di andare ad attaccare il carbonile della ACh è un gruppo serinico (-OH). In realtà non è solo la serina che svolge l'effetto di idrolisi, è solo l'amminoacido principale, che dà l'attacco con l'-OH.

L'azione è coadiuvata da altri due amminoacidi fondamentali perché quell'-OH funziona, che sono una istidina e un glutammato.

Per questa ragione non si parla di un unico amminoacido, ma di una triade catalitica, che viene indicata come S-H-E, distintivi per serina, istidina e glutammato. Questo è il sito catalitico dove avviene la reazione di idrolisi.

L'enzima è caratterizzato da una gola lungo la quale entra l'ACh, il cui ingresso avviene grazie al fatto che in questa gola ci sono molti amminoacidi aromatici con i quali l'acetilcolina (sua testa cationica) forma dei legami π -catione. È come se fosse pian piano compattata per questi residui di tirosina, fenilalanina e triptofano che si trovano in questa gola. L'ACh arriva poi al sito attivo, dove fa l'interazione più importante. La reazione che fissa l'ACh all'enzima AChE per poi proiettarne la porzione acetossilica verso il sito catalitico che idrolizza è mediata da un triptofano, che è fondamentale per dare l'interazione π -catione e per fissare l'ACh all'enzima. Anche questo si è visto dal cristallo, per cui si è certi che non è un'interazione elettrostatica con un glutammato/aspartato e che sia una interazione catione- π . Il triptofano è caratterizzato da un anello indolico, l'interazione catione- π avviene con questo anello indolico.

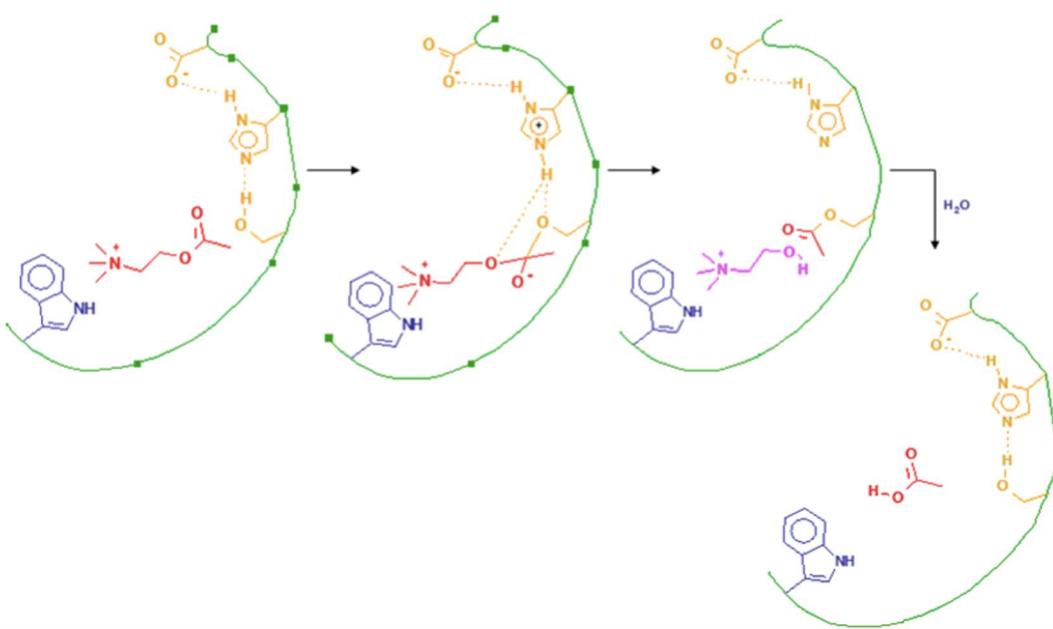
Il triptofano è il numero 86, la serina 203, l'istidina 447 e il glutammato 334. (I numeri non sono da ricordare). Avendo però il cristallo della AChE umana, è stato possibile identificare chiaramente i residui amminoacidici. La porzione blu rappresenta la testa ammonica quaternaria, che interagisce con il legame catione- π con il triptofano, il resto della molecola viene proiettato verso la serina 203, che con l'-OH attacca il carbonile ma è coadiuvata da istidina e glutammato.



Struttura tridimensionale di AChE di *torpedo californica*
Triade catalitica
AA che costituiscono la gola

AChE è una serina-idrolasi, la cui triade catalitica è composta da S-H-E. ACh entra nell'interno dell'enzima attraverso una gola formata soprattutto da aa aromatici, che guidano la testa cationica verso il sito catalitico tramite interazioni π -catione. L'interazione tra ACh e l'enzima è stabilizzata da una interazione simile che avviene tra il gruppo ammonico ed l'anello indolico di un residuo di triptofano.

Quella sotto riportata è una rappresentazione schematica di quanto succede:



Si ha l'ancoraggio dell'indolo del triptofano con la testa cationica, la porzione acetossilica è rivolta verso l'-OH serinico. In successione vicini all'-OH serinico si trovano l'anello imidazolico dell'istidina e la funzione carbossilato del glutammato. Sono rappresentati solo i gruppi funzionali necessari alla catalisi. L'anello imidazolico dà origine a un equilibrio prototropico, cioè l'-NH dell'anello imidazolico per tautomeria può stare sia su un atomo di azoto che sull'altro (si vedrà nel dettaglio quando si tratteranno i sistemi istaminergici). In questo equilibrio prototropico dell'anello imidazolico l'azoto attira su di sé l'idrogeno dell'-OH serinico rendendo quell'ossigeno ancora più reattivo per l'attacco nucleofilo. Questo è ulteriormente coadiuvato dal gruppo carbossilato che a sua volta attira su di sé l'idrogeno dell'imidazolo; quindi, la funzione dell'imidazolo dell'istidina e del gruppo carbossilato del glutammato è, grazie all'equilibrio prototropico del nucleo imidazolico centrale, di rendere l'ossigeno serinico più reattivo all'attacco nucleofilo sul carbonile dell'AChE.

In seguito all'attacco di questo ossigeno sul carbonile dell'AChE, si dà origine a un intermedio tetraedrico, il quale riarrangia e si ha una reazione di transesterificazione tra l'acetilcolina che cede l'acetile all'-OH della serina. L'intermedio nella reazione di idrolisi della ACh è l'estere acetico dell'-OH serinico. L'estere acetico dell'-OH serinico non rimane così, l'enzima è in acqua (fessura sinaptica dove si libera ACh) e l'acqua ha il compito di ripristinare l'-OH serinico andando a idrolizzare la serina acetilata.

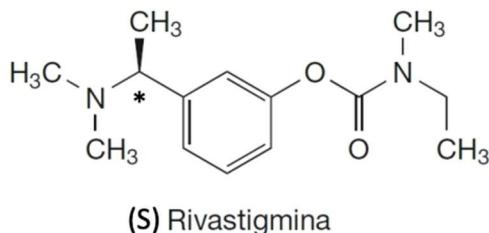
Alla fine della reazione si ha attacco dell'-OH sul carbonile, questo fa sì che si abbia una transesterificazione con liberazione di colina. Successivamente l'acqua interviene per idrolizzare l'estere della serina in modo da liberare l'acetato. Dalla reazione di idrolisi si ha da un lato come prodotto un amminoalcol (colina) e dall'altro l'acetile; ovviamente l'enzima si ripristina per ricominciare un nuovo ciclo di idrolisi.

La classificazione degli inibitori dell'acetilcolina esterasi si basa sul loro meccanismo di azione. Sono gli unici farmaci utilizzati nella terapia per la malattia di Alzheimer come palliativi (riducono la progressione della malattia) e devono essere in grado di attraversare la barriera ematoencefalica; i gruppi farmacofori che interagiscono con l'acetilcolina esterasi a livello centrale sono però utilizzati anche per avere un'azione esclusivamente periferica.

La maggior parte degli inibitori dell'AChE vengono utilizzati nell'Alzheimer da lieve a moderato, mentre nel caso dell'Alzheimer da moderato a grave si interviene solitamente con una molecola (la memantina) che agisce come antagonista non competitivo del recettore dell'N-metil-D-aspartato.

In base all'interazione che danno, queste molecole vengono classificate in due classi:

- **Inibitori covalenti e pseudoirreversibili** (carbammati), che instaurano un legame covalente che si idrolizza nel tempo; non possono essere chiamati né reversibili, dal momento che danno un'interazione di tipo covalente, né irreversibili, dato che questo legame viene poi idrolizzato, ma fanno sì che la molecola rimanga legata più a lungo all'enzima. Sono caratterizzati da un gruppo carbammato e derivano dalla molecola naturale della fisostigmina, alcaloide di origine naturale.

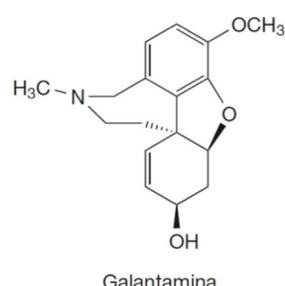
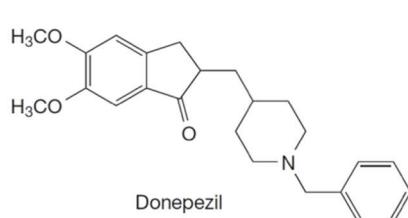


L'unica molecola in terapia che appartiene a questa classe è la rivastigmina, molecola con un centro chirale e il cui unico enantiomero attivo (eutomero) è l'enantiomero S. La rivastigmina viene considerata una semplificazione molecolare della fisostigmina; infatti, mentre la prima ha un solo anello aromatico, la seconda è caratterizzata da tre cicli fusi insieme. La rivastigmina è entrata in terapia nel 2000.

In questo caso, il gruppo carbammato attacca covalentemente l'OH serinico dell'enzima e, in seguito alla reazione con l'esterasi (si parla di reazione e non di interazione perché si viene a formare un legame covalente), invece di esterificare l'OH come succede per l'acetile dell'acetilcolina, la rivastigmina cede il gruppo carbammato all'OH, che si carbammoilà (si parla infatti di OH carbammoilato).

- **Inibitori reversibili**, che interagiscono con vari siti amminoacidici dell'enzima senza però dare attacco covalente con l'OH serinico, ma formando legami deboli (legami di stacking tra gli anelli aromatici o legami ad idrogeno).

Di questa classe, le molecole utilizzate nella malattia di Alzheimer sono due: il donepezil, in terapia dal 1997 e caratterizzato da un anello indanonicco, e la galantamina, in terapia dal 2001, un alcaloide di origine naturale che viene ora sintetizzato in laboratorio.



La prima molecola a entrare in terapia per l'Alzheimer è stata la tacrina, triciclo con un gruppo amminico (anello amminoacridinico); è entrata in terapia nel 1993 ma è stata ritirata intorno agli anni 2000 perché epatotossica. Rimane comunque una delle molecole più studiate come base per la progettazione di molecole ad azione inibitoria nei confronti dell'AChE. Queste tre molecole agiscono a livello dell'enzima andando a instaurare legami deboli con esso.



Inibitori covalenti o pseudoirreversibili (carbammati)

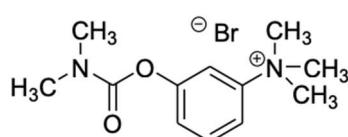
L'idea del carbammato ha avuto origine a partire dalla *Fisostigma velenosum*, pianta il cui principio attivo è la fisostigmina. Questa è una molecola molto più complessa della rivastigmina ma entrambe sono caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico legato al carbammato.

Nel caso della fisostigmina l'anello aromatico è fuso insieme ad altri due anelli metilpirrolidinici aventi una giunzione cis tra loro. Quando la funzione carbammato viene idrolizzata si libera il corrispondente alcol (eserolina); nel processo di idrolisi il gruppo carbammato viene ceduto all'OH serinico dell'enzima che viene quindi carbammoilato, liberando così il corrispondente alcol eserolinico.

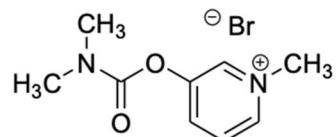


La fisostigmina è stata il punto di partenza per la sintesi e la progettazione sia della rivastigmina che degli inibitori della acetilcolina esterasi utilizzati a livello periferico nel caso della miastenia gravis. L'azione esclusivamente periferica è stata ottenuta andando a creare una carica positiva permanente.

Le due molecole utilizzate nella miastenia gravis sono la neostigmina bromuro, dove l'azoto è quaternarizzato con tre gruppi metilici ed è al di fuori del ciclo aromatico, e la piridostigmina bromuro dove l'azoto carico positivamente è invece all'interno del ciclo aromatico (da cui pirido- per la presenza del metilpiridinio).



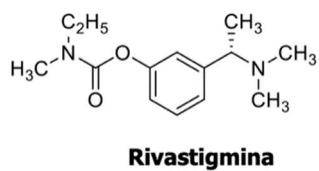
Neostigmina bromuro



Piridostigmina bromuro

Sono entrambi sotto forma di sali bromuro e sono caratterizzate dal gruppo carbammato che ha sempre la funzione di inibire, tramite un legame covalente pian piano idrolizzabile, l'enzima acetilcolina esterasi. La fisostigmina, alcaloide naturale utilizzato, ad esempio, nei colliri miotici, è in terapia dal 1864 e dal 1877 per il trattamento del glaucoma. Anche se non è più utilizzata, è stata un importante punto di partenza per due classi di farmaci: gli agonisti indiretti che agiscono prevalentemente sulla giunzione neuromuscolare (sul recettore nicotinico) quali la neostigmina e la piridostigmina, e per la rivastigmina, farmaco che attraversa la barriera ematoencefalica e agisce come palliativo nella terapia del morbo di Alzheimer.

Nel caso della neostigmina e della piridostigmina, per avere un effetto solo periferico, la molecola deve essere resa più idrofila; questo ha portato alla quaternarizzazione degli atomi di azoto mantenendo però sia la funzione carbammato che l'atomo di azoto basico.

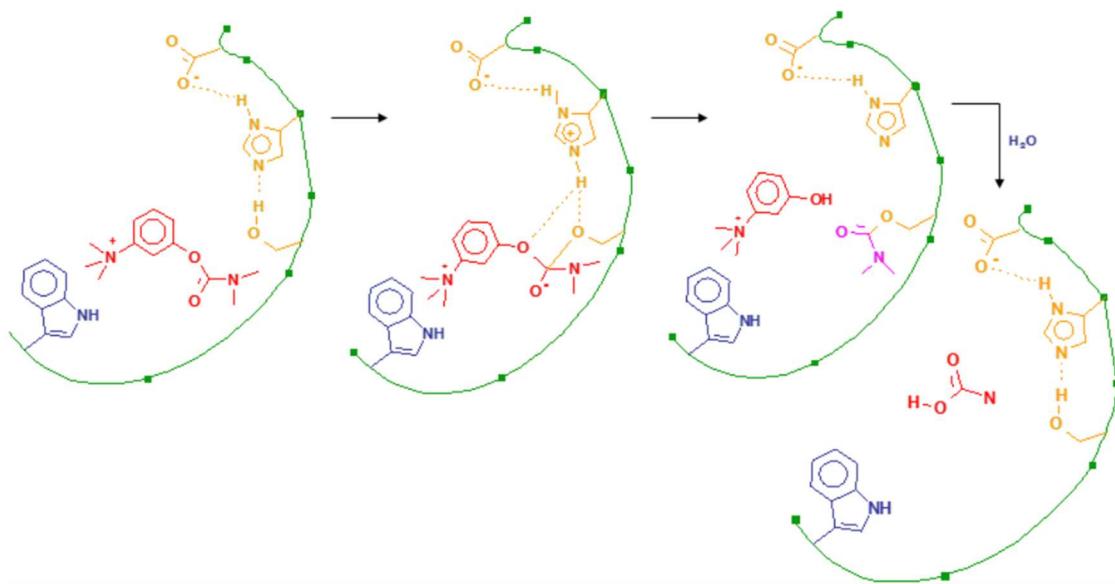


barriera ematoencefalica.

Nel caso della rivastigmina, invece, la molecola deve essere maggiormente lipofila; per questo motivo, nella funzione carbammica uno dei metili è stato sostituito da un etile, mentre nella funzione amminica è stato inserito un ulteriore metile in catena laterale che ha reso la molecola chirale (la conformazione attiva è quella S), e l'atomo di azoto è legato a due metili. Queste modifiche rendono la molecola abbastanza lipofila da far sì che questa riesca ad attraversare la barriera ematoencefalica.

Meccanismo e sito d'azione

L'OH serinico attacca il carbonile del carbammato formando un intermedio tetraedrico e, in seguito a riarrangiamento, il carbammoile carbamoila l'OH serinico liberando così l'alcol corrispondente della neostigmina.



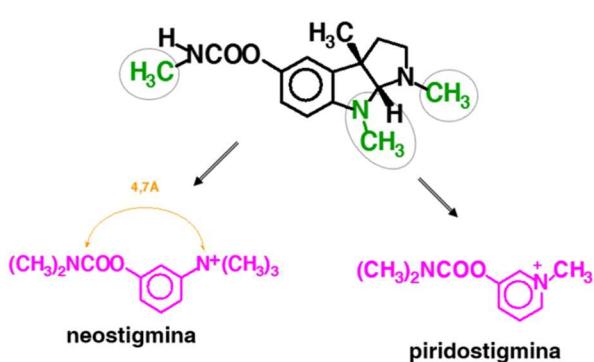
Perché l'enzima carbamoilato viene bloccato per un periodo più lungo rispetto all'enzima esterificato?

Normalmente, dopo che l'acetilcolina acetila l'OH serinico, l'acqua va a rompere questo legame; l'estere che abbiamo nel caso dell'acetilcolina è facilmente idrolizzabile a carico dell' H_2O e si riesce ad avere immediatamente il ripristino dell'enzima funzionante. Quando ho una carbamoilazione, invece, il carbonile del carbammoile è meno reattivo all'idrolisi da parte dell'acqua, questo perché l'atomo di azoto delocalizza il suo doppietto; infatti, la carica positiva non è localizzata sul carbonio come nel caso dell'estere, ma sull'atomo di azoto. Il carbonile quindi, essendo meno elettropositivo, subisce meno facilmente l'attacco da parte dell' H_2O , l'idrolisi risulta più lenta e l'enzima carbamoilato rimane bloccato per un tempo maggiore. Questi inibitori prendono il nome di "pseudoirreversibili" proprio perché, nonostante il legame che si viene a formare sia covalente, anche il carbammato si idrolizza ripristinando l'OH serinico funzionante e non si può parlare quindi di irreversibilità.

È importante però ricordare che, sia nel caso della fisostigmina che nel caso della piridostigmina e della rivastigmina, l'attacco primario avviene sempre da parte del gruppo basico, ovvero dell'azoto protonato o carico permanentemente che interagisce con l'anello indolico del triptofano.

La molecola della fisostigmina è stata isolata e caratterizzata nel 1864, è entrata in terapia nei colliri per il glaucoma ed è stata studiata per le sue caratteristiche strutturali.

Come è già stato detto, la struttura è stata semplificata; non tutta la molecola è importante per l'azione inibitoria nei confronti dell'acetilcolina esterasi, i gruppi farmacofori sono solo una parte rispetto a quelli presenti. È stato mantenuto il gruppo carbammato, modificato, ad esempio, dall'aggiunta di metili (è stato visto che può arrivare ad avere anche una catena a sette atomi di carbonio, come nel caso dell'eftastigmina; per catene a maggior numero di C, l'attività diminuisce. Incrementare le dimensioni è importante per riuscire ad avere una catena più lipofila). Si possono quindi avere modificazioni sia a livello dei sostituenti che a livello di N, aggiungendo metili o cambiando la catena, ma il gruppo carbammato deve sempre rimanere.



È possibile osservare inoltre che l'anello aromatico (che nel caso della piridostigmina è sostituito con una piridina) è presente in tutte le strutture, mentre non è fondamentale la presenza degli altri due cicli.

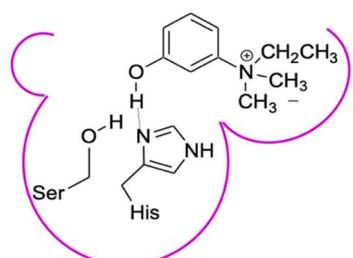
Un altro elemento presente in tutte le strutture è l' N basico, che può essere terziario o protonabile a pH fisiologico. Questo azoto (N in 1) è indispensabile per l'attacco e per l'ancoraggio al triptofano; la sua basicità è data dal fatto che appartiene ad un anello alchilico (metilpirrolidinico), mentre l' N in 8, essendo

invece anilinico e quindi legato ad anello aromatico, è meno basico. È stato infatti visto che, andando a modificare l' N in 8 e sostituendolo, ad esempio, con un CH , la molecola mantiene l'attività: N in 8 ha azione strutturale ma non è importante ai fini dell'interazione con l'enzima.

Sono stati inoltre effettuati degli studi relativi alla distanza ottimale tra l'atomo di azoto che va ad interagire con il triptofano e il gruppo carbammato che subisce l'attacco da parte dell' OH serinico; la distanza tra i due è abbastanza flessibile, e lo si deduce dal fatto che la distanza presente tra l'atomo di azoto e il carbonile nella neostigmina è maggiore rispetto a quella che si osserva nella piridostigmina. Questo dimostra che, dopo il primo ancoraggio di N che interagisce con il triptofano, le molecole sono in grado di adattarsi per riuscire a proiettare la funzione carbammoilica verso la serina.

Inibitori reversibili

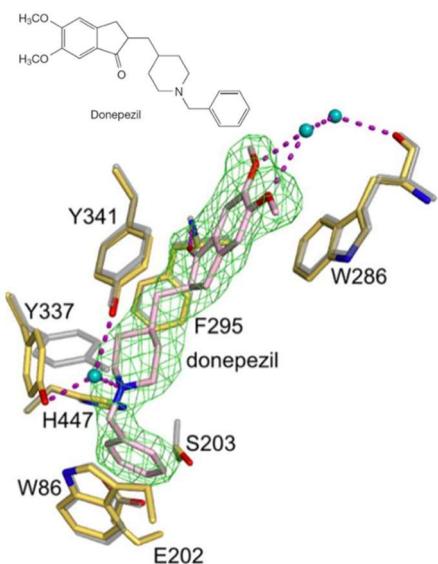
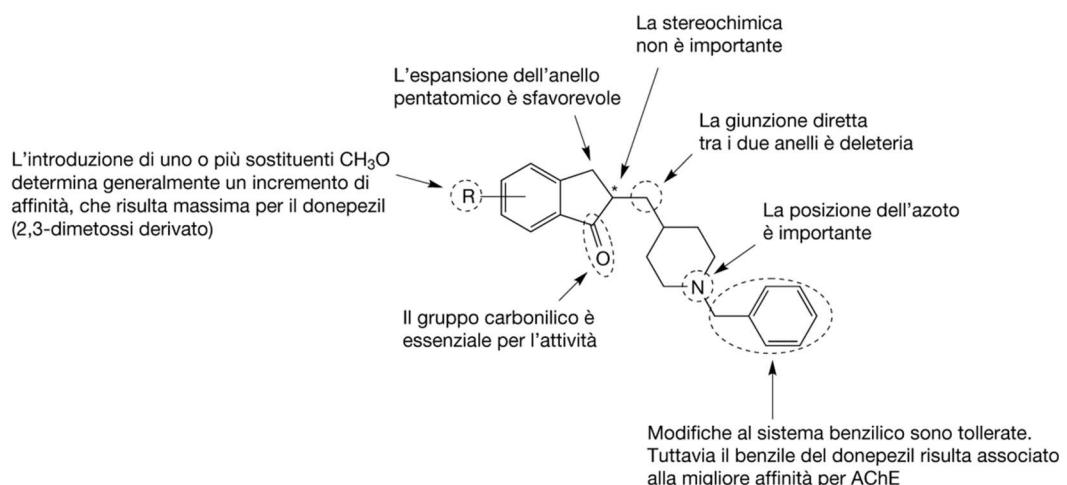
Sono usati prevalentemente nella malattia di Alzheimer. Oltre alla galantamina e al donepezil abbiamo anche un'altra molecola studiata per le sue caratteristiche di inibizione dell'enzima acetilcolina esterasi in modo reversibile, ma che non è utilizzata nella terapia per l'Alzheimer: l'edrofonio. Questa ricorda la molecola della neostigmina senza, però, il gruppo carbammato; non può infatti dare un legame covalente ma riesce ad interagire, grazie all' OH fenolico, instaurando legami a idrogeno sia con l' OH della serina che con l' N dell'anello imidazolico dell'istidina. L'edrofonio si ancora quindi al triptofano grazie alla testa ammonica quaternaria, e dà poi, con l' OH fenolico, dei legami a idrogeno con i due residui della triade catalitica. In questo caso non si ha una reazione con l' OH serinico (non si ha attacco covalente) e appartiene quindi alla classe degli inibitori reversibili.



Gli altri inibitori reversibili utilizzati nella malattia di Alzheimer sono il donepezil e la galantamina. Si è andati a studiare come questi interagiscono con la molecola enzimatica; in questo caso ci aspettiamo la formazione di legami ad idrogeno o di legami tra anelli aromatici.

Donepezil

La molecola presenta un anello metossiendanonico, i cui gruppi metossilici sono importanti per l'interazione con l'enzima e non possono quindi essere rimossi. Legato a questo anello è presente la N-benzilpiperidina, fondamentale perché è proprio l'atomo di azoto presente all'interno dell'anello che va a dare una rete di legami a H che aumentano l'affinità per l'enzima.



Come è stato detto, l'amminoacido importante ai fini dell'interazione con le teste cationiche è il triptofano 86, il quale dà interazione $\pi-\pi$ con il gruppo benzilico presente nella benzilpiperidina. L'anello indanonico che si trova dalla parte opposta, invece, oltre ad avere due gruppi metossilici che danno interazioni a legami a idrogeno con delle molecole di acqua, interagisce anche con l'altro triptofano presente nell'enzima, il triptofano 286.

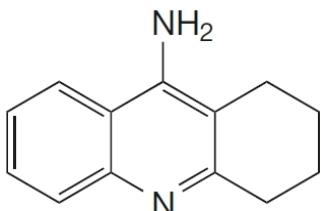
Per dare questa interazione sia con il triptofano 86 che con il triptofano 286, la molecola del donepezil deve essere flessibile per permettere la distorsione di una porzione della molecola rispetto all'altra, al fine di avere un'interazione ottimale. È inoltre molto importante l'interazione dell'atomo di azoto della benzilpiperidina con i gruppi OH che appartengono alle tirosine 341 e 337 della acetilcolina esterasi.

Nella struttura dell'AChE abbiamo dei cluster di amminoacidi aromatici (tirosina, triptofani e fenilalanine) che, oltre ad essere fondamentali per l'interazione dell'acetilcolina con il sito attivo, sono anche importanti per un secondo sito presente a livello dell'enzima: il sito periferico, che sembra essere coinvolto nell'idrolisi dell'acetilcolina mediata dall'enzima. Questo è stato molto importante per lo studio di ligandi duali in grado di interagire contemporaneamente con il sito attivo e con il sito periferico; la speranza è quella di avere un'azione inibitoria più produttiva.

INIBITORI DELL'AChE

Nelle lezioni precedenti avevamo iniziato a vedere gli inibitori dell'acetilcolina esterasi che agiscono con un tipo di meccanismo di inibizione reversibile, cioè non danno un attacco covalente ma agiscono attraverso interazioni deboli come per il Donepezil (interazioni a idrogeno e legami pigreco-pigreco).

Nell'acetilcolina esterasi c'è un sito periferico che è caratterizzato da amminoacidi aromatici. È stato studiato in quanto rappresenta un'ulteriore possibilità di interazione ed è stato studiato per gli inibitori duali, cioè inibitori che contemporaneamente interagiscono con il sito attivo e periferico. Per avere questa doppia interazione si devono avere due farmacofori a una definita distanza, tale distanza deve essere ottimale per far in modo che i due farmacofori riescano ad interagire in maniera efficiente sia con il sito attivo sia con il sito periferico, in questo modo l'inibizione dell'enzima è più potente.



Tacrina

La tacrina ha un anello amminoacridinico ed è entrata in terapia per prima ma poi è stata ritirata per la sua epatotossicità, se si guarda la struttura agisce con l'acetilcolina esterasi come tutti gli inibitori reversibili, non dà quindi legami covalenti ma interazioni deboli.

Si è scoperto sulla molecola di tacrina un sito periferico caratterizzato da amminoacidi aromatici.

Un ricercatore negli USA ha progettato una serie di molecole duali che andassero a interagire sia con il sito attivo che con il sito periferico, ha visto che raddoppiando la struttura della tacrina con un linker centrale con 7 metileni che lega due gruppi NH₂, ha ottenuto una molecola che ha chiamato bis-7-tacrina con una potenza inibitoria maggiore della tacrina, intercetta sia il sito periferico che il sito attivo. Questa molecola è risultata meno attiva da un punto di vista di tossicità epatica ma non si è dimostrata in vivo una molecola con caratteristiche adeguate per diventare un farmaco.

Sulla scia di questo c'è una ricchissima ricerca che segue un po' la prima, altri gruppi di ricercatori hanno cercato di unire più farmacofori facendo dei ligandi duali per studiare in modo più approfondito i siti di interazione dell'acetilcolina esterasi.

Di tutta questa ricerca non si hanno delle ricadute da un punto di vista terapeutico.

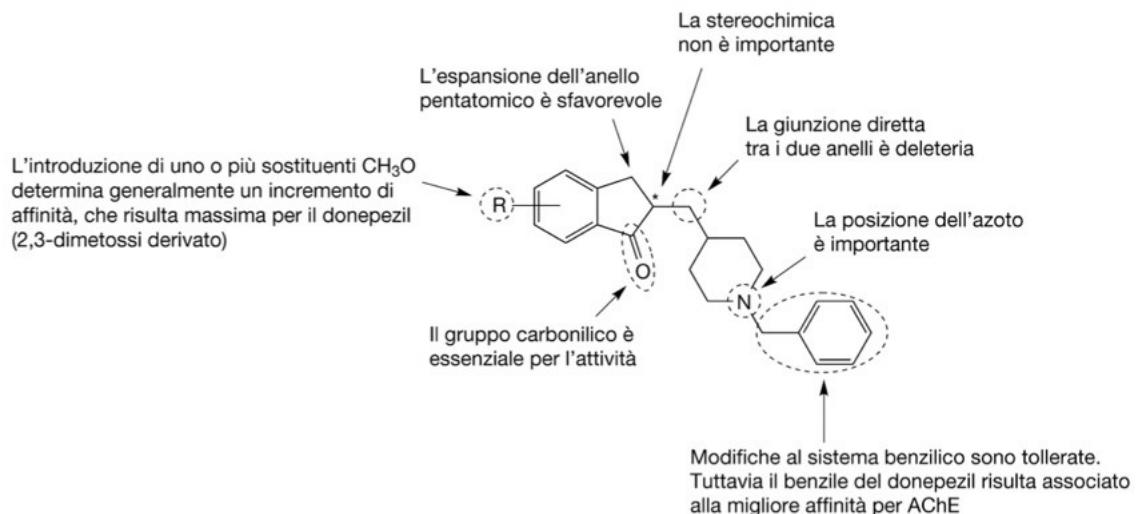
SAR- donepezil

Il donepezil è caratterizzato da:

- Un anello indanonico sostituito con due metossili, i quali non devono essere rimossi perché danno una rete di legami a idrogeno con l'enzima
- il carbonile dell'anello indanonico che non può essere modificato e non può essere ridotto a gruppo alcolico altrimenti si perde l'attività, è importante fare attenzione alle condizioni sintetiche per mantenere il carbonile in questa forma.
- la catena laterale che è una benzilpiperidina conferisce uno stereocentro, in realtà la stereochimica non è importante, non c'è bisogno di separare gli enantiomeri.
- l'anello a 5 dell'indanone non può essere modificato, non può diventare un anello a 6 altrimenti si perderebbe l'attività. Si è provato a fare anche derivati spiranici, cioè con l'anello piperidinico legato in posizione 2 all'anello indanonico, spiranico per via della giunzione in un unico punto. Anche in questo

caso la sostituzione è deleteria perché nel momento in cui c'è l'interazione con l'anello aromatico la molecola si deve distorcere per dare la corretta interazione con altri gruppi e in questa porzione della molecola ci deve essere flessibilità e deve rimanere il gruppo metilenico.

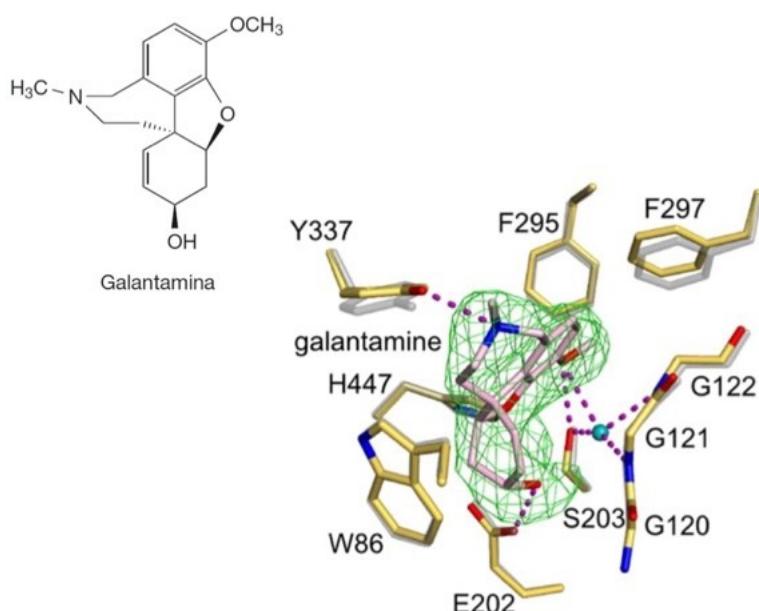
- L'N è l'elemento fondamentale, è basico e si protona a pH fisiologico, deve essere sostituito con il benzile e la sostituzione o eliminazione del benzile con altri gruppi porta la molecola a non dare interazioni pigreco pigreco con gli amminoacidi aromatici. Il benzile non può essere rimosso è il gruppo migliore.



Binding AChE-galantamina

La galantamina non è solo un inibitore dell'acetilcolina esterasi ma è anche un modulatore allosterico dei recettori nicotinici presinaptici. Questa doppia attività di inibizione dell'acetilcolina esterasi e modulazione allosterica dei recettori nicotinici presinaptici è positiva, entrambe vanno ad aumentare la concentrazione di acetilcolina, anche i recettori nicotinici presinaptici centrali hanno un ruolo di modulazione a feedback positivo sul rilascio di acetilcolina.

La molecola è un inibitore reversibile e le interazioni sono legami deboli ad H e con gli amminoacidi aromatici, mediate, in alcuni casi, da una molecola di acqua.



Ha un centro chirale che deve rimanere nella configurazione e ha un anello epossidico che costringe le due porzioni, aromatica e quella del ciclosesene con l'OH, in una determinata conformazione. Il gruppo epossidico non può essere eliminato e non può adottare una maggiore flessibilità. Come in tutte le molecole c'è un atomo di azoto terziario che si protona a pH fisiologico ed è quello che da il legame a idrogeno con OH della tirosina 337.

Inibitori dell'AChE irreversibili

Esteri organofosforici

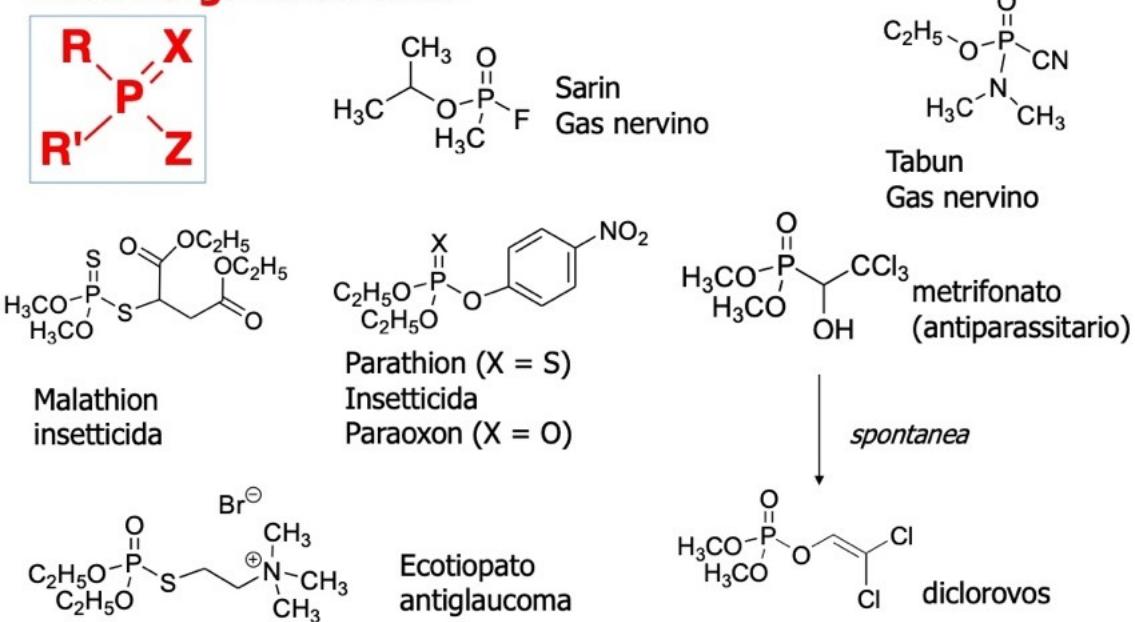
Tutte queste molecole contengono un atomo di fosforo legato con un doppio legame all'ossigeno, hanno l'ossigeno etereo legato a gruppi alchilici. Gli organofosforici sono esteri ma non è l'unica parte importante della molecola, la funzione estera è legata a gruppi alchilici ingombranti. Ci deve essere anche un ottimo gruppo uscente, migliore è il gruppo uscente più sono potenti. Infatti nel gas nervino, il sarin c'è come gruppo uscente il fluoro, mentre l'estere contiene un gruppo ingombrante ovvero l'isopropile, l'altro gas nervino il tabun contiene l'estere con il gruppo alchilico e come gruppo uscente un nitrile.

Vicino a questi che sono i più potenti ci sono gli insetticidi, che devono essere usati con precauzione perché possono dare origine a intossicazioni mortali.

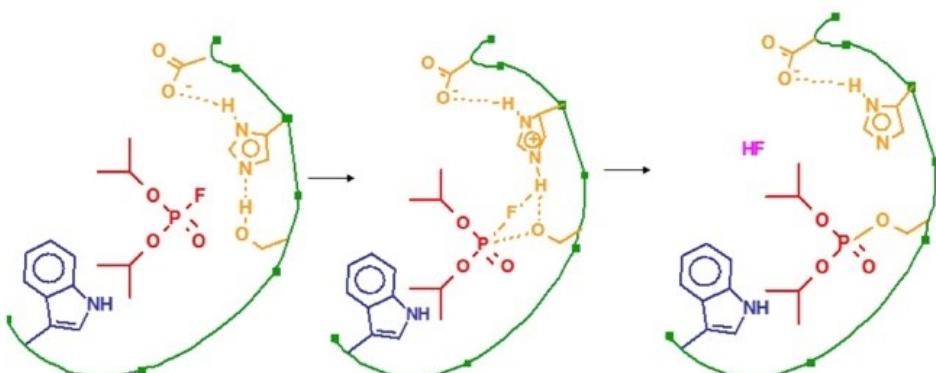
Sia nel malathion, parathion e paraoxon l'estere non può essere solo con l'ossigeno ma possono essere derivati tiofosforici, nel caso del parathion e paraoxon il gruppo uscente è un gruppo paranitrofenossi, la caratteristica comune è la presenza di gruppi legati al fosforo ingombranti.

L'unica molecola che appartiene agli esteri organofosforici, che è anche tiofosforico non usato come insetticida è l'ecotiopato bromuro una molecola ammonica quaternaria, usato per uso topico in colliri antiglaucoma. Si chiama ecotiopato bromuro perché si fa la quaternarizzazione con il bromuro di metile. Tutte hanno la possibilità di attraversare la barriera ematoencefalica a parte l'ecotiopato.

Esteri organofosforici



Meccanismo e sito d'azione

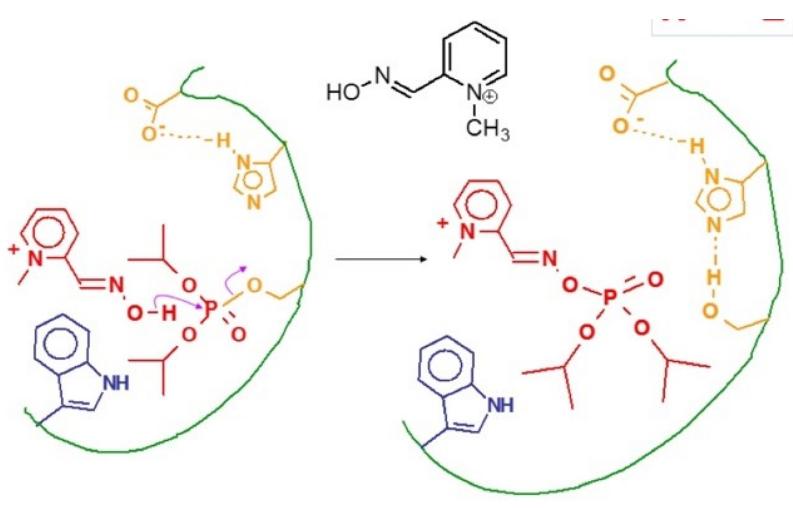


Sono esteri organofosforici e avviene la fosforilarazione dell'OH serinico, nel processo di transesterificazione l'OH attacca il fosforo, il gruppo uscente in questo caso è il fluoro (migliore è il gruppo uscente più la reazione avviene velocemente), si forma l'intermedio e l'OH serinico viene fosforilato ed esce l'acido fluoridrico. L'OH dell'enzima fosforilato prevede questo addotto che è tetraedrico e inoltre ha un ingombro sterico dovuto ai gruppi proprilossi, quindi diventa un inibitore irreversibile perché l'acqua non riesce a ripristinare l'enzima se non in tempi molto lunghi. L'acetilcolina esterasi rimane bloccata e si raggiungono concentrazioni tossiche di acetilcolina sia a livello centrale che periferico. A livello centrale da effetti convulsivanti, mentre a livello periferico paralisi della muscolatura liscia bronchiale, quindi morte per broncocostrizione e paralisi respiratoria

Riattivatore inibitori reversibili

Si deve intervenire in due modi per rompere questo legame estero con il gruppo fosfato, per rompere quel legame si deve usare il riattivatore dell'acetilcolina esterasi, che si chiama n-metilpiperidinio-2-aldossima (PAM), che ha la quaternarizzazione della piridina.

La carica permanente da interazione con il triptofano, si ancora fortemente al sito attivo, l'ossima ha un gruppo OH proiettato verso il fosforo e fa una transesterificazione della serina che è bloccata essendo fosforilata e da questa transesterificazione si ha la fosforilarazione del PAM e pian piano la rottura dell'estere fosforico con l'OH della serina e quindi il ripristino dell'attività enzimatica.



Non è l'unico intervento, nelle fiale dei soldati in guerra oltre al PAM hanno l'atropina perché non basta solo il PAM, si deve riattivare l'enzima ma in circolo si ha l'acetilcolina e si devono bloccare i siti muscarinici per evitare gli effetti centrali e periferici dell'acetilcolina. Allora si somministra un antagonista muscarinico competitivo in grado di spiazzare l'acetilcolina dai recettori.

Antagonisti del recettore NMDA (AD moderato-severo)

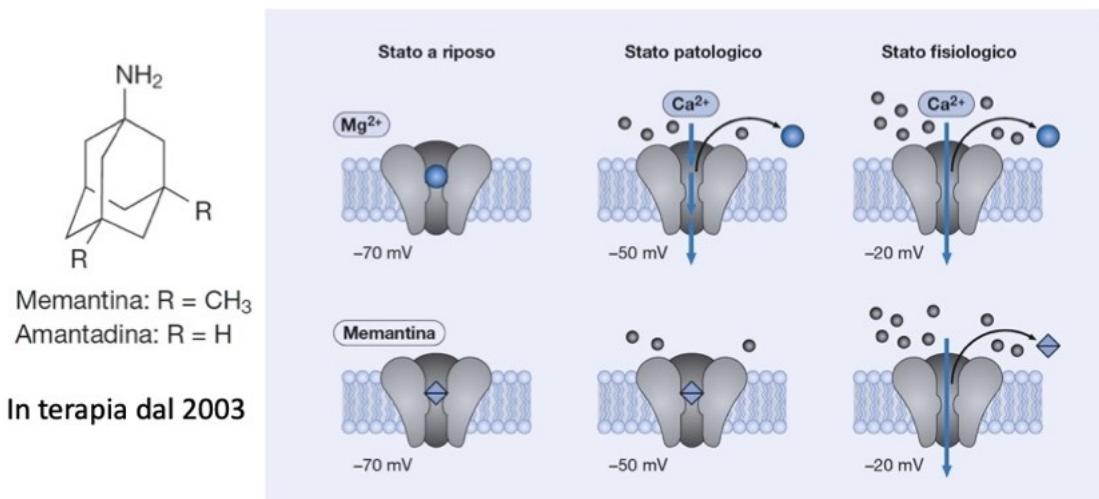
I farmaci in terapia dell'Alzheimer, oltre tutti quelli visti finora e oltre agli anticorpi monoclonali si usa in terapia un antagonista non competitivo dei recettori NMDA.

Oltre ai recettori di classe 1 ci sono quelli di classe 2, in particolare tra questi ci sono i recettori del glutammato, fra cui l'N-metildiaspartato su cui agisce la memantina.

La **memantina** ha una struttura dell'adamantano con due metili, è una molecola che ha un gruppo amminico che si protona a pH fisiologico e che va a dare l'interazione con un sito anionico presente nel canale dell'NMDA.

L'NMDA è un recettore canale formato da quattro subunità, ognuna ha una struttura diversa da quelle della classe 1. È come un antagonista endogeno, c'è una molecola che ne blocca l'attività che è il magnesio 2+, quando nello stato fisiologico si ha la depolarizzazione fino ad arrivare a -20mV, il magnesio si stacca dal suo sito che è anionico, si ha l'ingresso di calcio. Nello stato patologico questi recettori sono soggetti all'attivazione da parte del glutammato, che è un aminoacido eccitatorio che porta eccitotoxicità glutammatergica, questa rappresenta uno degli effetti patologici che si osserva nelle malattie neurodegenerative. Questa eccitotoxicità fa sì che si abbia un cronico ingresso di calcio che porta a tossicità neuronale e neuroinfiammazione.

La memantina agisce nel canale aperto. Nell'attivazione cronica e quindi patologica da parte del glutammato, anche se non si arriva a una depolarizzazione di -20mV, si ha uno stato patologico depolarizzato di circa -50mV, in questo stato il magnesio non è in grado di rimanere legato al canale e quindi non fa da protezione ad un'ulteriore attivazione perché a quel potenziale il magnesio non riesce a legarsi. La memantina riesce a legare il canale debolmente depolarizzato nello stato patologico e riesce a interagire con il sito dove si lega il magnesio impedendo l'ingresso di calcio e l'aumento quindi di eccitotossicità glutammaterica. È un antagonista non competitivo perché non agisce sul sito del glutammato ma su quello del magnesio, non spiazza il glutammato dal sito ortostericco. Quando poi il canale ionico subisce depolarizzazione transitoria in condizione fisiologiche (-20 mV), la memantina viene rilasciata dal canale e ha affinità preferenziale per il canale nello stato patologico, è comunque usata nell'Alzheimer da moderato a grave.



Lezione #11 di Chimica Farmaceutica e Tossicologica II del 02/11/2023

Docente: Anna Minarini

Sbominatore: Francesca Marchesciano

Revisore: Alida Giandomenico

Sintesi della fisostigmina

Sintesi classica

Si parte dal 3-metil, 5-etossi, N-metil indolinone. In questa struttura si hanno già due anelli (nella fisostigmina sono 3); si deve creare il terzo anello e bisogna tenere conto dei requisiti stereochimici della fisostigmina: infatti la giunzione degli anelli deve essere in cis. Il primo anello metil pirrolidinico e il secondo quindi saranno perpendicolari fra loro e non complanari.

Si individua il centro reattivo della molecola per poter inserire la catena laterale, che servirà per chiudere il l'anello. Il CH benzilico oltre ad essere tale, ha anche adiacente un carbonile che lo rende il CH benzilico ancora più acido. Non è un acido forte e per strappare l'idrogeno in posizione 3 dell'indolinone si deve utilizzare una base forte quale la sodio ammide.

È possibile eseguire una reazione con il dibromo etano, un dialogenuro alchilico: si deve fare attenzione a evitare la dimerizzazione, ovvero avere due gruppi indolinonici che si legano alle estremità dell'alogenuro alchilico; quindi, lavoro in grande eccesso di dibromo etano.

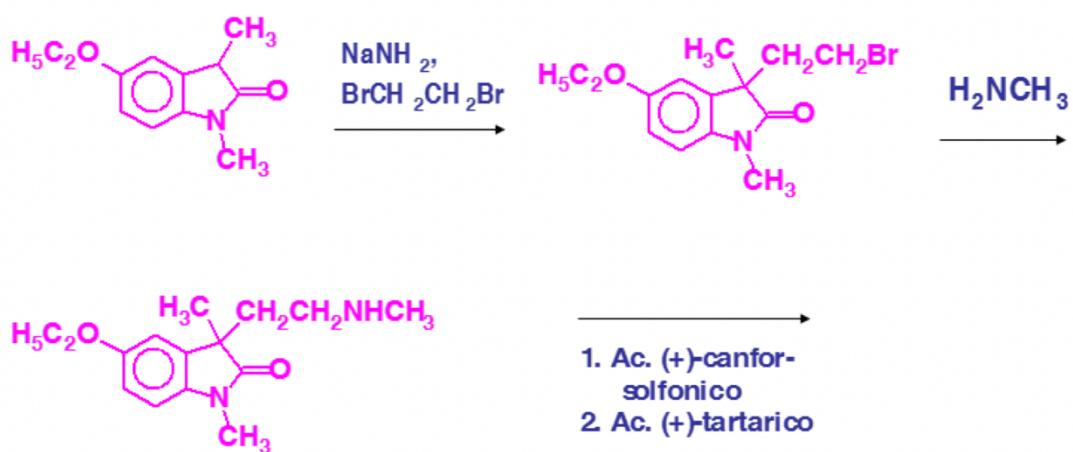
In seguito a questa reazione si avrà un Carbonio legato a 4 gruppi diversi e se ne dovrà tenere conto in quanto la molecola della fisostigmina deve avere i due anelli in giunzione cis; quindi i due sostituenti sui carboni devono essere in posizione β all'anello. Prima di separare gli enantiomeri bisogna legare il gruppo amminico alla catena laterale, necessario per fare la separazione degli enantiomeri.

Si fa reagire l'alogenuro in una sostituzione nucleofila con la metilammina. Si ottiene quindi la catena che poi dovrà essere chiusa sul carbonile, per ottenere il secondo anello a 5 termini. L'azoto è importante per l'interazione con i recettori, in particolare quello sull'ultima metil pirrolidina perché è quello più basico.

In letteratura la sintesi è scritta con la **separazione** dei due enantiomeri attraverso il **metodo dei sali diastereoisomeri** ma con un problema, perché di solito non si trovano due acidi, si procede con un solo acido. Normalmente quando si fa la separazione di enantiomeri con un sale diastereoisomero si utilizza un acido chirale con cui l'ammina fa il sale, che favorisce la precipitazione in forma ionizzata del sale diastereoisomero dell'enantiomero desiderato che si isola per filtrazione. Nello specifico, in questa salificazione con un acido chirale, ciò che si osserva è la precipitazione dell'enantiomero non desiderato, quindi in questo caso si ricorre al metodo del doppio sale: in prima battuta si fa la salificazione con acido + canfor solforico; precipita il sale con l'enantiomero non desiderato e quindi si filtra il sale: le acque sono state arricchite del sale con l'enantiomero desiderato, quello con il metile in beta e il gruppo metil ammino etilico in Alpha.

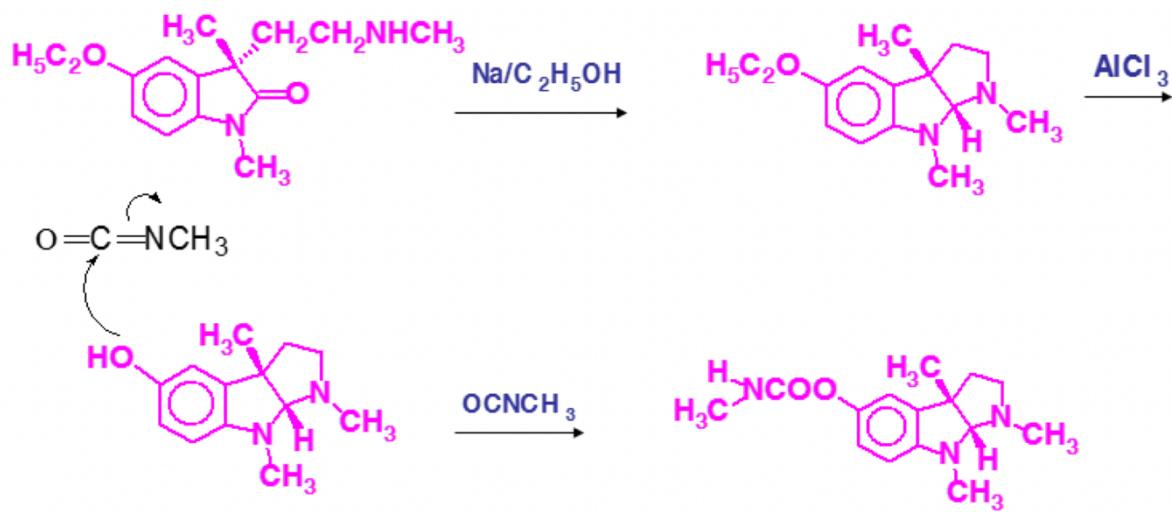
Le acque vengono basificate ed estratte, in modo da ottenere nuovamente l'ammina libera, che per la maggior parte è rappresentata dall'enantiomero voluto.

Avendo arricchito le acque di enantiomero si tratta la base con l'acido + tartarico, favorendo la precipitazione del sale diastereoisomero dell'enantiomero voluto. Si farà una misura al polarimetro per osservare il potere rotatorio specifico di questo sale diastereoisomero che si dovrà cristallizzare più volte (4-5 volte). Dopodiché ogni volta si misurerà il potere rotatorio specifico e quando questo rimane costante, significa che si è ottenuto il diastereoisomero desiderato. A questo punto il sale si basifica, per estrarre e ottenere l'ammina libera che sarà nella forma di enantiomero con la catena CH₂CH₂NHCH₃ in Alpha.



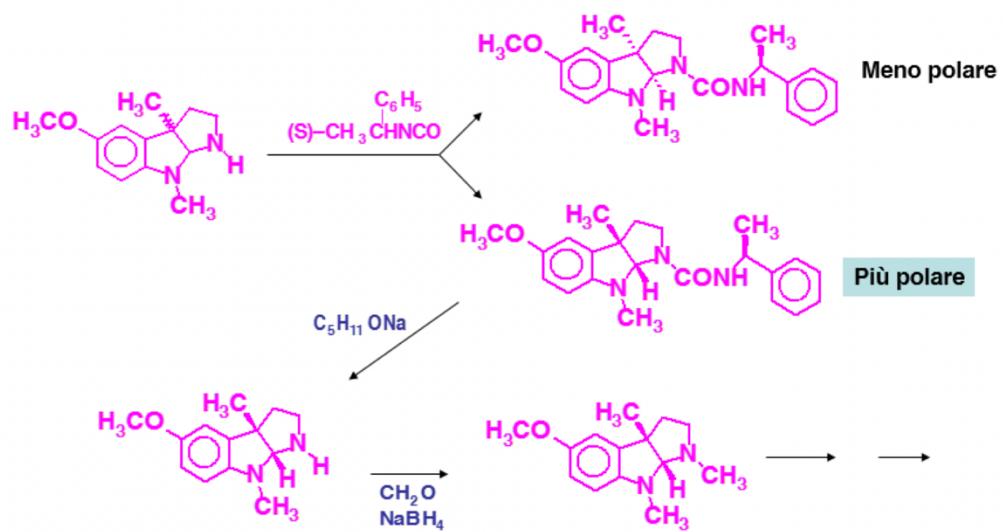
A questo punto è possibile chiudere l'anello in condizioni riducenti, con sodio metallico in alcool etilico, dove la catena separata di enantiomero si trova nella configurazione corretta e dovrà attaccare il carbonile, dove la catena che si trova in Alpha attacherà il carbonile nella parte sotto. Il secondo anello si chiude formando il terzo anello metil pirrolidinico nella faccia Alpha del carbonile e a questo punto in alcuni casi si usa HBr e in altri casi AlCl₃ (questo è migliore). Si deve costruire il carbammato: l'ossigeno viene protetto in forma di etile in quanto, nelle reazioni precedenti, l'OH fenolico avrebbe dato interferenza per cui si dovrà deproteggere per fare il carbammato con il metil isocianato, liberando l'OH fenolico. L'HBr che di solito è il modo migliore per dealchilare, di solito dà la reazione più quantitativa possibile, ma in tal modo si apre l'anello in quanto il carbonio aminico è molto labile; quindi, la resa sarebbe bassa del composto dealchilato. Il metodo migliore è con l'acido di Lewis AlCl₃ che propone delle condizioni più blande, evitando il rischio di aprire l'anello. Come tutti gli acidi di Lewis, ha la funzione di polarizzare l'atomo di ossigeno e facilitare la dealchilazione. L'ultima reazione consiste nella sintesi dei carbammati partendo da un OH. A seconda del carbammato che si vuole ottenere, in questo caso l'N viene metilato con un solo metile, si fa la reazione del gruppo alcolico con

il metilisocianato e si ottiene il carbammato presente nella molecola di Fisostigmina e congiunti, quali neostigmina, piridostigmina.



Sintesi alternativa

Una alternativa è chiudere l'anello senza separare gli enantiomeri. Si va avanti con il centro non smistato, con una miscela (rappresentata con la bisciolina). Per la separazione degli enantiomeri non si fanno dei sali diastereoisomerici ma si fanno degli addotti covalenti.



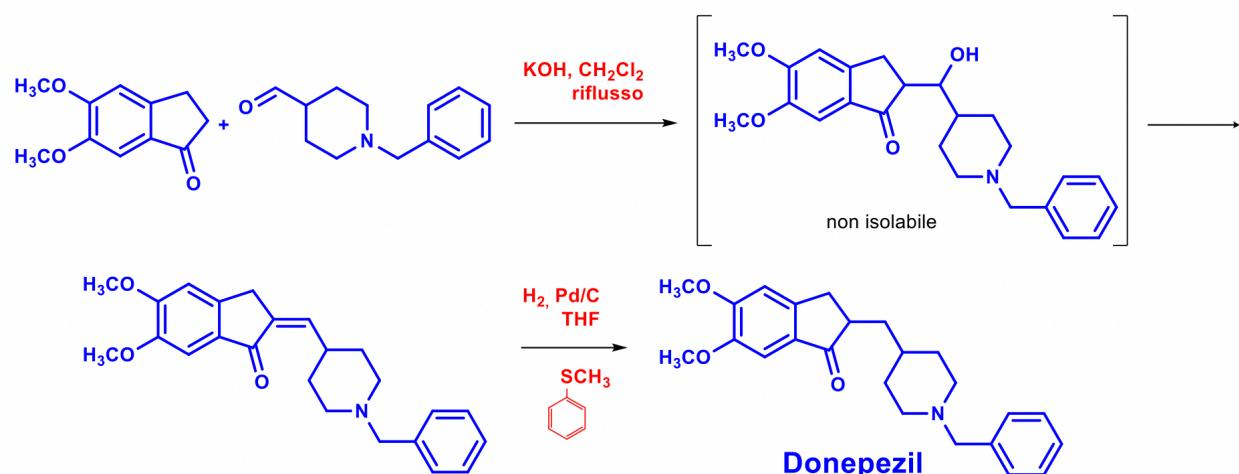
Si tiene libera l'NH che non è metilato e la chiusura si esegue con ammoniaca, si ha un NH₂ che non ha il metile. A questo punto si fanno 2 addotti ureidici, si fa reagire covalentemente l'NH con il fenil-etil-isocianato che ha un centro chirale S. Si ottengono due diastereoisomeri, ma in questo caso il gruppo è legato covalentemente. Dei due diastereoisomeri ciò si desidera quello più polare, quindi è possibile separarli (es. in colonna) e successivamente si deve rompere il gruppo ureidico non necessario operando in ambiente basico con pentolato di sodio. Se si rompe in ambiente acido c'è il rischio di rompere l'anello. Si rompe il gruppo ureidico, si ripristina l'NH ma in tal posizione si deve avere il metile, facendo una metilazione con formaldeide in ambiente riduttore di sodio boro idruro. Da lì la reazione continua con AlCl₃ e metilisocianato.

Sintesi donepezil

Ci sono molte pubblicazioni per l'ottimizzazione della sintesi, specialmente riguardo lo step finale che è importante per ottenere la struttura della molecola di interesse.

L'anello principale del Donepezil è l'anello dell'indanone (one in posizione 1), che può reagire secondo la reazione di Knoevenagel di condensazione aldolica fra un chetone e un'aldeide, in ambiente basico di solito in cloruro di metilene a riflusso. KOH è necessario per strappare l'idrogeno adiacente al carbonile, che può dare l'attacco sul carbonile dell'aldeide. La reazione passa attraverso un intermedio che non si isola perché si ha disidratazione spontanea per la formazione di un carbonile Alpha-beta insaturo, quindi di doppi legami coniugati, originando una struttura stabile.

Ciò che deriva dalla condensazione aldolica è il precursore del Donepezil con il doppio legame. Le relazioni struttura attività suggeriscono l'importanza dei metossili partendo dal 5,6 metossi indanone già metossilato, quindi non vanno toccati. Non si può debenzilare l'ammina, importante per garantire l'interazione con l'enzima e le SAR dicono anche che il carbonile è importante per l'interazione e non può essere modificato.



Il doppio legame deve essere modificato per garantire libera rotazione che in questo modo è impedita. Riducendolo che però vede grande difficoltà perché nella molecola si ha un benzile e un carbonile, i quali nelle condizioni in cui si deve ridurre il doppio legame potrebbero saltare (benzile) e ridursi a OH (carbonile). Un metodo per diminuire la reattività della idrogenazione catalitica è l'avvelenamento del catalizzatore che prevede l'utilizzo di derivati dello zolfo. Questa reazione è stata ampiamente studiata per avere la maggiore resa; il migliore risultato si ottiene utilizzando tioanisolo al 43% circa. In questo modo l'avvelenamento del catalizzatore evita la riduzione del carbonile ad alcool e la debenzilazione dell'azoto. La reazione conterrà anche delle piccole quantità dei due sottoprodoti che dovranno essere separati dal prodotto voluto utilizzando una colonna cromatografica.

IL SISTEMA ADRENERGICO

Il sistema simpatico è il principale sistema alla base degli effetti cardiovascolari del sistema nervoso periferico e non volontario.

La caratteristica principale dei neurotrasmettitori è la presenza delle catecolamine alla base dell'attività di questo sistema. Catecol-ammine perché sono delle fenil-etil-ammine e sul fenile si ha la presenza di due OH in orto fra di loro, l'anello si chiama appunto catecolo.

Le catecolamine si distinguono in 3 molecole che sono: noradrenalina, in cui è presente un gruppo amminico primario terminale quindi R'' è un idrogeno, in posizione beta rispetto al gruppo amminico primario si trova un gruppo OH che rende la molecola chirale. Importantissima la chiralità perché l'eutomero ha configurazione R.

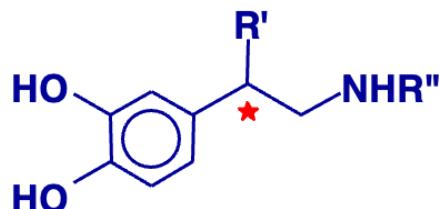
L'altra catecolamina è l'adrenalina, la quale ha un gruppo amminico secondario terminale sostituito con un metile. Analogamente alla noradrenalina (nor perché manca di un metile), ha un centro chirale e ovviamente dovendo interagire sullo stesso sistema dovrà avere configurazione R.

La noradrenalina è il neurotrasmettore vero e proprio del sistema adrenergico mentre l'adrenalina viene sintetizzata a livello delle ghiandole surrenali ed è considerato un neuromormone. Agiscono entrambi sugli stessi recettori adrenergici. L'altra catecolamina è la dopamina, ma a differenza delle precedenti manca dell'OH in catena laterale quindi non ha centri chirali e termina con un gruppo amminico primario.

La dopamina è un precursore nella sintesi di noradrenalina che però ha un suo sistema a parte.

Fino agli anni '60 si pensava fosse solo questo, poi si sono scoperti i recettori dopaminergici e il sistema dopaminergico con un suo sistema di recettori a parte.

↑
Attivazione



Adrenalina: R' = OH; R'' = Me
Noradrenalina: R' = OH; R'' = H
Dopamina: R' = R'' = H

Principali problemi della molecola

L'anello catecolico è instabile, dà origine ad un anello per ossidazione ortochinolico che porta alla perdita dell'attività, in quanto il catecolo è un punto importante dell'interazione. Inoltre, a livello metabolico l'anello catecolico viene in qualche modo inattivato tramite la metilazione dell'OH in meta che porta a perdita dell'attività noradrenergica. Un alto punto di labilità della molecola è rappresentato dal gruppo amminico che è soggetto a deaminazione ossidativa a carico, sempre a livello biologico, delle MAO.

Biosintesi e metabolismo delle catecolammine

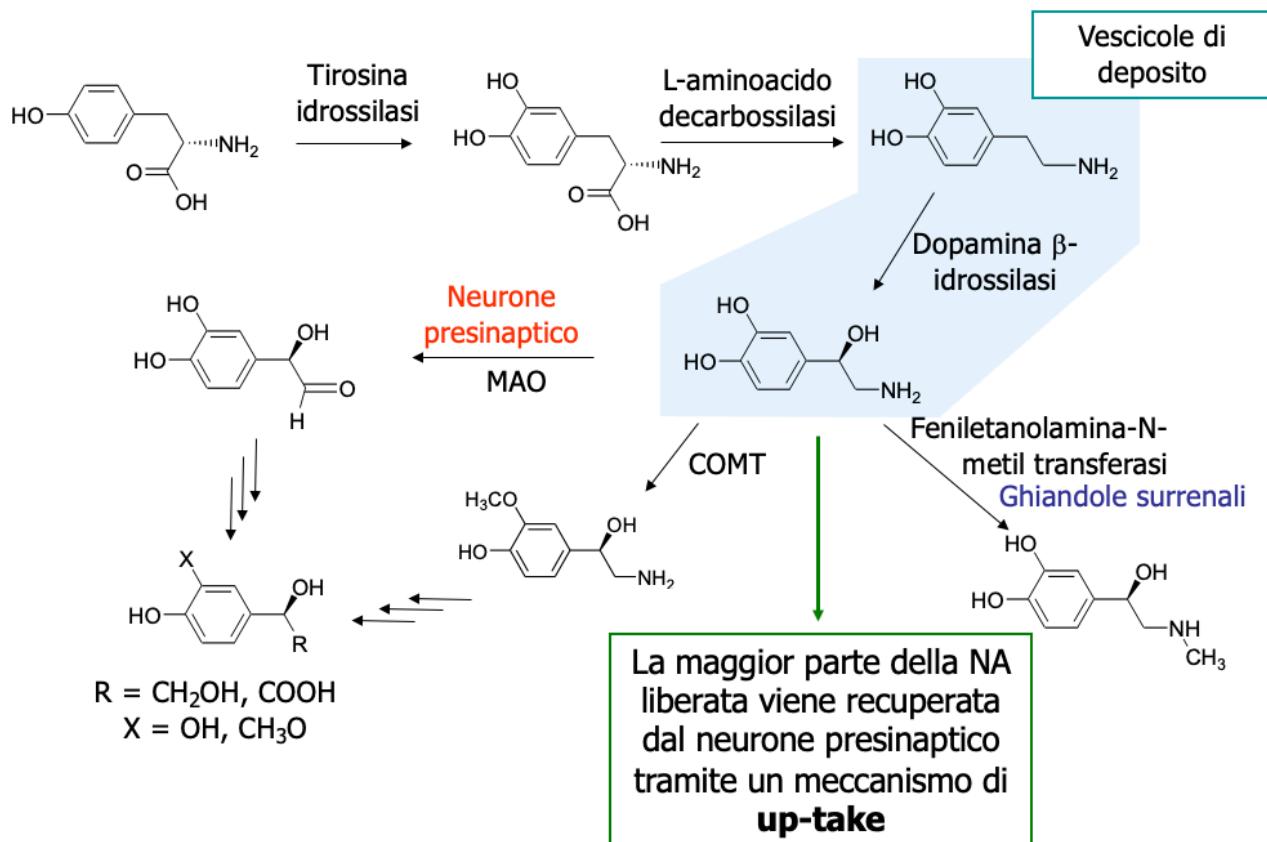
Si parte da un precursore amminoacidico, cioè la tirosina, con OH in para. La prima reazione che deve avvenire è l'ossidrilaione dell'anello fenolico della tirosina, catalizzata dall'enzima è la tirosin idrossilasi che dà origine alla formazione l'anello catecolico. L'intermedio è un derivato dell'amminoacido tirosina e si chiama Levo-dopa che ha un centro chirale L; Il Levo-dopa per azione della L-dopa decarbossilasi viene decarbossilato a dopamina che è il precursore. La dopamina è anche un neurotrasmettore, quindi nei neuroni dopaminergici la sintesi si ferma qui.

Nei neuroni adrenergici si ha un corredo enzimatico che porta avanti la reazione per la sintesi di noradrenalina, quindi tramite la dopamina beta idrossilasi perché inserisce un gruppo OH in posizione beta rispetto al gruppo amminico, avviene l'aggiunta di un OH che dà origine a un centro chirale. La noradrenalina è biosintetizzata in forma R levogira. Questo avviene nel neurone.

A livello delle ghiandole surrenali, dove l'impulso dei recettori nicotinici stimola la produzione di adrenalina. La ghiandola surrenale è considerata come un ganglio, con la fibra pre gangliare di acetilcolina che attiva i recettori nicotinici gangliari presenti sulla ghiandola i quali danno origine all'impulso per la sintesi di adrenalina. Una volta arrivato questo impulso, la ghiandola surrenale ha anche un altro enzima, definito **feniletanolammina N metil transferasi**, con la funzione di metilare l'azoto amminico primario della noradrenalina in azoto amminico secondario, formando l'adrenalina dalla noradrenalina. Questo è un enzima presente solo nelle ghiandole surrenali. Come detto precedentemente, noradrenalina e adrenalina reagiscono nello stesso modo sui recettori adrenergici.

La terminazione dell'azione avviene in 3 modi:

1. È presente una proteina di membrana trasportatrice presente nella membrana presinaptica che è alla base del processo di ricaptazione del Neurotrasmettore (re-uptake) dalla fessura sinaptica. La noradrenalina è molto polare quindi la ricaptazione avviene con un trasporto attivo a carico proteine trasportatrici e non per diffusione passiva.
2. All'interno del terminale presinaptico, a carico delle mono-amminoossidasi, le quali producono una degradazione ossidativa del gruppo amminico portando alla formazione della corrispondente aldeide con la liberazione dello ione ammonio. L'aldeide poi può subire ulteriore ossidazione o riduzione, formando i corrispondenti gruppi carbossilico se ossidata, si forma il corrispondente alcol se ridotta.
3. Enzimi COMT (catecol-O- metil transferasi) i quali metilano l'OH in meta rispetto all'inserzione della catena laterale che viene trasformato in gruppo metossilico.



Le due reazioni possono avvenire anche insieme, la degradazione può avvenire anche sul prodotto delle COMT e entrambe portano a una miscela di composti, contemporaneamente degradati sul gruppo amminico e metilati sull'OH in meta del catecolo.

ADRENERGICI ALFA AGONISTI

Nel caso specifico della noradrenalina il meccanismo di terminazione dell'azione è svolto non solamente da enzimi del catabolismo, come le MAO e le COMT, ma anche in maniera massiccia da una ricaptazione. La ricaptazione delle ammine biogene è uno dei meccanismi con cui si può interferire anche nell'attività biologica. In particolare, vedremo gli agonisti indiretti alfa, anche sul sistema serotoninergico e l'inibizione di questo meccanismo porta ad un aumento delle catecolammine e della serotonina e questo è uno dei meccanismi con cui si ottiene un'azione antidepressiva, ovvero gli inibitori del reuptake della serotonina.

Anche in questa classe non vedremo solo molecole che agiscono con un meccanismo diretto, ma anche indiretto perché si può andare ad interferire su altri target che sono le MAO e le COMT e le proteine di membrana che esercitano un'azione di reuptake tramite l'aiuto dell'ATP (trasporto attivo).

NOTA: la noradrenalina si trova sia come NA che come NE perché in alcuni testi si trova anche come norepinefrina.

Sinapsi adrenergica

All'interno del neurone si ha il meccanismo di biosintesi.

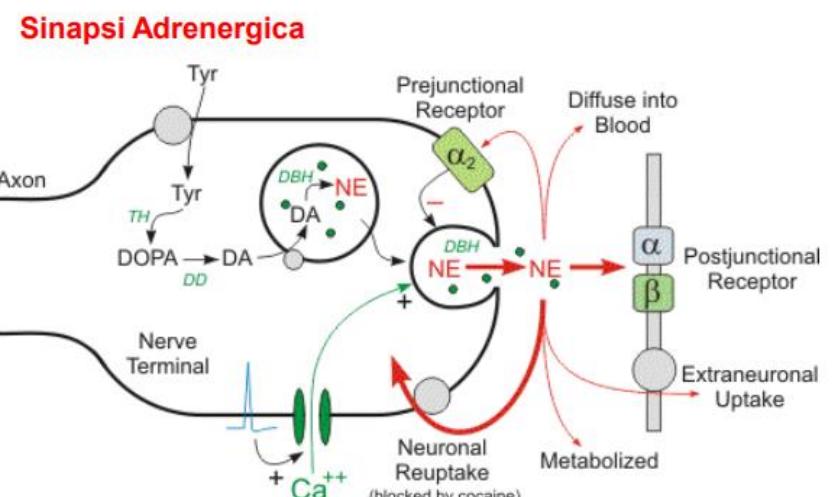
I recettori sono sia localizzati presinapticamente che postsinapticamente.

Il sottotipo maggiormente rappresentato a livello presinaptico è α_2 , come i muscarinici che sono M2.

Come la maggior parte di questi autocettori, α_2 agisce con un meccanismo a feedback negativo, cioè la stimolazione di questi recettori presinaptici porta ad una diminuzione dell'ulteriore rilascio di noradrenalina.

Oltre al sottotipo α_2 , ci sono i recettori postsinaptici, che vengono classificati in due grandi classi: gli α e β .

Degli α si conoscono due sottotipi, ovvero gli α_1 che sono postsinaptici e gli α_2 , invece, sono maggiormente presenti a livello presinaptico, ma si trovano anche a livello postsinaptico.



Tyr = tyrosine; TH = tyrosine hydroxylase; DD = DOPA decarboxylase; DA = dopamine; DBH = dopamine β -hydroxylase; NE = norepinephrine

Gli α 1 e α 2 sono stati ulteriormente classificati in vari sottotipi. In particolare, gli α 1 sono classificati in α 1A, α 1B e α 1D.

I recettori β sono di tre sottotipi, cioè β 1, β 2 e β 3.

A seconda del recettore stimolato (α 1, α 2 e β) si ha un diverso accoppiamento alle proteine G e si ha una diversa localizzazione di questi recettori a livello degli organi effettori.

Ci sono anche delle proteine presinaptiche che sono deputate al trasporto attivo e al reuptake dell'adrenalina e noradrenalina. Oltre a questo trasporto attivo, si ha anche un trasporto attivo per la dopamina.

Oltre al trasporto attivo a livello della membrana presinaptica, anche nell'assone e nel terminale presinaptico si hanno dei trasportatori sulla membrana vescicolare che sono deputati al trasporto della dopamina all'interno delle vescicole sinaptiche, dove per la maggior parte avviene la biosintesi della noradrenalina. Dalle vescicole, mediante un meccanismo di esocitosi calcio mediata, si ha la fuoriuscita di noradrenalina all'arrivo dell'impulso.

Classificazione dei recettori adrenergici

Con gli anni sono state classificate le varie sottoclassi fino ad arrivare alla situazione attuale, fino ad arrivare alla situazione attuale.

Inizialmente sono stati classificati i recettori α separati dai β mediante dei ligandi selettivi per l'uno e per l'altro.

Gli α , poi, sono stati classificati in α 1 e α 2 e i β in β 1, β 2 e β 3. Gli α 2 sono classificati in tre sottotipi: α 2A, α 2B e α 2C.

La più recente classificazione è a carico degli α 1.

Inizialmente erano stati classificati in α 1A, α 1B e α 1C, poi si è scoperto che α 1A era identico a α 1C. Per cui il recettore che è stato ulteriormente scoperto ha la numerazione α 1D.

Quali sono gli effetti mediati da questi sottotipi recettoriali?

Quando si parla di recettori adrenergici e localizzazione, quella che si vede è la localizzazione prevalente perché è possibile trovare a livello di uno stesso tessuto più di un sottotipo recettoriale, ma l'azione esplicata è mediata dal recettore che è presente in maggior quantità.

A livello del **cuore**, organo maggiormente controllato dall'adrenergico, a differenza del colinergico si hanno tutti effetti di tipo stimolatorio, cioè si aumenta la frequenza cardiaca, la forza di contrazione, la velocità di conduzione e l'automatismo e velocità di conduzione nel nodo atrioventricolare.

Sono tutti effetti batmotropo, cronotropo, inotropo, dromotropo positivi mediati dal recettore che si trova maggiormente concentrato a livello cardiaco, ovvero il β 1. Il rapporto β 1 e β 2 a livello del cuore è di tre volte β 1 rispetto ai β 2. L'effetto che si vede è prevalentemente mediato dai β 1, che sono quelli presenti in maggior quantità.

A livello del tessuto cardiaco, non nel nodo atrioventricolare dove ci sono solo i β 1 e β 2, ci sono anche gli α 1 che vanno sempre nella stessa direzione di stimolazione. I β 1 sono quelli prevalenti, poi si va a scalare. Quindi quello che si vede è un effetto mediato dai β 1.

Quando si parla di stimolazione dei recettori adrenergici a livello cardiaco ci si riferisce prevalentemente ai β 1, quindi quando si parlerà di β -bloccanti ci si riferirà prevalentemente agli effetti di diminuzione della forza di contrazione a livello cardiaco.

A livello delle **muscolatura liscia intestinale** il sistema colinergico ha un effetto di contrazione e spesso dove un sistema stimola, l'altro inibisce. Qui sono presenti gli α_1 , α_2 , β_1 e si osserva una diminuzione della motilità e del tono. L'effetto prevalente visibile a livello della muscolatura liscia è quello mediato dal muscarinico, ma esistono anche recettori adrenergici con un effetto di rilassamento della muscolatura.

Sugli **sfinteri**, come i recettori muscarinici, gli adrenergici hanno un effetto di aumento della contrazione degli sfinteri. In alcuni distretti, soprattutto gli α_1 , mediano questo effetto di contrazione.

A livello dei **polmoni** ci sono due effetti contrastanti, ma quello maggiormente visibile è quello della broncodilatazione che è mediata dai recettori β_2 che si trovano prevalentemente a livello dei bronchi con un rapporto rispetto ai β_1 di 3/4 volte e quindi in questo caso l'azione è mediata prevalentemente dai recettori β_2 .

Gli α , invece, hanno un effetto di broncocostrizione, ma i recettori presenti in maniera prevalente sono i β_2 ; quindi, l'effetto principale è un effetto di broncodilatazione.

A livello della **vescica dell'utero** ci sono principalmente i β_2 che danno un effetto di rilassamento della muscolatura liscia sia vescicale che uterina.

Differentemente dai β_2 , a **livello prostatico** ci sono i recettori α_1 , la cui stimolazione dà luogo a contrazione, tanto che nell'ipertrofia prostatica benigna i farmaci che si usano sono degli antagonisti α_1 adrenergici, perché hanno appunto un effetto di rilassamento sulla muscolatura liscia inibendo l'attività α_1 .

Molto importante è il ruolo svolto a livello **vascolare** dall'adrenalina e noradrenalina. Sulle arteriole coronarie, polmonari, dell'apparato digerente e renali, gli α_1 mediano vasocostrizione, anche gli α_2 sono presenti a livello di questi distretti vascolari, ma con una percentuale molto minore rispetto a quella degli α_1 . Anche in questo caso l'effetto vaso costrittore che si vede è mediato dagli α_1 .

Gli α_2 a livello periferico hanno un effetto di vasocostrizione, ma minore rispetto agli α_2 . La loro localizzazione presinaptica è utilizzata per avere un effetto ipotensivo mediato centralmente.

I β_1 e β_2 con ruolo meno importante sulle arteriole danno vasodilatazione, ma l'effetto adrenergico prevalente è quello degli α_1 e quindi un effetto di contrazione. La vasocostrizione data dagli alfa 1 agonisti è usata per aumentare l'effetto degli anestetici perché l'anestetico rimanga maggiormente nella sede.

Sulla **muscolatura scheletrica** gli α_2 sono quelli che mediano glicogenolisi, mentre a livello epatico si hanno anche gli α_1 che mediano invece glicogenogenesi, ma anche in questo caso l'effetto prevalente è mediato da uno solo dei due recettori, ovvero dagli α_1 a livello epatico e dagli α_2 sulla muscolatura scheletrica.

Sulle **ghiandole esocrine** hanno un effetto che va in linea con quello dell'acetilcolina e si ha quindi prevalentemente la secrezione a livello lacrimale, a livello salivare e a livello delle ghiandole sudoripare, mentre a livello delle ghiandole gastriche gli α_2 mediano principalmente una riduzione della secrezione.

I β_3 modulano la lipolisi a livello del **tessuto adiposo**. In realtà non si hanno ancora dei farmaci β_3 selettivi che agiscono per avere questo effetto terapeutico.

Eventi successivi all'attivazione

Oltre ad una localizzazione diversa nei vari tessuti, i sottotipi sono associati a diverse proteine G.

1. I recettori α_1 sono accoppiati alla proteina Gq quindi ad un aumento della fosfolipasi C e quindi ad un aumento delle correnti del calcio;
2. I recettori α_2 sono accoppiati alla Gi e quindi portano ad una riduzione dell'adenilato ciclasi e dell'cAMP, ad un aumento dei canali del potassio e ad una diminuzione di quelli del calcio.
3. Tutti i β sono associati a proteine Gs.

Recettori α -adrenergici

Soprattutto per quanto riguarda gli agonisti, non si hanno dei recettori attivati prevalentemente da un ligando piuttosto che da un altro; quindi, si parlerà in generale di α_1 e α_2 . Per gli antagonisti, invece, si è raggiunta una selettività soprattutto a livello prostatico: le molecole che hanno un effetto di inibizione della prostata hanno anche un'azione di inibizione della vasocostrizione e quindi sono anche degli agenti ipotensivi. La selettività è più ricercata per avere meno effetti collaterali.

RECEPATORI α_1

Funzione principale mediata: vasocostrizione.

RECEPATORI α_2

Le funzioni mediate sono più complesse perché oltre ad avere una localizzazione periferica postsinaptica, per la quale esercita un ruolo di vasocostrizione, sono presenti anche a livello presinaptico dove modula in maniera negativa il rilascio di noradrenalina e soprattutto la sua azione centrale.

Funzioni medicate:

- rilascio NA (presinaptici)
- vasocostrizione
- regolazione termica
- pressione intraoculare
- ipotensione (CNS) che spesso è accompagnato da effetti collaterali, ovvero la sedazione (CNS), l'analgesia (CNS) e il rilassamento muscolare (CNS)

Un'altra azione è nei colliri anti-glaucoma in quanto mediane sia una diminuzione della produzione di umor acqueo sia ne facilitano il deflusso.

Un altro effetto collaterale, cioè non voluto, mediato a livello centrale è quello dell'analgesia che non è mediata dai recettori oppioidi, ma il meccanismo d'azione non è chiaro. Un effetto collaterale degli agonisti α_2 adrenergici è la secchezza delle fauci per una diminuzione della secrezione dalle ghiandole salivari.

RECEPATORI α_1 -ADRENERGICI (caratteristiche)

Specie nativa	α_{1A}	α_{1B}	α_{1D}
Specie clonata	α_{1a} (α_{1c})	α_{1b}	α_{1d} ($\alpha_{1a}, \alpha_{1a/d}$)
AA	466	519	572
Effettore	G_q	G_q	G_q
Distribuzione	Cuore, fegato, corteccia cerebrale, prostata, polmone, vaso deferente	Rene, milza, aorta, polmone, corteccia cerebrale	Aorta, corteccia cerebrale, prostata, ippocampo

AGONISTI α -ADRENERGICI (saggi biologici)

Funzionali (Organi isolati)

α_{1A} : vaso deferente di ratto, prostata di cane

α_{1B} : cuore, fegato e milza di ratto

α_{1D} : aorta di ratto

α_{2A} : vena safena di cane

α_{2B} : polmone e rene di ratto

α_{2C} : arteria caudale di ratto

Binding

Agonisti α -adrenergici

Quali sono le strutture chimiche che agiscono andando ad attivare questi recettori adrenergici?

L'idea iniziale è quella di mimare l'effetto del neurotrasmettore endogeno; quindi, la prima classe di agonisti va sotto il nome di **feniletilammime** ed è lo scheletro base di adrenalina e noradrenalina, le quali sono delle catecolfeniletanolammine, ma avendo fatto delle modifiche il catecolo non c'è più e quindi la classe generale si chiama feniletilammime.

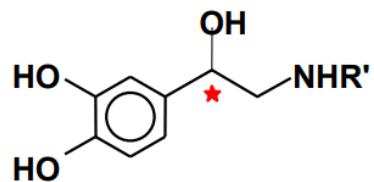
Oltre a queste, l'altra classe in cui vengono classificati gli agonisti adrenergici è la classe delle **imidazoline** che sono ulteriormente suddivise in **benzimidazoline** e **amminoimidazoline**.

La classe delle feniletilammime deriva direttamente dai neurotrasmettitori, mentre la classe delle imidazoline è diversa.

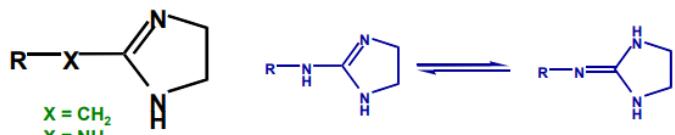
Le benzimidazoline hanno un effetto prevalentemente periferico, mentre le amminoimidazoline (che possono dare origine a tautomeria ad immino imidazolidine), hanno un effetto prevalentemente centrale e sono le strutture a cui è associata un'attività α_2 adrenergica.

AGONISTI α -ADRENERGICI

• FENILETILAMMINE



• IMIDAZOLINE



FENILETILAMMINE

Non è mai stata sconfessata l'ipotesi farmacoforica, cioè di interazione del neurotrasmettore e quindi vale ancora quella del 1933. Tale ipotesi prevede **tre punti importanti di interazione** che sono stati chiamati sito A, H e P.

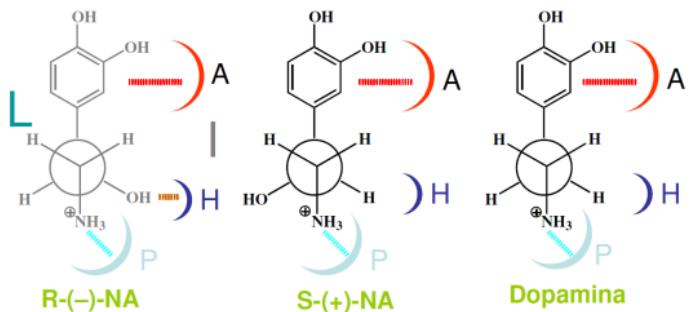
Il **sito P** è il sito in cui l'ammina protonata a pH fisiologico va ad interagire con un **aspartato** conservato nel terzo dominio transmembrana. È un'interazione più forte di quella semplice elettrostatica perché si ha un legame idrogeno rinforzato dalla carica o un legame ionico rinforzato dal legame ad idrogeno. Questo è il legame guida che avviene tra l'ammina protonata e il recettore.

Il **sito H** è un sito puro in cui va ad interagire con un legame idrogeno l'OH in catena laterale (la configurazione dell'OH deve essere R). Tale OH intercetta sul recettore una **serina** con cui dà un legame ad idrogeno.

Il **sito A** sta per “aromatico”, dove avviene l’interazione dell’anello catecolico. Avendo il catecolo due gruppi OH, si ha anche un legame ad idrogeno con l’OH in meta rispetto alla catena laterale.

Il **lato I** dove I sta per “idrofilo” perché è dove si trovano i gruppi più idrofili coinvolti nei legami; mentre l’altro lato, dove non si instaurano questi legami, è detto **lato L** che sta per “lipofilo”.

Ipotesi di Easson-Stedman (1933)



A, H e P indicano rispettivamente i siti di legame del nucleo aromatico, dell’ossidrile alcolico e della funzione basica.
Con L ed I sono indicati rispettivamente il lato lipofilo e quello idrofilo della molecola.

L’OH sta dall’altra parte nell’enantiomero S e stando dall’altra parte viene a mancare un importante legame ad idrogeno con il recettore, cioè con il sito H, dove c’è una serina. E l’inserimento di un legame ad idrogeno in una molecola che ha già un’interazione porta ad una notevole diminuzione dell’energia libera e quindi a un aumento dell’affinità della molecola per il recettore.
Se si paragona la configurazione S con la conformazione della dopamina (nel caso della dopamina si ha una conformazione perché non ci sono dei centri chirali), queste sono molto simili.
La dopamina e la S-noradrenalina hanno un’affinità analoga per il recettore ed è più di 100 volte minore rispetto a quella della R-noradrenalina che l’enantiomero attivo proprio perché viene a mancare questo legame ad idrogeno.

IPOTESI DI EASSON STEDMAN

Questa ipotesi non è mai stata smentita dopo la sua formulazione e descrive quali sono i punti con cui i derivati interagiscono con il recettore:

-sito A sono le interazioni che forma l'anello catecolico, sono interazioni pigreco-pigreco

-sito L legami a ponte idrogeno che formano gli OH del catecolo

-sito H legame a ponte idrogeno che l'OH in catena laterale che forma con la serina del sito attivo

- vi è anche il sito P dove l' ammina protonata a pH fisiologico va ad interagire con un aspartato del terzo dominio transmembrana. E' un'interazione molto forte perché si forma un legame ionico rinforzato da un legame ad idrogeno questo conferisce una forma maggiore rispetto ai due legami distinti.

Il lato contenente i siti A H P è il lato I ovvero idrofilo perché ci sono solo gruppi idrofili, l'altro lato è il lato L ovvero lipofilo.

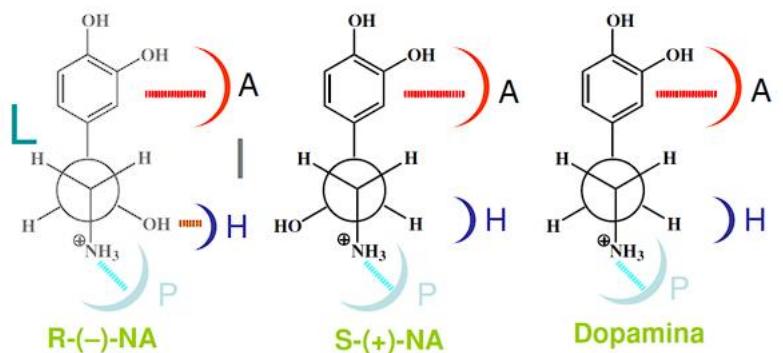
Andando a valutare le interazioni dell'eutomero e del distomero noto che nel distomero l'OH della catena laterale si trova a sinistra (enantiomero S) e questo causa l'assenza di un legame a ponte idrogeno con il sito H in cui vi è la serina, questo causa un aumento dell'energia libera del sistema con conseguente diminuzione dell'affinità della molecola per il recettore. Questa conformazione è quella della dopamina, infatti, questa molecola e la S-noradrenalina hanno una affinità per il recettore analoga che è 100 volte minore rispetto all'enantiomero R questo spiega la diversa attività.

Le modifiche che sono state fatte sulla molecola servono per aumentare la **stabilità** della molecola in quanto l'anello catecolico è un punto labile perché è facilmente ossidabile ad ortochinone con perdita dell'attività e inoltre è labile al metabolismo da parte delle o-metiltransferasi che trasferiscono un metile sull'**OH** in meta del catecolo trasformandolo in metossile.

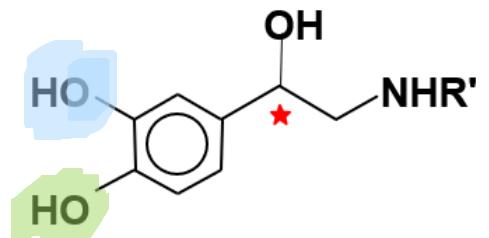
Il trasferimento sull'**OH** avviene anche per la presenza in orto del secondo **OH** quindi questo favorisce la metilazione nell'**OH** in meta, per cui se elimino l'**OH** in para aumenta la stabilità della molecola; non ho più il rischio di ossidazione ad ortochinone e contemporaneamente sfavorisco la trasformazione in metossile

Meta e para si riferiscono alla catena laterale, mentre gli OH sono in orto tra di loro

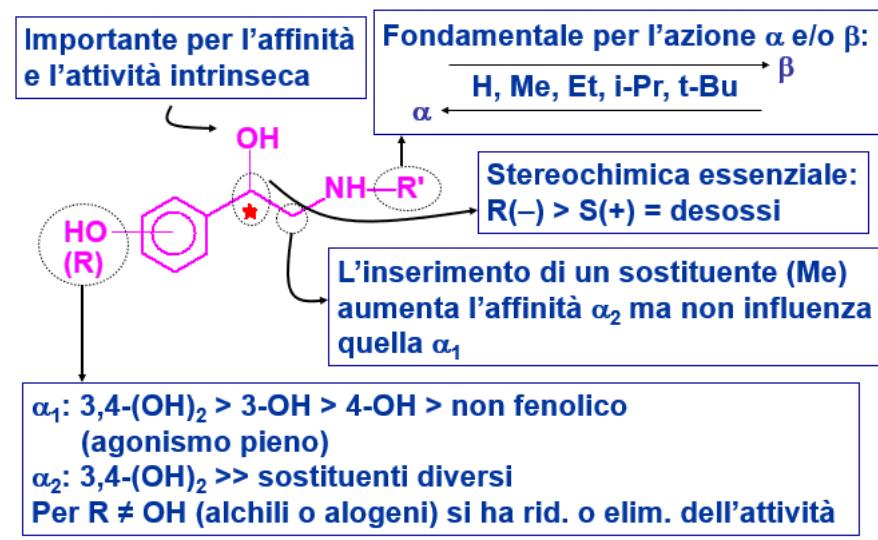
Ipotesi di Easson-Stedman (1933)



A, H e P indicano rispettivamente i siti di legame del nucleo aromatico, dell'ossidrile alcolico e della funzione basica.
 Con L ed I sono indicati rispettivamente il lato lipofilo e quello idrofilo della molecola.



AGONISTI α -ADRENERGICI (feniletilammime: SAR)



Il centro chirale: OH deve essere R altrimenti si perde l'attività.

Il sostituente sul gruppo amminico: nella noradrenalina si ha un'ammina primaria, adrenalina invece contiene un'ammina secondaria. È possibile inserire altri gruppi? Sì ma con diversa selettività, adrenalina e noradrenalina attivano tutti i sottotipi recettoriali sia alpha che beta,

- se si inserisce un etile al posto del metile su adrenalina l'attività sul recettore è sia alpha che beta,
- se si inserisce un isopropile la molecola si chiama isoprenalina si ottiene una selettività maggiore per beta (sia 1 che 2) rispetto ad alpha,
- se si inserisce un ter-butile, quindi un gruppo molto ingombrante, si ottiene una selettività solo per beta2.
- Quindi separo l'attività su un recettore o su un altro cambiando i sostituenti su R'.

In catena laterale è possibile inserire sostituenti solo se sono molto piccoli, di solito metile. Inserendo un sostituente si crea un secondo centro chirale quindi si ottengono dei diastereoisomeri, ciò non incide sull'attività alpha 1, se si inserisce il metile in configurazione S si ha un aumento dell'affinità per alpha 2, (in genere l'alpha 2 è più restrittivo di alpha 1).

Modifiche sull'anello catecolico: la situazione ideale è avere entrambi i gruppi OH ma è possibile eliminare il para per aumentare la stabilità dell'anello e conservare l'attività alpha 1 adrenergica, e l'attività viene mantenuta (diminuisce) se mantengo il para ed elimino il meta, sempre per quanto riguarda il recettore alpha 1. Se si eliminano entrambi gli OH diminuisce l'attività alpha 1 ma si mantiene l'alpha adrenergica indiretta. Per gli alpha due se si elimina anche solo un OH si perde l'attività su questo recettore, quindi non possono essere fatte modifiche, se si inseriscono sostituenti diversi ad esempio 2 atomi di cloro si passa da un agonismo pieno ad agonismo parziale ed è vero sia per gli alpha che per i beta.

FENILETILAMMINE SAR

Si va a modificare la molecola per avere maggiore selettività nei confronti di alpha1 inserendo dei gruppi bioisosterici ad esempio inserendo un gruppo metilsulfonamminico al posto dell'OH in meta.

Un ligando che mantiene attività alpha 1 e non ha attività alpha 2 la metossammina dove i metossilici sono in orto e meta rispetto alla catena laterale, questi metossili in vivo vengono demetilati e si ottengono gli OH in meta che agiscono solo su alpha 1.

Per ciclizzazione del secondo anello è possibile avere solo azione centrale su alpha 1 perché la molecola è molto lipofila e attraversa barriera ematoencefalica.

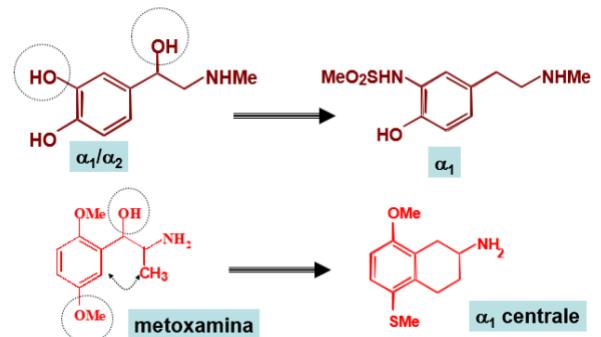
La sostituzione di tipo bioisosterica è stata applicata anche per le molecole che agiscono sui recettori beta e si va a mimare l'azione dell'OH perché mantiene delle caratteristiche elettroniche e di formazione di legami analoghe, OH fenolico è debolmente acido così come anche NH è debolmente acido perché è possibile delocalizzare la carica sullo zolfo, inoltre NH può formare legami a ponte idrogeno l'unica obiezione può essere l'ingombro sterico ma evidentemente un gruppo più grande non interferisce con l'attività.

Le molecole usate in terapia sono:

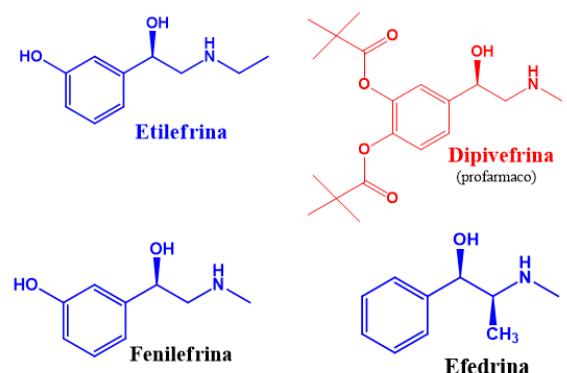
- **etilefrina** in cui manca l'OH in para così non ho la metilazione è usata nello scompenso cardiaco, non si ha il catabolismo delle COMT. Il nome etilefrina riprende l'etile legato al gruppo amminico

- **dipivefrina**: (profarmaco) ha la struttura base dell'adrenalina e gli OH sono protetti come esteri dell'acido pivalico che verranno eliminati dalle esterasi ematiche ripristinando gli OH catecolici. Viene usata in colliri per il trattamento del glaucoma

- **fenilefrina** ed **efedrina**: sono decongestionanti nasalì usati con cautela perché hanno due effetti collaterali importanti ovvero hanno azione ipertensiva e a livello della mucosa nasale l'uso cronico porta ad ipertrofia della mucosa nasale. (alfa1). L'efedrina ha un CH₃ in più, è quindi un derivato delle propilfenilammime.



Agonisti α-adrenergici



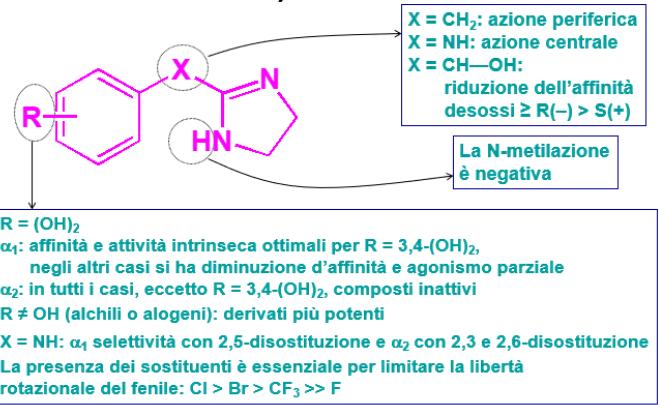
IMIDAZOLINE

A questa classe appartengono due tipi di molecole:

- se X è un CH₂: **benzimidazoline** che hanno azione periferica, la maggior parte sono usati come decongestionanti nasalì

- se X è NH: **amminoimidazoline** che danno origine per tautomeria alle imminoimidazolidine ciò comporta che viene sfavorita la protonazione dell'azoto e quindi hanno un'azione centrale perché sono più lipofile, questa caratteristica è stata sfruttata per ottenere una maggiore selettività alpha2.

AGONISTI α-ADRENERGICI (imidazoline: SAR)



1. Benzylimidazoline:

Se viene inserito un gruppo OH su CH₂ si osserva una diminuzione dell'attività, quindi l'OH che nelle feniletilammine è fondamentale per l'attività in questa classe non lo è. Inoltre l'anello aromatico può essere sostituito in varie posizioni, se si inseriscono 2 OH in 3 e 4 l'attività viene conservata, si è visto che aumenta la potenza se vengono inseriti degli alogeni in posizione diverse da 3 e 4 in particolare in 2 e 5 il cloro da selettività alpha1, se vengono inseriti in 2 e 6 si ha maggiore selettività alpha 2 e succede soprattutto per le amminoimidazoline.

I sostituenti adiacenti alla catena laterale hanno anche un certo ingombro quindi la catena non è complanare all'anello ma è perpendicolare, quindi gli alogeni sono indispensabili per la conformazione della catena.

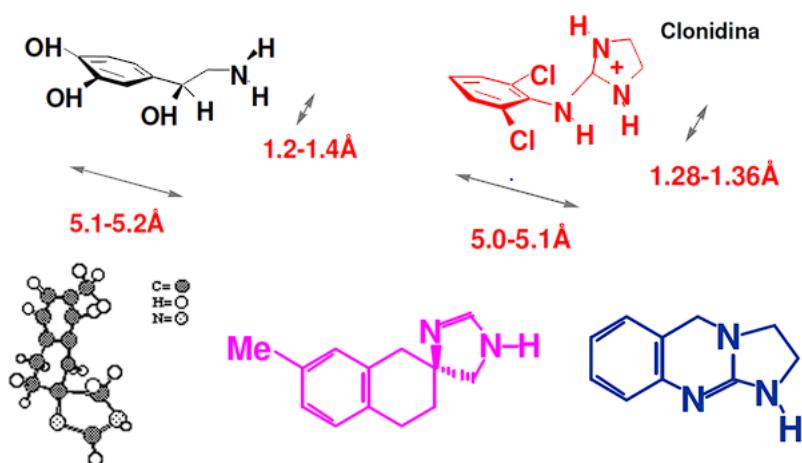
Inoltre non è possibile metilare l'azoto della imidazolina.

Per quanto riguarda l'anello aromatico ci possono essere vari sostituenti sia aromatici che alifatici.

Queste molecole hanno azione periferica e vengono usate come decongestionati nasali i cui effetti collaterali sono ipertrofia dei seni nasali e ipertensione.

Confronto tra noradrenalina e imidazolina usata in terapia (clonidina):

Si nota che le catene laterali sono disposte in modo diverso, l'orientazione della catena laterale nella clonidina dà selettività alpha 2 centrale ed agisce come agonista. Nella noradrenalina si ha una certa libertà conformazionale, con degli analoghi rigidi si nota che la migliore conformazione in entrambe le molecole è quando la catena è perpendicolare all'anello aromatico, per la noradrenalina anche essendo una catecolammina la diversa disposizione della catena laterale con il gruppo OH ha caratteristiche di interazione diverse dalla dopamina perché la conformazione attiva è quando la catena è complanare al catecolo.



Recettori imidazoline

Gli antiipertensivi ad azione centrale analoghi alla clonidina esercitano il loro effetto tramite l'interazione non solo con i recettori α_2 -adrenergici, ma anche con i recettori imidazolinici, che sono farmacologicamente distinti dagli α_2 -AR poiché non attivati dalle catecolamine. Ne esistono 3 sottotipi:

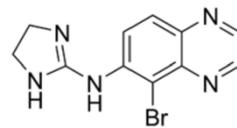
- Recettore I1: i primi scoperti, sono coinvolti nell'inibizione a livello centrale del tono simpatico per abbassare la pressione arteriosa anche relativamente all'assorbimento di sodio a livello renale. Quindi le imidazoline hanno un effetto sinergico sia per attivazione dei recettori alfa2 pre-sinaptici inibendo il rilascio di noradrenalina, che interagendo con questi recettori I1.
- Recettore I2: è un sito allosterico di modulazione della monoammino-ossidasi B (MAO-B), gli enzimi deputati alla degradazione ossidativa del gruppo amminico terminale delle ammine biogene (adrenalina, serotonina e dopamina). Le MAO-B sono il sottotipo di MAO maggiormente coinvolto nella degradazione della dopamina.
- Recettore I3: regola la secrezione di insulina dalle cellule β pancreatiche.

SAR imidazoline

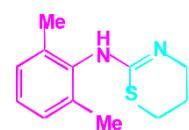
Clonidina = Agente ipotensivo che agisce centralmente appartenente alla classe della ammino-imidazoline, utilizzato principalmente nelle crisi ipertensive, somministrato per via endovenosa. i due atomi di cloro in posizione 2 e 6 impongono all'anello imidazolinico di essere perpendicolare a quello bisostituito. Sono stati effettuati tantissimi studi sulla relazione struttura-attività per diminuire l'effetto a livello centrale di sedazione, inserendo, per esempio, un gruppo amminico in metà alla catena laterale sull'anello bisostituito variandone però le caratteristiche.



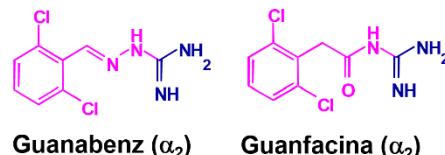
Brimonidina = Derivato della clonidina alla luce degli studi struttura-attività. Presenta un anello benzopirazinico, sostituito con un bromo, molto ingombrante, in sostituzione all'anello sostituito con 2 atomi di cloro. Viene utilizzata in colliri per il glaucoma, diminuisce la produzione di umor acqueo e ne favorisce il deflusso.



Xilazina = Sono state effettuate anche delle sostituzioni bioisosteriche dell'anello imidazolinico introducendo la diidrotiazina producendo la xilazina. Non viene utilizzata per uso umano ma solo per uso veterinario come sedativo ed anestetico; nei gatti ha anche effetto emetico. Negli ultimi tempi negli USA si è visto un aumento dell'utilizzo della xilazina per tagliare eroina e fentanyl. Ha diversi effetti collaterali, causa morte per OD e provoca ulcerazioni nel momento dell'iniezione.



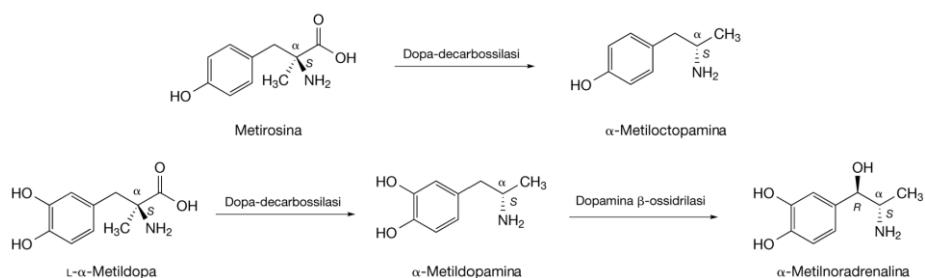
Guanabenz e Guanfacina = Analoghi aperti dell'anello imidazolinico, sono stati inseriti dei gruppi guanidinici (guanfacina) e imminoguanidinici (guanabenz). Hanno un effetto selettivo per i recettori alfa2, entrambe ad azione antipertensiva.



Effetti collaterali

Clonidina e alfa-metil-DOPA hanno azione sia centrale che periferica, in particolare a livello del nucleo del tratto solitario, dove avviene il controllo pressorio a carico dei recettori I1, si ha un effetto di inibizione simpatica che causa vasodilatazione e ipotensione. Questi recettori, però, sono presenti anche nel nucleo ceruleo, che ne causa la sedazione, limitandone l'impiego nelle crisi ipertensive. L'altro effetto a livello periferico è esplicato a livello delle cellule salivari: viene diminuita la produzione di saliva con conseguente secchezza delle fauci.

L'alfa-metil-DOPA è un agonista alfa2, ma anche un antagonista indiretto adrenergico. Ha un metile in più in alfa rispetto alla DOPA, ma esattamente come quest'ultima subisce l'azione della DOPA-carbossilasi formando l'alfa metil-dopamina: questa subisce l'idrossilazione dalla dopamina-beta-ossidrasi a alfa-metil-noradrenalina, la quale ha sia azione di agonista alfa2, ma anche da falso neurotrasmettore. Sostituisce la noradrenalina nelle vescicole sinaptiche poiché riconosciuta dal trasportatore. Viene fatta fuoriuscire e all'interno delle sinapsi viene degradata dalle MAO. Non avendo lo stesso effetto della noradrenalina, ma essendo soprattutto agonista alfa2, provoca una diminuzione dell'effetto adrenergico per deplezione del neurotrasmettore. Siccome l'azione agonista alfa2 va in direzione della diminuzione del rilascio di noradrenalina, le due azioni risultano sinergiche.



Applicazioni terapeutiche:

α-agonisti - Trattamento di shock e ipotensione ortostatica (NA, A anche per via intracardiacă), Prolungamento anestesia locale tronculare (per questo i dentisti chiedono al paziente se soffre di ipertensione prima di anestetizzare) (NA, A) grazie all'azione vasocostrittrice. Trattamento del glaucoma (dipivefrina profarmaco NA).

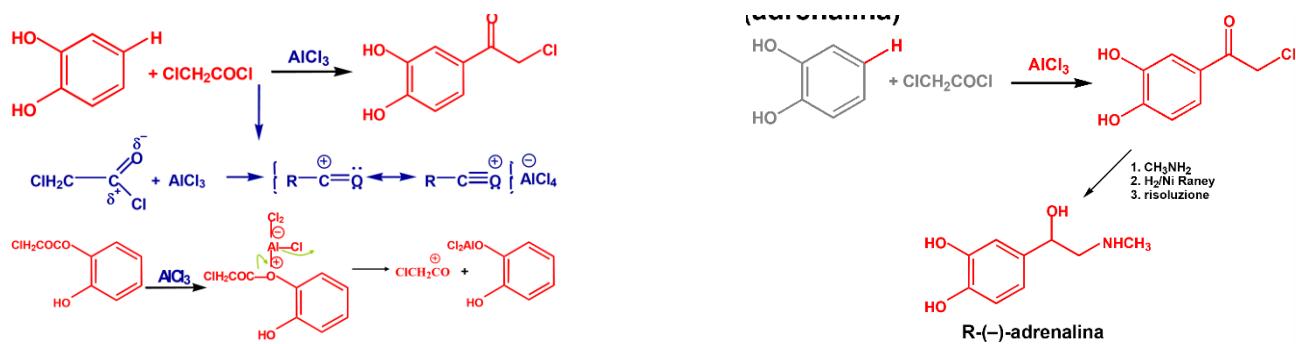
α₁-agonisti - Ipotensione ortostatica (etilefrina, oxedrina, etc.). Decongestionanti nasali [fenilefrina, derivati imidazolinici (ossimetazolina)]

α₂-agonisti - Ipertensione (α-metildopa, clonidina), Trattamento glaucoma (brimonidina)

Sintesi adrenalina

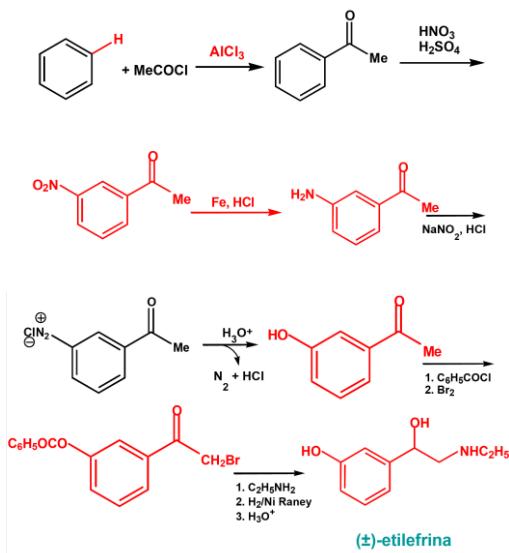
Si tratta di un'acilazione di Friedel-Crafts, si utilizza un composto di bifunzionalizzato. Viene eseguita in condizioni di acido di Lewis per polarizzare il carbonile rendendolo più elettropositivo (ione acilonio) e favorire l'attacco da parte dell'anello aromatico. La funzione carbonilica risulta più attivata rispetto all'alchilica, e quindi l'acilazione sarà favorita rispetto all'alchilazione. Il composto bifunzionalizzato è necessario in quanto l'altra estremità verrà utilizzata per la sostituzione nucleofila con il gruppo amminico. Si usa il catecolo e il cloro-acetil-cloruro, con AlCl₃ si forma lo ione acilonio, uno dei due gruppi OH (stechiometria 1:1 per evitare reazioni collaterali) si esterifica, ma grazie alla presenza di AlCl₃ e a causa dei gruppi Cl che attraggono gli elettroni e polarizzano l'ossigeno del carbonile, viene trasposto lo ione acilonio in para all'ossidrile libero, che è la posizione più attivata (trasposizione di Fries). Si forma un cloro-acetofenone sostituito in 3 e in 4 con ossidrili (3-4-diidrossi-cloro-acetofenone). A questo punto verrà fatta una sostituzione nucleofila sul cloro con metilammina e poi verrà ridotto con l'ossigeno carbonilico ottenendo una

miscela racemica, la riduzione può essere eseguita sia con NaBH4 che con idrogeno su nichel Raney. Verrà utilizzato il metodo dei sali diastereoisomeri con acido tartarico per separare la R-(*-*)-adrenalin.



Sintesi etilefrina

È un'acilazione di Fridel-Crafts con acetilcloruro per ottenere un acetofenone. Il gruppo COCH3 essendo disattivante è meta-orientante, viene effettuata una nitrazione sull'anello producendo il 3-nitro-acetofenone. Questo gruppo nitro dovrà essere ridotto selettivamente, evitando la riduzione del carbonile, ciò viene effettuato con Fe in HCl, producendo un derivato anilinico. A questo punto viene trattata l'ammina con NaNO2 in HCl formando il sale nitrosonio che darà origine al sale di diazonio, che in ambiente acquoso acido formerà il fenolo corrispondente. La sintesi a questo punto prevede l'attivazione del metile in seguito alla protezione dell'OH (attivante) derivatizzandolo con BzCl, poi viene bromurato il metile con Br2 e fatto reagire con etilammina. L'ultimo passaggio è la riduzione del carbonile tramite idrogenazione catalitica e la liberazione del gruppo OH tramite idrolisi acida. Si otterrà una miscela racemica, per cui si procede a separare l'alfa + etilefrina con Sali diastereoisomeri.

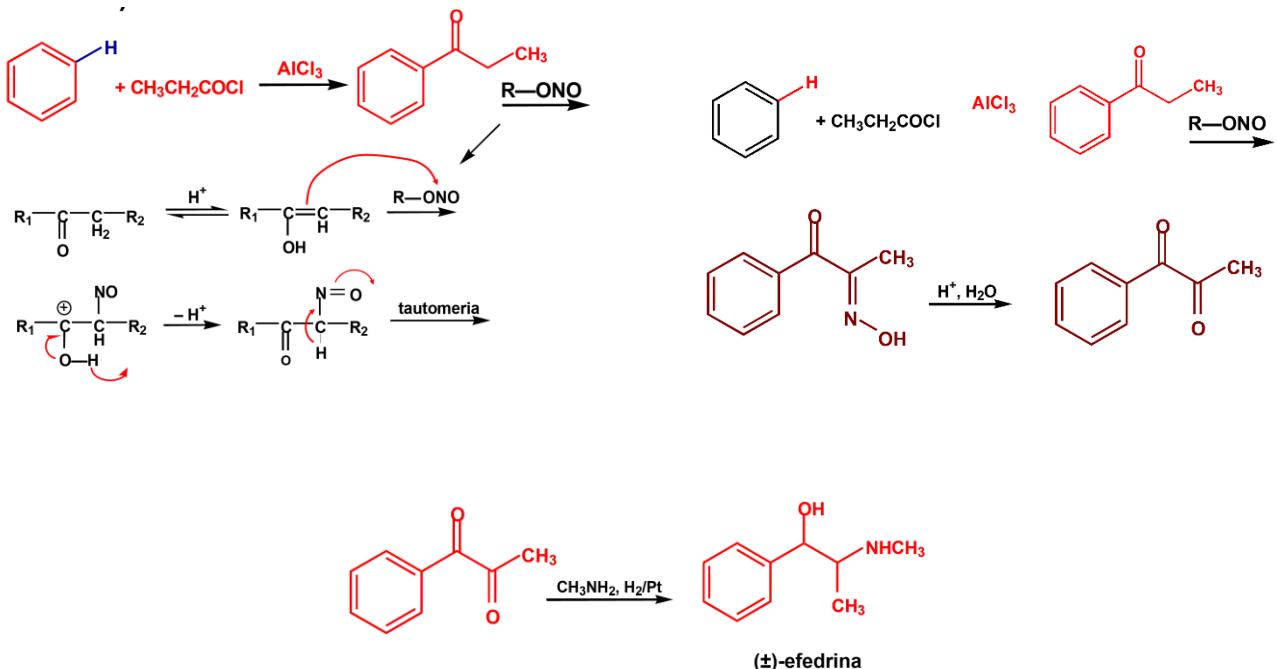


Sintesi efedrina (fenil-propil-ammine)

Si effettua un'acilazione di Friedel-Crafts su un benzene tramite un propanoil-cloruro in presenza dell'acido di Lewis. Il carbonile chetonico sul derivato può tautomerizzare, si effettua una nitrosazione del CH2 adiacente al carbonile. Questa reazione viene effettuata con un nitrito alchilico, il quale subisce l'attacco della forma enolica sull'atomo di azoto reso positivo dai 2 ossigeni, con perdita dell'alcol corrispondente al nitrito. Si otterrà un nitroso derivato sul CH2 adiacente al CH3, questa molecola andrà in conto a tautomeria assumendo la forma più stabile per la presenza di due doppi legami coniugati: il tautomero ossimico (carbonile+idrossilammina). Per idrolisi dell'ossima in ambiente acido si ottiene il corrispondente carbonilico

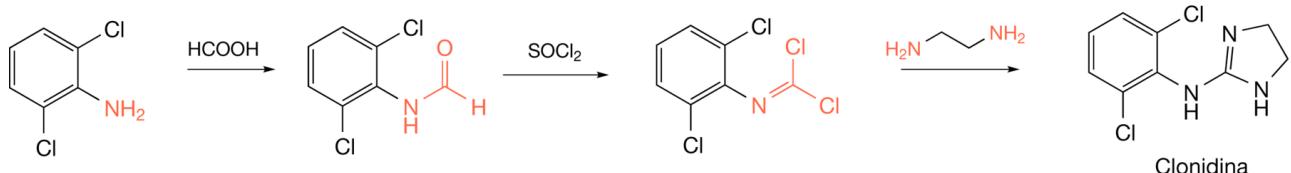
con liberazione di idrossilammina; si utilizzerà quindi il derivato dicarbonilico per introdurre la catena laterale. Dato che il sistema coniugato dei due carbonili si disattiva reciprocamente, inserire una metilammina sul carbonile favorito all'amminazione (ovvero il più lontano dall'anello, poiché l'altro risente anche della coniugazione dell'anello). Se ne ottiene una base di Schiff (immina) che verrà ridotta tramite idrogenazione catalitica, si ridurrà sia l'immina che il carbonile rimasto (condizioni più spinte con H₂/Pt). La miscela finale conterrà enantiomeri e diastereoisomeri.

(su domanda di edoardo: non è possibile utilizzare la strategia di bromurazione e poi sostituire con la metilammina come nella sintesi precedente poiché questa sarebbe difficile da direzionare esclusivamente in alfa al chetone)



Sintesi clonidina

Parte da una dicloroanilina (sostituita in 2 e 6) fatta reagire con acido formico ottenendo la formammide che verrà attivata trasformandola in dicloroimmina con cloruro di tionile, creando sul carbonio imminico 2 buoni gruppi uscenti, cioè gli atomi di cloro. L'anello imidazolinico verrà introdotto tramite reazione con etilendiammina che attaccherà sul carbonio reso elettropositivo dai 2 atomi di cloro. Il prodotto tautomerizza da imminoimidazolidina ad amminoimidazolina.



ANTAGONISTI ALFA-ADRENERGICI

Diversamente da quanto visto finora, ovvero una correlazione tra il ligando endogeno e le strutture studiate (recettori muscarinici e ligandi derivati dalla struttura della noradrenalina), nel caso degli antagonisti alfa-adrenergici non vi è più una corrispondenza diretta.

A livello terapeutico vengono usati principalmente come antiipertensivi (antagonisti alfa1), alcuni usati anche per l'emicrania (per la loro azione sul sistema serotoninergico), oppure per l'ipertrofia prostatica benigna (i recettori alfa1A e alfa1B sono coinvolti nella componente dinamica della funzionalità prostatica) e per il trattamento della depressione (antagonisti alfa2 selettivi in quanto a livello centrale vanno a contrastare l'effetto feedback-negativo dei recettori alfa2 con conseguente aumento di liberazione di noradrenalina; da ciò è deducibile che in caso di depressione sarà richiesto un aumento delle catecolamine oltre alla serotonina).

Come saggi biologici ritroviamo organi isolati e binding (già descritti negli agonisti). Alcuni aspetti stereochimici degli antagonisti spostano la loro azione dai recettori alfa1 ai recettori alfa2, e viceversa.

Esistono varie classi diverse tra loro, non correlate strutturalmente all'adrenalina o noradrenalina; si tratta di molecole molto ingombranti presentanti un gruppo amminico che si protona a pH fisiologico necessario per l'interazione con l'aspartato nel dominio transmembrana.

Si dividono in selettivi e non selettivi. Sono classificati anche in base al meccanismo d'azione.

Non selettivi: imidazoline, alcaloidi derivati dell'acido lisergico, beta-alloalchilammime e tetrammine disolfuro (le ultime due formano dei legami pseudo irreversibili o irreversibili).

Antagonisti alfa1 selettivi: prazosina e derivati inazolinici (sono competitivi).

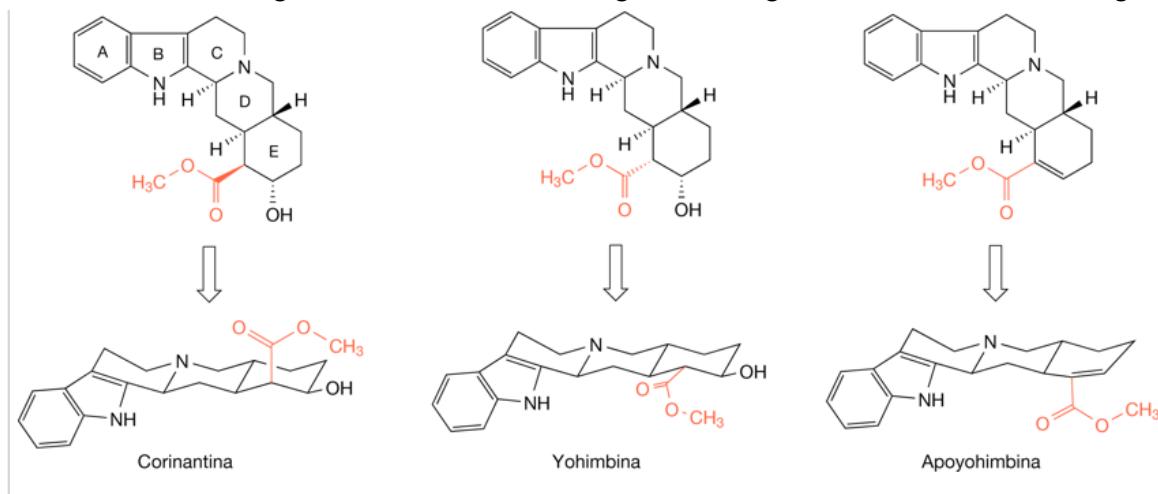
Antagonisti alfa2 selettivi: alcaloidi indolici come yohimbina e derivati; lo spostamento di alcuni gruppi chimici, variando la stereochimica, fa sì che queste molecole diventino antagonisti alfa1.

Antagonisti alfa1 o alfa2 selettivi: benzodiossani; la selettività dipende sempre dai gruppi che portano sullo scheletro centrale.

Non compare la classe delle feniletanolammime.

Alcalodi indolici

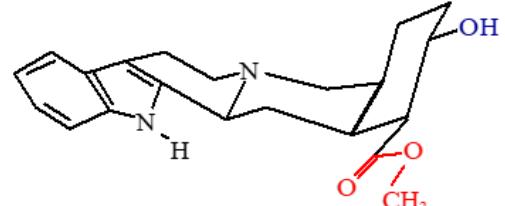
Sono rappresentati da yohimbina e corinantina (di origine naturale), apoyohimbina. Sono caratterizzati da un anello indolico a cui sono legati 3 cicli in successione; la giunzione degli anelli C e D, D ed E è una giunzione



di tipo trans, infatti sono tutti coplanari. Quello che differenzia la corinantina dalla yohimbina è la disposizione del gruppo acetossilico: nella prima è assiale, nella seconda è equatoriale. Questo determina la selettività: la prima sarà selettiva per gli alfa1 mentre la seconda per gli alfa2.

L'aspetto interessante è relativo alla apoyohimbina, che presenta un doppio legame (carbonio sp² che abbiamo ottenuto per disidratazione dell'OH) il quale non prevede più una sostituzione sopra o sotto il piano del gruppo acetossilico. In questo caso il gruppo acetossilico è sul piano e questa molecola perde la selettività sui sottogruppi alfa1 e 2, diventando un antagonista di entrambi.

La rauwolscina (molecola naturale) presenta invece una diversa giunzione dei due anelli terminali (D ed E), dove in questo caso sarà di tipo cis. Il gruppo acetossilico è equatoriale e difatti anche questa molecola è antagonista selettivo alfa2. Conferma quindi che, ai fini dell'attività, non è importante la disposizione degli anelli o del gruppo OH ma piuttosto la differente disposizione del gruppo acetossilico.



Rauwolscina (α_2)

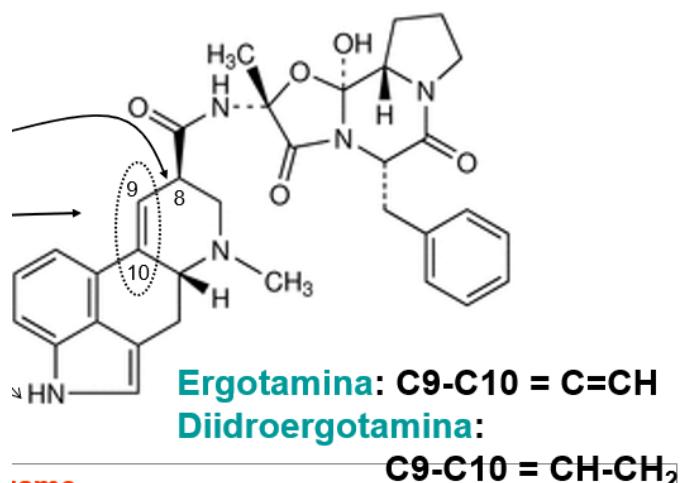
Ricapitolando: posizione equatoriale è alfa2, posizione assiale è alfa1.

In tutte queste molecole è presente un N terziario, di natura alchilica, tra gli anelli C e D che si protona a pH fisiologico e dà l'interazione con l'aspartato nel recettore. Sull'anello indolico troviamo un altro NH che ha una basicità diversa.

Alcaloidi dell'ergot

Gli alcaloidi indolici dell'ergot sono derivati dell'acido lisergico. Questo viene funzionalizzato, nei derivati, in forma di derivati ammidici. Queste molecole le ritroveremo molto nel sistema recettoriale serotoninergico (LSD). Di conseguenza non sono specifiche solo per il sistema adrenergico.

Anche queste molecole presentano un N terziario che si protona a pH fisiologico e che interagisce con il recettore; in realtà è possibile individuare, oltre all'anello indolico e la catena etilamminica, la struttura della serotonina (parte bassa della molecola).



I requisiti fondamentali per un sistema recettoriale piuttosto che un altro sono: presenza di un doppio legame in posizione posizione 9-10. L'ergotamina è utilizzata per la sua azione vasocostrittrice per ridurre gli attacchi di emicrania; questa azione intrinseca è mediata dall'azione sui recettori serotoninergici di tipo b. Quando si riduce il doppio legame si perde l'azione vasocostrittrice mentre viene amplificata l'azione adrenolitica. Tale riduzione porta alla formazione della diidro-ergotamina. Si tratta di un antagonista alfa adrenergico che non verrà più utilizzato per l'ipertensione a causa degli effetti collaterali (esistono molecole molto più sicure). Un

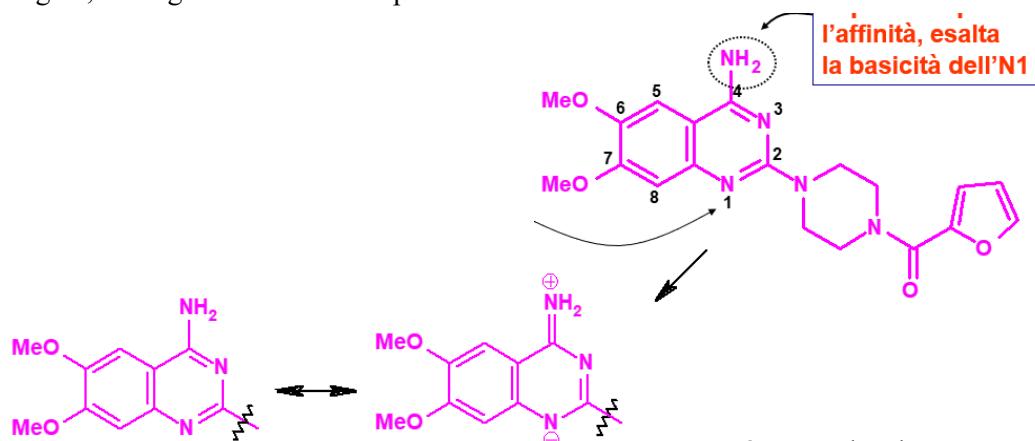
altro elemento importante è la configurazione del carbonio chirale in posizione 8; se venisse epimerizzato si perderebbe l'attività adrenolinica.

BISOGNA SAPERE LA STRUTTURA DELL'ACIDO LISERGICO, MA NON DEI SUOI DERIVATI. L'IMPORTANTE SONO I REQUISITI E LE ATTIVITÀ DIVERSE DEI DERIVATI IN FUNZIONE DELLE SOSTITUZIONI.

Derivati chinazolinici

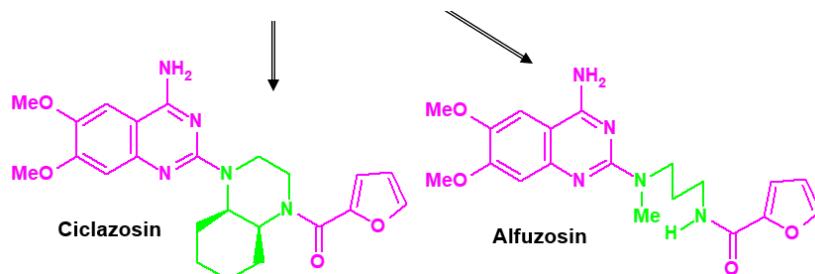
Sono antagonisti alfa1 selettivi. Iniziano ad essere utilizzati in terapia (in particolare la prazosina) come ipotensivi, ma attualmente sono impiegati solo per l'ipertrofia prostatica benigna (hanno pochi effetti collaterali e agiscono sulla muscolatura lisca della prostata).

Sono caratterizzati da una struttura base con un anello chinazolinico, o meglio, 4-ammino6,7-dimetossichinazolinico. Tutti i derivati conservano questi gruppi, ciò che varia è il sostituente in posizione 2 in particolare per motivi di emivita (la prazosina aveva un'emivita breve, quindi è stato necessario aumentarla cambiando i gruppi). L'anilina, portante il gruppo amminico in posizione 4, delocalizza il doppietto del gruppo sull'anello. Questo è importante per l'affinità col recettore, infatti questa delocalizzazione permette di aumentare la basicità degli atomi di N sull'anello. In particolare, in posizione 1 troviamo un N che si protona a pH fisiologico, interagendo così con l'aspartato nel recettore.



Questa è una molecola estremamente azotata, ma gli atomi di N più basici sono quelli all'interno dell'anello chinazolinico. Gli altri azoti presenti sulla molecola non sono basici. L'N in posizione orto (3) è meno basico in quanto la delocalizzazione è meno favorita rispetto a quello in para (1). Quest'ultimo risente a sua volta dell'N sull'anello piperazinico.

Altra porzione importante è la catena laterale. Normalmente sulla prazosina abbiamo la piperazina, che però può essere modificata. Questa può essere aperta, mantenendo gli atomi di N distanziati da una catena propilica, come nell'alfuzosin (semplificazione molecolare) oppure all'anello piperazinico si è unito un altro anello cicloesanico. Questo ciclosesile deve stare rispetto alla piperazina in giunzione cis (sono perpendicolari fra loro). L'anello prende il nome di peridrochinossalinalico perché la chinossalina è il corrispondente anello aromatico (in questo caso abbiamo saturi ambedue gli anelli). È il caso del ciclazosin.



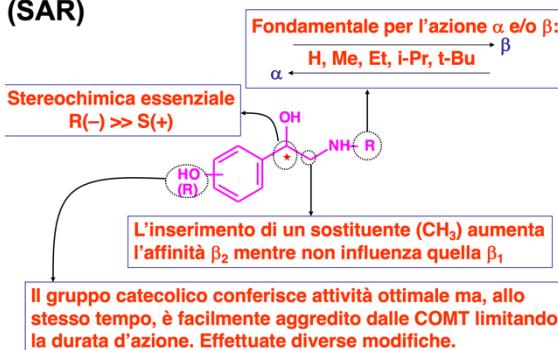
RECETTORI β -ADRENERGICI

I recettori β sono presenti a livello cardiaco (β_1) e a livello del tratto bronco polmonare (β_2). L'effetto dei β_1 sono effetti di stimolazione a livello cardiaco di tipo positivo. Gli agonisti β_2 invece modulano una broncodilatazione, contrariamente ai recettori M3 muscarinici. Ci sono anche i recettori β_3 , che sono coinvolti nella lipolisi, in particolare negli adipociti del tessuto bruno. Di questa classe non ci sono farmaci che agiscono selettivamente. Si andrà quindi ad analizzare quello che è stato fatto per avere una selettività β_1 e β_2 . Per quanto riguarda β_2 , si parlerà prevalentemente di agonisti, mentre per quanto riguarda i β_1 , ovvero i beta-bloccanti, si parlerà prevalentemente di antagonisti.

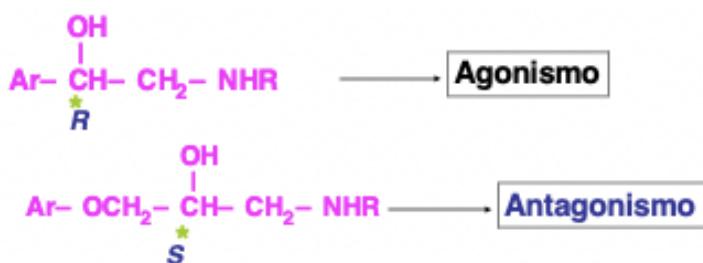
I β_1 sono molto utili anche come agonisti in caso di scompenso circolatorio. Questi recettori sono accoppiati a proteine G, in particolare Gs. I β_1 hanno una prevalenza di localizzazione nel cuore di 4:1 rispetto ai β_2 . A livello delle vie respiratorie la situazione è identica con la differenza che la maggioranza dei recettori saranno β_2 . Questi ultimi sono presenti anche sulla muscolatura liscia vasale e a livello di leucociti, mastociti e cellule endoteliali. Queste sono le cellule che rilasciano sostanze attive nei processi di infiammazione. I β_3 sono presenti oltre che negli adipociti, anche sulla muscolatura liscia vescicale. L'unica molecola in terapia infatti agisce prevalentemente sui β_3 della muscolatura liscia vescicale. Gli studi funzionali per quanto riguarda i β_1 utilizzano atrio cardiaco di cavie e cuore di coniglio, per i β_2 si utilizza la trachea di cavie, polmone e utero di ratto in cui si ha un effetto rilassante. Per quanto riguarda i β_3 si utilizzano adipociti di criceto, ratto, cane, topo, coniglio. Bisogna considerare che gli adipociti sono molto diversi nelle diverse specie. Trovare molecole selettive nei confronti di adipociti umani è molto difficile anche per questo. Vengono in generale effettuati anche studi di binding in recettori nativi.

Domanda: Quali sono le differenze tra le strutture degli agonisti e degli antagonisti?

AGONISTI β -ADRENERGICI (SAR)



In questo caso le strutture degli agonisti e antagonisti sono simili. Le strutture degli agonisti β derivano strettamente dalla molecola della noradrenalina, adrenalina, ma più di tutti per avere una attività β è importante avere un gruppo ingombrante sull'azoto terminale, quindi derivano più di tutti dai derivati Isoprenalina (Isoproterenolo) e Terbutalina (gruppo ter-butile associato non ad un catecolo ma ad un resorcinolo). Quando si inserisce un isopropile nella catena contenente l'azoto si avrà una selettività β generica rispetto ad α . Quando si inserisce un terz-butile si ottiene maggiore selettività dei β_2 rispetto ai β_1 . Si andrà quindi ad agire su questo gruppo per aumentare la selettività o meno. In questi agonisti un altro elemento fondamentale è l'anello catecolico. Allo stesso modo dell'adrenergico α , anche nel β il catecolo rappresenta un elemento debole, perché facilmente ossidabile e degradabile, quindi molte modifiche sono state effettuate su questo anello catecolico. Per avere degli agonisti che si rispettino è necessario che ci sia una stereochimica perfetta del gruppo ossidrile.



bronchiale, saranno fenossipropanolammime, ovvero ci sarà un ossigeno a distanziare la catena laterale dall'anello aromatico. La catena non è più etilamminica, ma propanolamminica, poiché è sempre presente il gruppo OH. Si ha sempre un centro chirale che mentre per le Feniletanolammime da origine a delle molecole attive in configurazione R, nel caso delle Fenossipropanolammime ha configurazione S.

Cambierà la proprietà dei gruppi legati al carbonio, ma l'OH sarà sempre posizionato in modo da poter dare un'interazione idrofila con la serina.

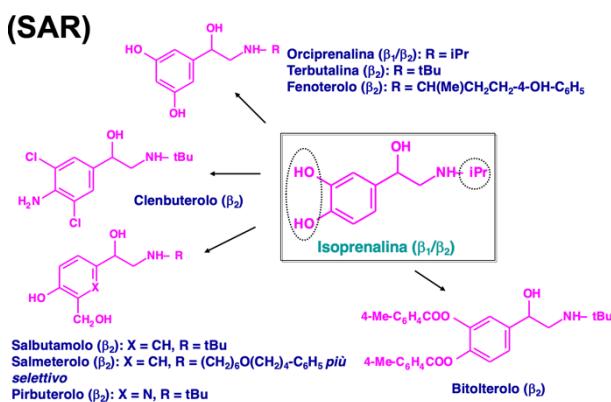
Ricapitolando: Feniletanolammime in configurazione R e Fenossipropanolammime in configurazione S.

Se invece vengono aggiunti dei sostituenti in α rispetto al gruppo amminico (metile o etile) si avrà un aumento per il sottotipo recettoriale β_2 senza però diminuire quella per il β_1 .

L'anello catecolico è un centro di degradazione da parte delle COMT. La metabolizzazione dell'OH in meta a gruppo metossile da parte delle COMT, viene favorita dal gruppo OH vicino. Nei derivati β adrenergici una modifica importante è stata quella di sostituire all'anello catecolico l'anello resorcinolico. In questa struttura gli OH sono in meta tra di loro e rispetto alla catena laterale. Inoltre sono state fatte delle sostituzioni bioisosteriche sul gruppo OH in meta.

Si analizzano ora le varie modifiche effettuate alle molecole principali.

AGONISTI β -ADRENERGICI (SAR)



Partendo dall'Isoprenalina, la prima modifica che ha portato ad una maggiore stabilità di queste molecole ma non ad una maggiore selettività d'azione, è stata quella di sostituire all'anello catecolico dell'Isoprenalina, l'anello resorcinolico. In questo modo si ottiene l'Orciprenalina. Questa struttura vede i due OH in meta tra di loro e rispetto alla catena laterale. L'Orciprenalina è molto più stabile dell'Isoprenalina, proprio perché non ha più quell'OH in orto all'OH aggredito dalle COMT. Successivamente su questa modifica sono state sperimentate varie strutture che vedono sostituito il gruppo isopropile con il terbutile. La molecola che ne è derivata si chiama Terbutalina.

Ne deriva una maggiore stabilità. Inoltre il terbutile che ho aggiunto sposta la selettività verso il sottotipo β_2 . La Terbutalina è stato il primo agonista selettivo nei confronti del recettore β_2 adrenergico.

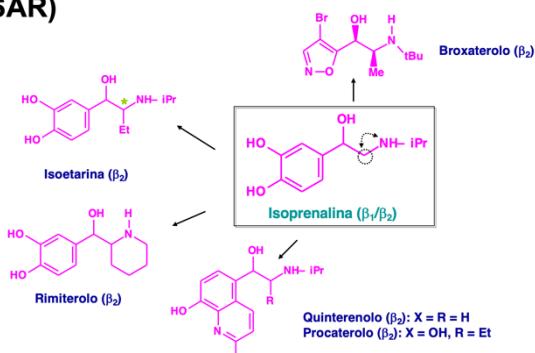
L'idea che un gruppo ingombrante in quella posizione spostasse la selettività nei confronti del recettore β_2 adrenergico ha dato il via alla progettazione di tantissimi composti che vedono un sostitente sull'atomo di azoto più ingombrante per mantenere maggiormente la selettività β_2 . Nel Fenoterolo ad esempio il gruppo isopropile dell'Orciprenalina è stato allungato con una catena che termina con un gruppo aromatico. L'azione della moltitudine di molecole progettate ha confermato che il resorcinolo ha una maggiore stabilità metabolica e che l'azoto amminico sostituito con gruppi ingombranti sposta la selettività su β_2 . Oltre a queste modifiche,

(OH) in catena laterale. Il carbonio legato al gruppo OH deve essere in configurazione R, esattamente come accade in adrenalina e noradrenalina. Le strutture saranno per la maggior parte feniletanolammime. Nell'antagonismo invece, le molecole selettive verso i β_1 , ovvero per bloccare l'effetto eccitatorio senza avere effetto collaterale a livello

ci sono state delle sostituzioni bioisosteriche dell'OH in posizione beta. Bisogna precisare che effettuando una sostituzione bioisosterica dell'OH in para viene persa l'attività della molecola. Se invece la sostituzione avviene in posizione beta l'attività rimane e si ha una minore metabolizzazione. Per esempio, uno dei farmaci più utilizzati come agonista β_2 nella broncopneumopatia cronica, così come anche nell'asma deriva proprio da una modifica del gruppo OH in meta che viene sostituito con un idrossimetile. L'ossidrile viene mantenuto ma viene distanziato con un gruppo metile dall'anello aromatico. In questo modo non è più un OH catecolico come in precedenza, ma è un gruppo alcolico alifatico che non da più origine a metabolizzazione a carico delle COMT. È una molecola molto più stabile. Questo però vuole anche dire che questo OH ha comunque capacità di dare legami idrogeno come il gruppo OH legato all'anello. In questo caso dato che l'obiettivo è una selettività di tipo β_2 , il Salbutamolo come gruppo terminale presenta un gruppo terbutile. Il Salbutamolo non è l'unico esempio di questa sostituzione bioisosterica, infatti un'altra molecola è il Salmeterolo, dove analogamente al discorso di prima, si è ingombrato ulteriormente il gruppo amminico terminale con una lunga catena la quale, essendo molto flessibile, ha la possibilità di posizionarsi a forcina ripiegandosi e dare quindi delle interazioni additive con il recettore, prolungando l'azione della molecola. Infine sempre in analogia al Salbutamolo sono state fatte delle sostituzioni dell'anello aromatico anche con una piridina che ha dato origine al Pirbuterolo. In tutte queste molecole si ha un centro terbutile (selettività β_2) e una sostituzione bioisosterica dell'anello catecolico. Unica eccezione ai derivati resorcinolici è rappresentata dal Clenbuterolo, in cui si hanno due atomi di cloro al posto dei due ossidrili e un gruppo amminico. È l'unica struttura che si differenzia dalle altre.

Un altro approccio per mantenere una selettività d'azione e maggiore stabilità è stato quello di fare dei profarmaci. Un esempio è il Bitolterolo che è un derivato che presenta il terbutile, in cui i due OH catecolici sono stati derivatizzati con l'acido parametilbenzoico. In questo modo non è stato necessario sostituire l'anello catecolico con quello resorcinolico. Il profarmaco libera gli ossidrili in seguito all'idrolisi delle esterasi ematiche liberando il farmaco attivo.

(SAR)



Anche l'inserimento di un gruppo piccolo (un etile in catena laterale) porta una maggiore selettività nei confronti di β_2 . Nella Isoetarina è stato inserito il gruppo etile. Questa molecola non è però estremamente selettiva come le molecole precedenti poiché è sempre presente l'isopropile in posizione n-terminale. Questa catena laterale nel caso dei recettori β_2 può essere anche inserita in un ciclo, come ad esempio avviene nel Rimiterolo in cui si ha una congiunzione del carbonio in posizione alfa della catena con il carbonio del sostituente. Si ottiene un ciclo piperidinico.

Un'altra sostituzione bioisosterica che è stata fatta sul catecolo per aumentare la sua attività è stata quella di inserire un biciclo. Al posto dell'anello catecolico, si inserisce un anello chinolinico (8-idrossichinolinico). Si ottiene il Quinterolo che è un bioisostero perché l'ossidrile in para rimane e l'azoto dell'anello chinolinico mima l'effetto dell'altro ossidrile catecolico.

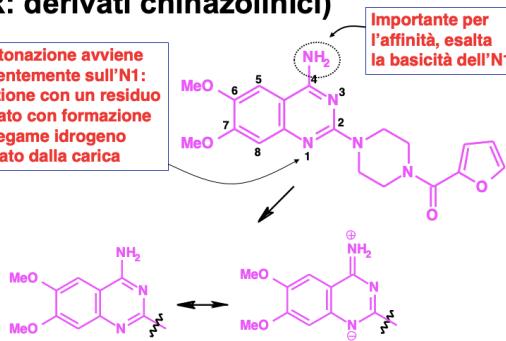
(E' indispensabile sapere le relazioni struttura attività ma non importa che si ricordino tutte le strutture. Molte di quelle trattate oggi però sono farmaci importanti che si usano in terapia e vanno ricordate.)

SAR: derivati chinazolinici

I derivati chinazolinici hanno una struttura base non solo chinazolinica, ma bensì 4-ammino-6,7-dimetossi, perché questi gruppi ammino in 4 e metossi in 6 e 7 si ritrovano in tutti i derivati.

(SAR: derivati chinazolinici)

La protonazione avviene prevalentemente sull'N1:
interazione con un residuo
aspartato con formazione
di un legame idrogeno
rinforzato dalla carica



Importante per
l'affinità, esalta
la basicità dell'N1

(SAR: derivati chinazolinici)

La protonazione avviene prevalentemente sull'N1:
interazione con un residuo
aspartato con formazione
di un legame idrogeno
rinforzato dalla carica

L'anello piperazinico non è essenziale
e può essere aperto come ALFUZOSIN
o trasformato come CICLAZOSIN

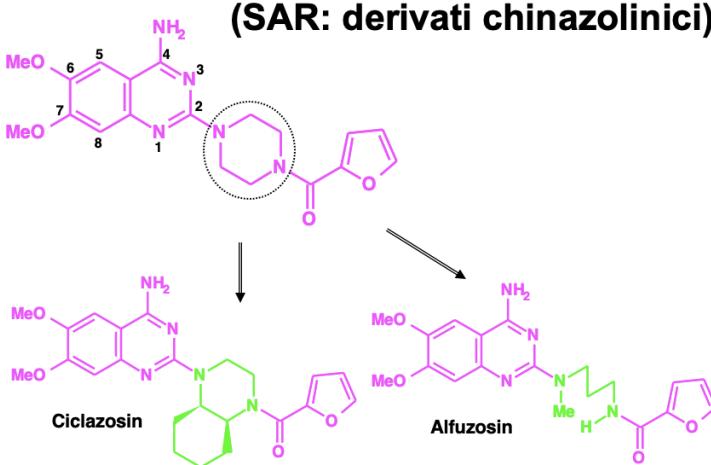
La sostituzione con altri sistemi ciclici o aperti ha portato
ad altri antagonisti α_1 -selettivi come TERAZOSIN,
DOXAZOSIN e TRIMAZOSIN con stabilità metabolica
maggiore e quindi maggiore durata d'azione

Quello che è stato modificato per aumentare sia le caratteristiche farmacocinetiche che farmacodinamiche sono le sostituzioni in posizione 2. In questa posizione devono esistere delle catene laterali che distanziano l'anello chinazolinico da una struttura che normalmente è ciclica. Quello che è stato fatto sulla prazosina è stato fatto prevalentemente per la sua breve emivita, che doveva per forza essere aumentata per avere dei farmaci utilizzabili e non da assumere più volte al giorno. Nella lezione precedente è stato visto che queste molecole che sono state inizialmente utilizzate come antiipertensivi hanno poi avuto un futuro più come molecole utilizzate per la ipertrofia prostatica benigna, anche se è importante ricordare che il loro effetto antiipertensivo a volte rappresenta un effetto collaterale che in alcuni pazienti non è tollerato.

Quello che è stato fatto, quindi, è stata sia la complicazione molecolare dell'anello piperazinico una catena aperta in cui ci sono 3 metileni che distanziano gli atomi di azoto (Alfuzosin), da ricordare è che nelle SAR la catena centrale di 3 metileni in realtà può essere allungata anche fino a 6 metileni. Il motivo di questo, è che essendo una catena flessibile, riesce a posizionarsi in maniera tale da ricostituire come un ciclo (come in Ciclazosin): mettendosi a fisarmonica c'è un adattamento dell'interazione dei due azotii esattamente come nella piperazina o nella catena propildiamminica dell'Alfuzosin. Nell'Alfuzosin e in Ciclazosin (che rappresenta la

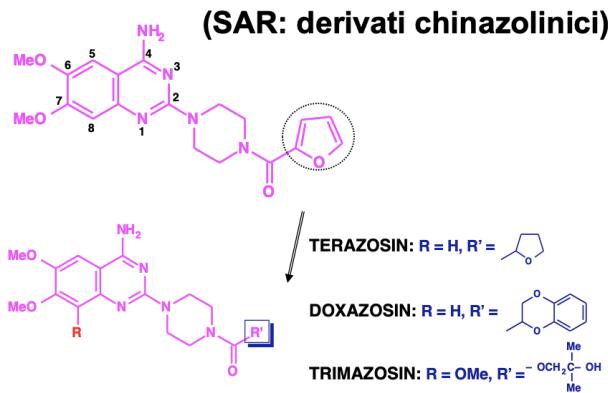
complicazione molecolare della molecola di prazosina) si è mantenuto invece il gruppo furanoilico, che costituisce il gruppo con cui viene fatta l'ammide del secondo gruppo azoto.

(SAR: derivati chinazolinici)



Questo anello furanico (furanoilico in realtà, perché ha un gruppo carbonilico legato) sarà un altro punto di modifica di queste molecole che sarà affrontato. Nel Ciclazosin l'inserzione di un diciclo più ingombrato rispetto alla piperazina ha dei requisiti sterici ben definiti: deve essere necessariamente in

posizione *cis* e non può essere in posizione *trans*. In questo caso si è dedotto che esiste una tasca idrofobica dove può essere alloggiato anche il secondo anello oltre a quello piperazinico, e quindi è accettato un ingombro sterico maggiore come quello di un anello peridrochinossalinico, perché la chinossalina è l'anello aromatico (peridroidrossalinico perché sono stati saturati tutti e due gli anelli).



Nella porzione furanoilica, invece, sono stati sostituiti degli anelli saturi e in particolare, questi anelli saturi hanno riguardato la modifica del furano in tetraidrofurano e un'altra modifica importante è l'inserimento di un gruppo benzodiossanico. Al gruppo benzodiossanico è associata in molte molecole una attività antagonista α -adrenergica e infatti si avrà una classe chiamata proprio benzodiossani.

Dopo le modifiche, sia con tetraidrofurano che con benzodiossano, sono scaturite diverse molecole tra cui:

- Terazosin: viene modificato il furano in THF
- Doxazosin: doxa viene da benzodiossano (anello caratterizzato da due ossigeni fuso con un benzene); è una molecola tra le più utilizzate nell'ipertrofia prostatica benigna, oltre ad avere azione sui recettori α -adrenergici ha anche una funzione antiapoptotica, per cui è anche protettiva nella trasformazione da ipertrofia prostatica benigna a patologia tumorale.
- Trimazosin: modificazione dell'anello con una catena ramificata, non necessariamente ci sono anelli saturi, ci possono essere anche catene ramificate con gruppi -OH o con ossigeni eterei in grado di fare legami a idrogeno con il recettore.

Tutte queste modifiche hanno dato luogo a diverse molecole utilizzate in terapia: conservano l'anello o furanico o tetraidrofuranico o benzodiossanico.

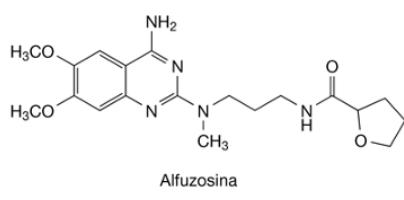
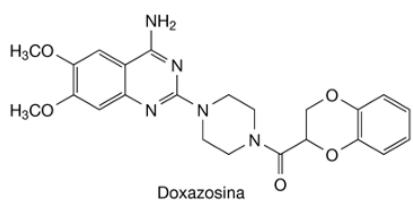
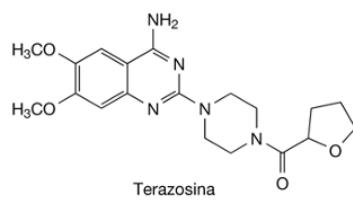
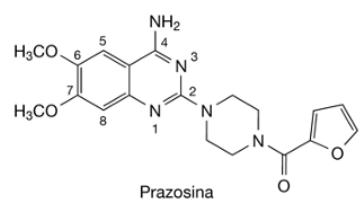


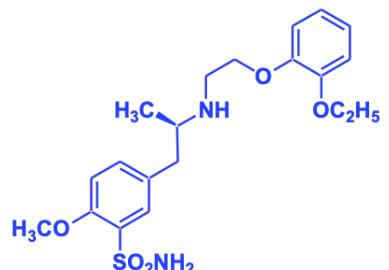
Figura 19.2 Antagonisti α_1 -adrenergici a nucleo chinazolinico.

Non sono gli unici α 1 antagonisti adrenergici usati in ipertrofia prostatica benigna, perché oltre alle chinazoline c'è una molecola chiamata Tamsulosin, la cui struttura assomiglia maggiormente alle feniletilammime adrenergiche ed è l'unica molecola (oltre queste chinazoline) che viene usata per questa patologia. Rimanendo in questa classe di molecole e il loro uso terapeutico, è importante ricordare che l'ipertrofia/iperplasia prostatica vede l'intervento terapeutico attraverso 2 classi di farmaci che agiscono su 2 target diversi:

- Finasteride: già studiata in chimica farmaceutica I, appartiene alla classe degli inibitori della 5α -reduttasi, cioè l'enzima che produce da testosterone il diidrotestosterone, che è il principale ormone che sostiene il trofismo della prostata. In questo caso, si dice che l'azione antiandrogena della finasteride interviene più sulla *componente meccanica*, nel senso che agisce sulla proliferazione del tessuto ma non agisce sulla *componente dinamica*, cioè sulla contrazione del tessuto prostatico. Sulla contrazione del tessuto prostatico intervengono i recettori α 1.
- Antagonisti α 1-adrenergici: controllano la *componente dinamica*, che spesso nell'anziano dà origine a incontinenza/frequenza dalla minzione. Le molecole incluse in questa classe sono Terazosin, Doxazosin e Alfuzosin; a queste si associa anche la struttura non chinazolinica del Tamsulosin, che si vedrà successivamente.

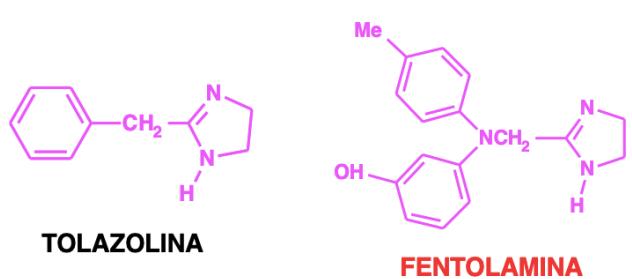
I due sottotipi recettoriali maggiormente coinvolti nell'ipertrofia prostatica benigna (in effetto di contrazione della muscolatura) sono l' α 1A e l' α 1D. Il C manca, perché era stato confuso come un nuovo sottotipo ma in realtà è esattamente uguale all'A.

Il **tamsulosin** assomiglia maggiormente alla struttura delle feniletilammime, ritroviamo nella sua struttura una sostituzione bioisosterica che è già stata vista anche precedentemente nell'agonismo α e si ritroverà anche nell'agonismo β , ovvero la sostituzione di uno dei gruppi -OH dell'anello aromatico con dei bioisosteri quali la solfonammide. L'altro gruppo è metossilato, la struttura del catecolo non è importante qui. Mentre per gli antagonisti in generale si ha una stretta connessione della struttura dell'antagonista più ingombrato rispetto all'agonista, in questo caso gli antagonisti α -adrenergici hanno strutture molto diverse. Richiama di più le feniletilammime. Legato al gruppo amminico c'è una catena abbastanza ingombrata che termina con un gruppo fenossi sostituito in posizione orto con un etossile. A volte si preferisce il Tamsulosin, perché tutte le chinazoline hanno come effetto collaterale l'ipotensione, soprattutto posturale, e in alcuni pazienti questi farmaci sono mal tollerati. Il Tamsulosin sembra avere una maggiore selettività per i recettori α 1 prostatici e di conseguenza dà minori effetti collaterali, che sono soprattutto a carico del distretto cardiovascolare.



SAR: derivati imidazolinici

Siccome sono state viste nella classe degli agonisti α -adrenergici alcune strutture che si differenziano dalle feniletilammime e cioè le chinazoline, sono stati fatti anche studi di SAR relativamente a derivati imidazolinici nei confronti dell'azione agonista/antagonista. Qui si ha un dato molto difforme da quanto succede normalmente: di solito per passare da un'azione agonista a una antagonista si ha un aumento dell'ingombro della molecola, si hanno maggiori gruppi interagenti con il recettore.

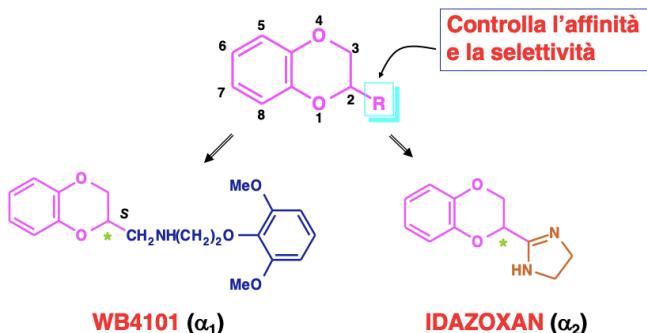


Il caso di **Tolazolina** e **Fentolamina** è uno dei casi in cui in realtà si ha un'azione antagonista anche con molecole non eccessivamente più ingombrate rispetto alla molecola dell'agonista. Tutte le molecole che sono state viste con azione agonista α -adrenergica, soprattutto le benzylimidazoline, erano tutte strutture molto più ingombrate di queste, per esempio ossitetrazolina. La tolazolina non è usata per uso umano, è un antagonista non selettivo quindi sia α_1 che α_2 , viene utilizzata principalmente per uso veterinario in caso di sovraddosaggio di xilazina (vista nella precedente lezione come farmaco ad uso veterinario, prevalentemente come sedativo e anestetico), l'intervento quindi è con questo antagonista.

Un'altra benzylimidazolina usata in terapia è la fentolamina, che anche questo non è selettivo ed è un forte agente ipertensivo. Fentolamina insieme alla fenossibenzamina (da vedere successivamente) sono due antagonisti non selettivi dei recettori α -adrenergici che vengono utilizzati prevalentemente nelle crisi ipertensive da feocromocitoma. Il feocromocitoma è un tumore piuttosto raro delle cellule cromaffini della midollare del surrene che secernono adrenalina, questo tumore dà origine a dei picchi pressori dovuti a una parossistica liberazione di catecolamine. Normalmente quando non si riesce a controllare farmacologicamente con molecole che vengono viste ora l'intervento è chirurgico di asportazione, prima dell'asportazione però deve essere assolutamente fatta una profilassi/copertura nelle settimane precedenti con dosi appropriate di fentolamina o fenossibenzamina per evitare che durante l'intervento chirurgico si abbiano dei picchi pressori elevati che possono portare a morte del paziente. Ci deve essere quindi preventivamente una settimana di trattamento con queste molecole, che sono come agenti ipertensivi più potenti di doxazosina o prazosina. Nella terapia del feocromocitoma, fino a quando è controllabile, questi due farmaci (doxazosina e prazosina) vengono molto utilizzati, ma nell'intervento chirurgico è fondamentale l'utilizzo di fentolamina e fenossibenzamina.

SAR: derivati benzodiossanici

Il benzodiossano ritorna ad avere azione antagonista dei recettori α -adrenergici, la stessa doxazosina è stata progettata in seguito alla scoperta di questa molecola WB4101. Non è mai diventato un farmaco, è semplicemente un tool farmacologico tra gli altri ed ha mantenuto questa sigla. WB4101 è stata la molecola che ha permesso di capire che l'anello benzodiossanico è uno dei farmacofori importanti per avere azione antagonista adrenergica e questo anello benzodiossanico è stato inserito nella struttura della prazosina al posto dell'anello furanico per dare poi origine alla molecola della doxazosina.



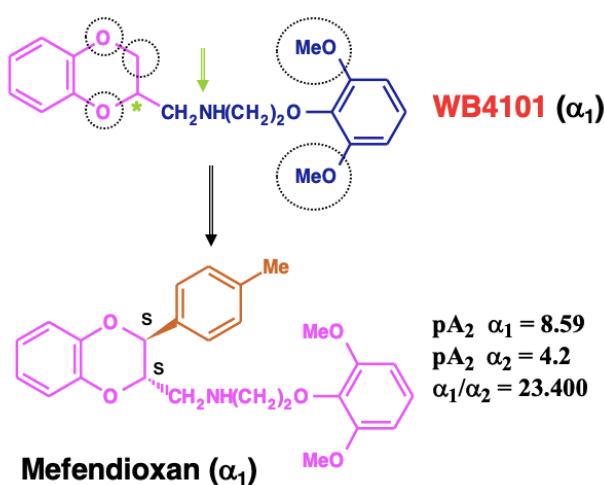
Il WB4101 è una molecola che ha, oltre alla struttura benzodiossanica, una catena a cui è legato un gruppo 2,6-dimetossifenossi, che è indispensabile per l'attività e rappresenta il gruppo terminale. Nel nucleo benzodiossanico, la cui numerazione parte dall'ossigeno 1 del diossano in figura, il gruppo in 2 opportunamente sostituito sposta la selettività dal sottotipo α_1 al sottotipo α_2 e cioè se questa catena, che vede nella parte centrale un gruppo amminico secondario che deve essere sempre presente perché se no manca l'azoto che si protona a pH fisiologico, viene sostituita con una imidazolina si ottiene l'**idazoxan**, che è antagonista α_2 selettivo.

I requisiti fondamentali affinché il farmacoforo benzodiossano funzioni come antagonista α sono definiti dagli studi SAR, ed emergono delle cose importanti:

- L'ossigeno in 1 non deve essere mai eliminato
- L'ossigeno in 4 dell'anello può essere anche sostituito da un -CH₂ e non è indispensabile, ha però una importante funzione strutturale per mantenere la struttura della molecola
- La configurazione e quindi l'eutomero del WB4101 è necessariamente l'S, che è l'unico enantiomero attivo (molto più attivo dell'enantiomero R)

Avendo WB4101 una selettività α_1 così importante, sono state fatte varie sostituzioni in quella posizione per vedere come veniva modificata l'attività, e in effetti nelle varie sostituzioni si è visto che andando a sostituire un anello imidazolinico direttamente in posizione 2 sull'anello benzodiossanico si ottenevano delle molecole α_2 selettive sempre con azione antagonista.

L'**idazoxan** ha raggiunto la fase 3 di sperimentazione clinica come antidepressivo, quando si vedranno gli antidepressivi si vedrà che molte di esse sono associate ad avere un aumento della concentrazione di noradrenalina a livello centrale (oltre che serotonina). È un α_2 antagonista che agisce a livello centrale, ma perché ha effetto depressivo? Perché ovviamente inibisce l'azione di modulazione a feedback negativo degli α_2 presinaptici e cioè andando ad inibire l'effetto di modulazione negativa sul rilascio di noradrenalina significa che ne facilita il rilascio, esattamente come un agonista ne diminuisce il rilascio. Non è però entrato in terapia, è stato per molto tempo in fase clinica come agente antidepressivo, ma purtroppo come spesso succede per le molecole che attraversano la barriera ematoencefalica non si può separare l'attività centrale da quella periferica e gli agonisti α_2 centrali sono agenti ipotensivi e di conseguenza un antagonista α_2 centrale è una molecola con azione ipertensiva. Inoltre, l'effetto terapeutico periferico è di vasocostrizione periferica (sia α_1 che α_2 periferici), che è molto minore rispetto a quello che è l'effetto degli α_1 , quindi da sola non basta a contrastare l'effetto ipertensivo che si ha a livello centrale. Quindi, gli effetti centrali opposti a quelli della clonidina ne hanno impedito l'immissione in terapia. Questo fa capire che il sostituente in posizione 2 dell'anello benzodiossanico modula la selettività α_2 α_1 .



L'aspetto più interessante di questo discorso è stato vedere cosa succede se si inserisce un sostituente in posizione 3.

Quello che si è ottenuto ad oggi (non ci sono molecole più selettive di queste), è che andando a sostituire il 4-metilfenile in posizione 3 dell'anello benzodiossanico si ottiene il **Mefendioxan**, il quale ad oggi è l'antagonista α_1 adrenergico competitivo più selettivo rispetto agli α_2 . Se si guarda il pA_2 della molecola sulle due tipologie di recettori α_1 e α_2 , si nota che il pA_2 sull' α_1 è 8.59 quindi ordine di grandezza di 10^{-9} come concentrazione molare, mentre il pA_2 sugli α_2 è di 4.2 quindi l'inserimento di un gruppo lipofilo in

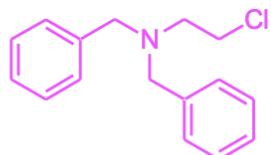
posizione 3 (configurazione della posizione è sempre S, come in 2) elimina quasi completamente l'affinità per il sottotipo recettoriale α_2 amplificando invece l'affinità per l' α_1 . Ad oggi questa è la molecola più selettiva α_1 e α_2 antagonista adrenergico. Se si fa il rapporto tra la selettività il mefendioxan è 23.400 volte più attivo sull' α_1 che sull' α_2 .

Ora si vedranno le ultime due classi, la prima sono farmaci, la seconda sono molecole che hanno solamente aiutato a caratterizzare i recettori adrenergici.

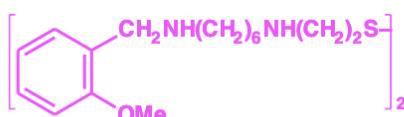
SAR: antagonisti irreversibili



Fenossibenzamina (α_1/α_2)

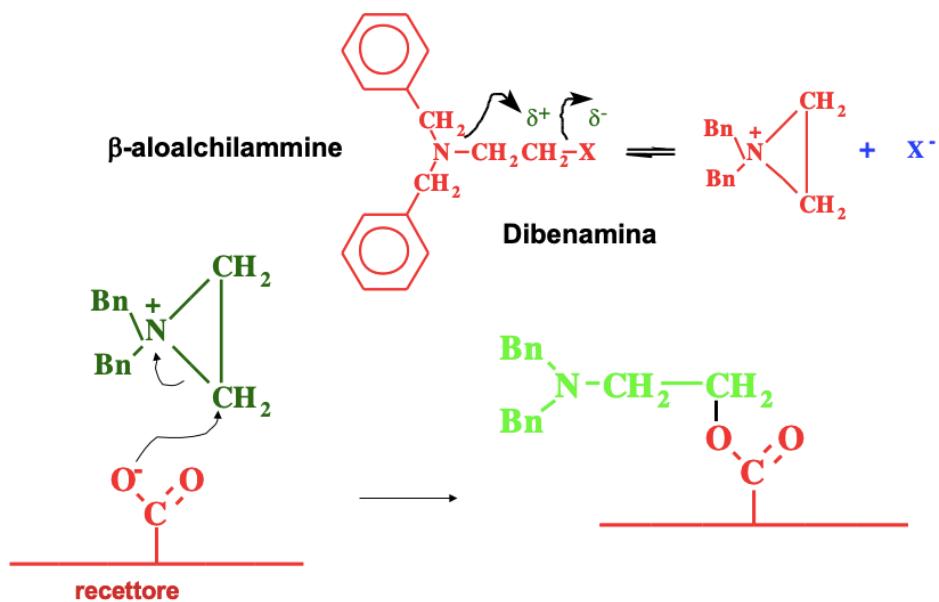


Dibenamina (α_1/α_2)



Benextramina (α_1/α_2)

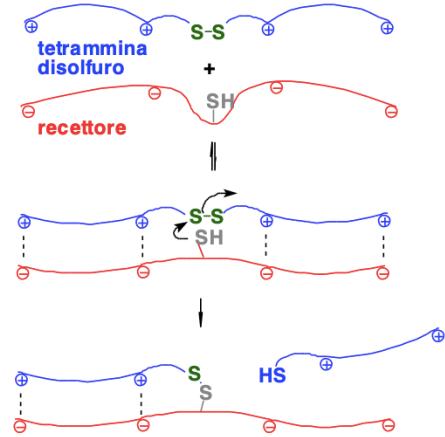
Fenossibenzamina e Dibenamina sono due cloroethylamine che agiscono come antagonisti irreversibili del recettore adrenergico, non sono selettive. In particolare, la fenossibenzamina, insieme alla fentolamina (come visto prima) è utilizzata nel feocromocitoma. Queste sono già state affrontate nella parte generale, dove sono stati analizzati i legami fra ligando e recettore e normalmente viene richiesto un antagonismo competitivo perché un farmaco è più sicuro quando antagonista e recettore si legano con legami reversibili. Nel caso specifico di queste cloroethylamine in realtà è vero che c'è un legame irreversibile (covalente) con l'aspartato del recettore, ma è un legame estereo facilmente idrolizzabile nel tempo.



Queste molecole agiscono attraverso la formazione di uno ione aziridinio, che si forma per la presenza del doppietto sull'atomo di azoto che attacca il -CH₂ legato all'alogenuro alchilico. Da questo attacco del doppietto sul -CH₂ che porta l'halogeno, si forma l'anello aziridinio dove la carica positiva è delocalizzata non solo sull'atomo di azoto ma anche sul -CH₂ dell'anello. Quando uno ione aziridinio reagisce con un gruppo carbossilato dell'enzima si ha un attacco nucleofilo del gruppo carbossilato sul -CH₂ (carica positiva

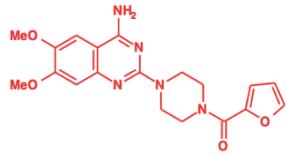
delocalizzata anche lì), l'anello si apre e si ha la formazione di un gruppo estereo. Ovviamente questo è sì un attacco covalente, ma è evidente anche che il farmaco rimane legato al recettore ma essendo un gruppo estero le esterasi ematiche hanno poi la capacità di rompere il legame. Questo è vero sia per dibenamina che per fenossibenzamina.

Non sono gli unici antagonisti irreversibili dei recettori $\alpha 1$ e $\alpha 2$ perché nella parte generale era stata vista anche la molecola della benextramina. Anche questa è un antagonista $\alpha 1/\alpha 2$ (non è selettivo) e in questo caso l'antagonismo è di tipo irreversibile. Questa tetrammina disolfuro agisce secondo un ancoraggio della tetrammina con le cariche positive (atomi di N protonati a pH fisiologico) con degli aspartato presenti sul recettore α , non sono solo gruppi aspartato ma anche gruppi glutammato, oltre a Asp del III dominio transmembrana. La tetrammina disolfuro oltre ad avere questo primo riconoscimento con i propri contro ioni sul recettore, intercetta sul recettore anche una cisteina, quindi un gruppo tiolico (-SH) con il quale il legame disolfuro della benextramina può dare una reazione di interscambio solfuro-tiolo (l'SH è la forma ridotta dello zolfo e S-S è la forma ossidata). Dall'attacco del tiolo sul disolfuro si ha la formazione di un nuovo legame disolfuro fra metà benextramina e il recettore adrenergico con la liberazione dell'altra metà della benextramina: questo ovviamente blocca il recettore in maniera irreversibile, perché il legame disolfuro è lungo e non si rompe facilmente. La stessa molecola (benextramina e congiunti) agisce come antagonista reversibile verso i recettori muscarinici, perché i legami che si formano sono solamente elettrostatici/ionici, nel recettore muscarinico non è presente il tiolo della cisteina che può dare questa reazione di interscambio. Da qui si deduce che la stessa molecola ha un meccanismo d'azione su un recettore diverso da quello che ha per un altro recettore in dipendenza delle caratteristiche della molecola e del recettore. Per esempio, la benextramina è stata trovata con una azione di inibizione reversibile sulle MAO, perché anche le MAO hanno questi gruppi tiolici delle cisteine in varie posizioni, per cui danno un meccanismo di inibizione irreversibile con benextramina. I recettori muscarinici invece con benextramina mantengono una inibizione reversibile/competitiva.

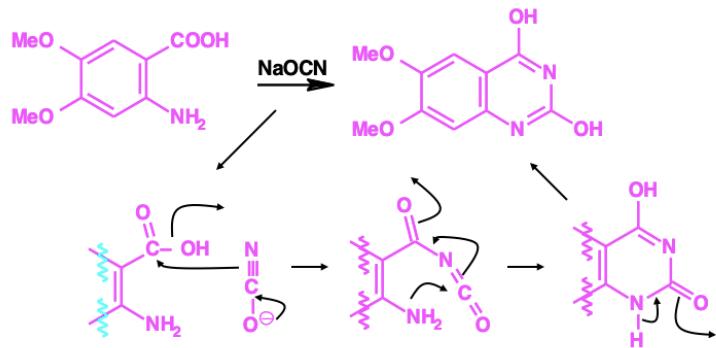


Quando si vuole fare uno studio per eliminare l'azione dei recettori $\alpha 1$ e $\alpha 2$ adrenergici farmacologicamente si bloccano questi recettori somministrando benextramina, poiché si è sicuri che blocca l'attività adrenergica.

SINTESI DI PRAZOSINA

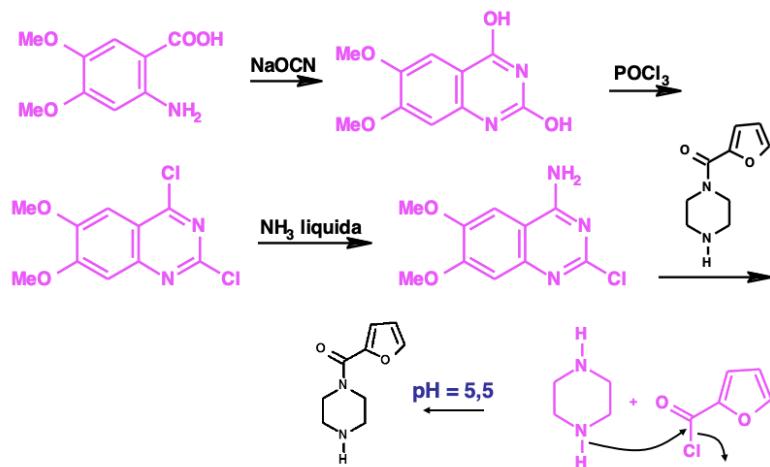


La sintesi della prazosina si basa sulla sintesi dell'anello chinazolinico e volendo il sostituente in posizione può essere variato introducendo la catena laterale di interesse.



La sintesi della prazosina parte dalla costruzione del nucleo chinazolinico e si parte da un anello aromatico sostituito sia con un gruppo amminico che uno carbossilico in cui sono già presenti i due metossili: acido 3,4-dimetossiantranilico. (L'acido antranilico è già stato incontrato quando sono stati studiati i fenamati, inibitori della COX antinfiammatori, in farmaceutica I). Questo è il punto di partenza per costruire il secondo anello.

Il secondo anello si costruisce per la reazione sia del gruppo carbossilico che amminico con il cianato di sodio, ovviamente si ha un doppio attacco: prima sul carbonilico dell'acido carbossilico, poi successivamente un secondo attacco del doppietto del gruppo amminico sul carbonile del cianato, un riarrangiamento della molecola perché inizialmente si ha la formazione del ciclo non aromatico ma alifatico (gruppo amminico), ma l'aromatizzazione è favorita e quindi dalla struttura alifatica si arriva poi al tautomero per dare la 2,4-diidrossi-6,7-dimetossichinazolina.



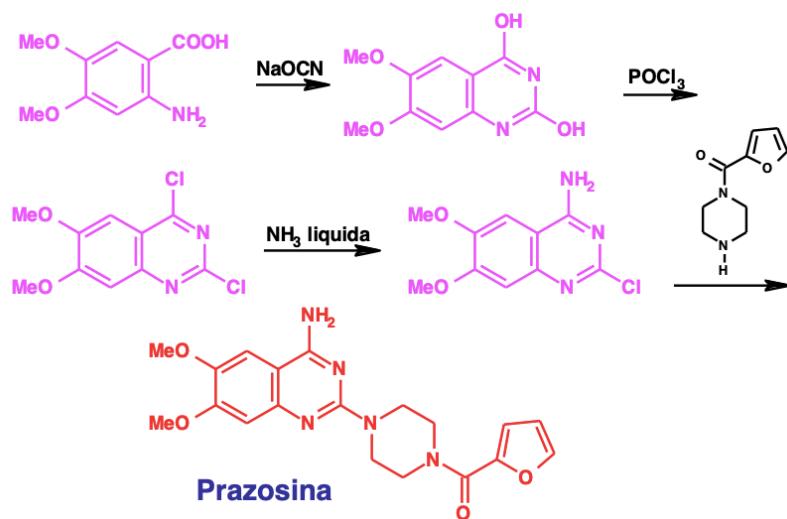
A questo punto, si è arrivati a quella chinazolina con due gruppi -OH, con una reazione che va con una resa elevatissima. In realtà ora è possibile trovare in commercio l'intermedio che stiamo vedendo e quindi ora si preferisce acquistarlo e la reazione di sintesi comincia dallo step successivo.

Una volta fatto l'anello 2,4-diidrossi-6,7-dimetossichinazolinico, è necessario attivare quei due gruppi -OH, che si potrebbero attivare in vari modi. In realtà potrebbe venire in mente, quando si fa la trasformazione di un anello aromatico con due -OH per ottenere due clori, è la reazione con cloruro di tionile. In questo caso la

reazione con cloruro di tionile fa venire un brutto risultato e l'agente clorurante migliore è POCl_3 (ossicloruro di fosforo) in presenza di PCl_5 , ma va già bene solo con l'ossicloruro di fosforo. POCl_3 trasforma i due gruppi -OH in due Cl attivandoli, trasformando il composto in una diclorochinazolina. La diclorochinazolina è stata preparata perché bisogna andare a sostituire nelle posizioni 2 e 4 i rispettivi sostituenti; quindi, vanno fatte delle sostituzioni nucleofile aromatiche.

La prima reazione che si fa è con ammoniaca liquida, si lavora a freddo e in questa prima reazione si ottiene la sostituzione del gruppo amminico nella posizione 4. La posizione 4 è la più favorita da un punto di vista di sostituzione nucleofila con ammoniaca, perché sull'anello chinazolinico ci sono due atomi di N, che non favoriscono la sostituzione nucleofila, anzi la sfavoriscono. La posizione meno sfavorita è proprio la posizione 4, mentre la posizione meno reattiva è la 2 perché è compresa fra due atomi di N. La reazione che avviene principalmente è la sostituzione del cloro in 4, quindi il gruppo amminico che entra delocalizza il suo doppietto e a maggior ragione sfavorisce un'ulteriore sostituzione nucleofila.

A questo punto, bisogna sostituire anche la posizione 2, che deve essere sostituita in condizioni molto più drastiche. Prima di sostituire la posizione 2 è necessario preparare il residuo piperazinico ammidato con il cloruro di furanoile, come si fa? Per preparare quel reattivo, è necessario fare una reazione fra la piperazina e il cloruro del furanoile. La piperazina e il cloruro del furanoile potrebbero dare, se non si sta attenti, l'ammide su entrambi gli atomi di N. Per evitare ciò, si fa la reazione a pH controllato di 5.5. A questo pH uno dei due atomi di azoto è protonato ($-\text{NH}_2^+$), e quindi non ha più il doppietto libero per fare l'ammide. A pH 5.5 si protona solo uno dei due perché quando la diammina è distanziata da solo 2/3 metileni (come in questo caso) la protonazione di uno dei due azotii sfavorisce la protonazione dell'altro perché le due cariche sarebbero troppo vicine; mentre invece se si ha a che fare con un'ammina dove la distanza fra gli atomi di azoto è 6 (sono distanziati), si comportano come gruppi amminici indipendenti, non si influenzano reciprocamente e quindi a pH acido quella ammina sarebbe tutta protonata, come succede nelle ammine biogene (4 atomi di distanza fra gli atomi di N, si definiscono policationi). Quando sono così vicini un atomo di N influenza la protonazione dell'altro.

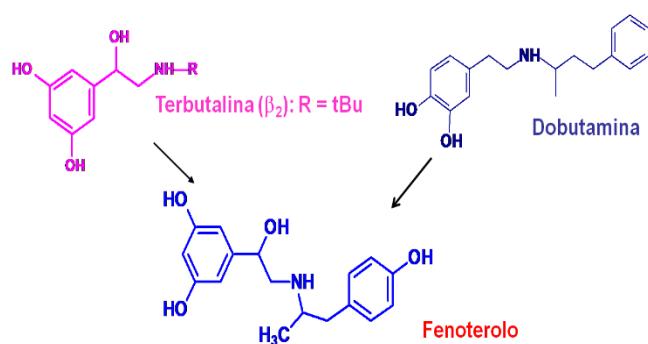


Quindi, un'idea sarebbe che si potrebbe proteggere uno dei due azotii, ma vorrebbe dire proteggere e riproteggere e quindi fare delle reazioni in più. Dipende ovviamente anche dal costo dei reattivi. Il furanoile cloruro viene fatto reagire con piperazina a pH 5.5 (visto mediante un indicatore, verde di bromocresolo), facendo una amminazione selettiva di uno dei due azotii della piperazina e infine si fa la reazione finale con la piperazina furanoilata. Questa reazione, visto che la posizione 2 è più difficile da sostituire, si fa in condizioni molto spinte, cioè ad altissima temperatura ($150\text{-}160^\circ\text{C}$ come temperatura di reflusso) e come solvente, che

permette di arrivare alla temperatura di reflusso, l'alcol isoamilico, che è un alcol con una alta polarità che favorisce la reazione e contemporaneamente ha un punto di ebollizione molto elevato (il reflusso si ha appunto attorno a 150-160°C). Questi solventi e queste temperature, visto che sono critici, sono importanti da ricordare.

AGONISTI β -ADRENERGICI (SAR)

Sulla molecola della terbutalina e dell'orciprenalina quindi, su derivati resorcinolici, sono stati fatti anche degli studi con un approccio chimico-farmaceutico che è quello dell'ibridazione molecolare e cioè l'inserimento nella stessa molecola di più gruppi farmacoforici. L'obiettivo è quello di avere un'azione più potente verso la patologia che si vuole colpire. Nel caso specifico del Fenoterolo è stato inserito al posto del terbutile, sull'atomo di azoto terminale, una lunga catena che termina con un gruppo aromatico derivato dall'alcol benzilico. L'idea di aggiungere questa funzione nella molecola della Terbutalina è venuta dalla struttura della Dobutamina. La Dobutamina, dove c'è un anello catecolico e non resorcinolico, mantiene una maggiore attività nei confronti dei recettori β_1 rispetto ai recettori β_2 perché l'eliminazione dell'OH in catena laterale è molto più sfavorevole per i recettori β_2 rispetto ai β_1 , quindi l'eliminazione di questo OH in catena laterale che è normalmente presente in tutti i derivati β adrenergici è molto sfavorevole per l'attività β_2 ma mantiene una certa attività per i β_1 . Dai vari studi di relazione struttura attività su queste molecole, si è preso la molecola della Terbutalina (mantenendo la struttura del resorcinolo e della prima parte della catena con la presenza del

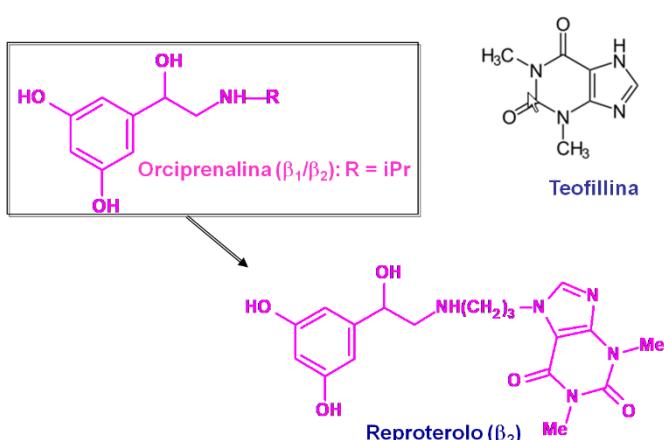


gruppo OH, fondamentale per questa azione) e si è andati a inserire sull'atomo di azoto il residuo farmacoforico che era stato visto promettente per l'attività nei confronti dei recettori β . In questo modo, si è ottenuto il residuo 4-idrossi-fenolico e questa ibridazione strutturale ha dato origine al Fenoterolo che differentemente dalla Dobutamina, proprio per la presenza sia del resorcinolo che del gruppo OH mantenuto, ha una selettività e una potenza maggiore nei confronti

del sottotipo recettoriale β_2 , mentre si perde molto l'attività nei confronti dei β_1 .

Un altro approccio sempre di ibridazione strutturale è quella che si è avuta nel Reproterolo. Nel Reproterolo si è fatta un'ibridazione molecolare fra l'Orciprenalina e la Teofillina. Cioè, si sono uniti i due gruppi farmacofori presenti uno nella Terbutalina/Orciprenalina e l'altro nella Teofilina. Il Reproterolo è usato negli aerosol contro l'asma bronchiale. I target coinvolti sono diversi. Mentre nell'ibridazione vista prima era confinato sempre nel campo dei recettori β , in questo caso si fa un'ibridazione tra un'agonista β_2 e un inibitore delle fosfodiesterasi che è la Teofillina.

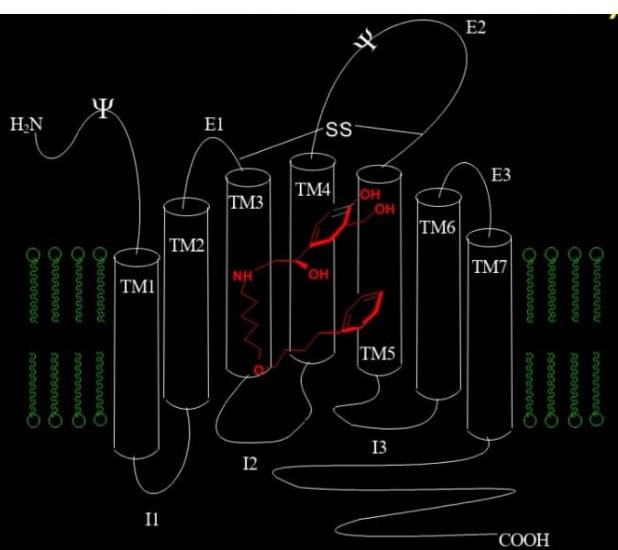
La teofillina è un alcaloide naturale e insieme alla teobromina e alla caffea sono delle xantina ovvero delle purine che oltre ad altre azioni, hanno anche una funzione analettica respiratoria, cioè, favoriscono la broncodilatazione. Esistono 5 sottotipi diversi di fosfodiesterasi e la loro inibizione porta ad un aumento dell'AMPc. L'inibizione delle fosfodiesterasi mediata dalle xantina va nella stessa direzione di un agonismo β_2 perché i



recettori β_2 sono accoppiati a proteina G_s e la loro stimolazione provoca un aumento dell'adenilato ciclasi e dell'AMPc. Quindi a livello bronchiale, tutte e due le porzioni della molecola, ovvero la porzione

dell'orciprenalina/terbutalina (che media l'effetto β_2) coniugata con la porzione purinica della teofillina dà un effetto sinergico alla molecola. Rimane da un lato un β_2 agonista che aumenta i livelli di AMPc e contemporaneamente la porzione purinica va nella stessa direzione e cioè inibendo la fosfodiesterasi aumenta l'AMPc che a livello bronchiale è la causa di broncodilatazione. Si è semplicemente preso la funzione amminica e la porzione dell'orciprenalina escludendo il gruppo R e con un linker propilico, cioè di 3 metileni, si è congiunto l'NH dell'orciprenalina con uno degli atomi di azoto presenti nella porzione imidazolica dell'anello purinico. Il Reproterolo è un potente agonista β_2 .

L'inserimento di una lunga catena legata all'atomo di N del Salbutamolo dà origine alla molecola del Salmeterolo



Salmeterolo: meccanismo d'azione

Sul salmeterolo sono stati fatti vari studi di relazione struttura attività e si è notato che, grazie alla flessibilità della catena, riesce a mettersi a forcina, cioè, si ripiega all'interno del recettore. La molecola del salmeterolo, in confronto alla molecola del salbutamolo, ha una durata d'azione maggiore. Nei farmaci che spesso vanno assunti in modo cronico perché usati nell'asma bronchiale, è favorevole una lunga durata d'azione perché questo diminuisce le somministrazioni giornaliere e il salmeterolo ha come vantaggio, rispetto alle altre molecole, quello di legarsi più fortemente al recettore e quindi di avere una durata d'azione maggiore e il motivo è che anche le altre porzioni della molecola danno delle interazioni additive con i vari residui transmembrana del recettore.

Potenza relativa e selettività di alcuni agonisti β

Se si vanno a confrontare le molecole di cui si è parlato, e cioè isoprenalina, salbutamolo, fenoterolo e salmeterolo, si ha un aumento della selettività nei confronti del recettore β_2 a mano a mano che si passa da una molecola all'altra. L'isoprenalina non è selettiva e quindi il rapporto di selettività è uguale a 1. Se si va invece a valutare il salbutamolo è 1375 volte più attivo nei confronti del recettore β_2 rispetto al β_1 e questo elimina molto gli effetti collaterali. La stessa selettività però, seppur esistente, non si osserva fra il recettore β_2 e il recettore β_3 . L'attività del β_2 è superiore ma rimane una residua attività β_3 .

Efficacia di alcuni farmaci

Un altro aspetto importante di queste molecole è che non sono tutti degli agonisti pieni: l'isoproterenolo sì, ma se lo si guarda in confronto a salbutamolo, fenoterolo, formoterolo e salmeterolo si osserva che l'efficacia percentuale, soprattutto per il salbutamolo e il salmeterolo, è inferiore, cioè, sono molecole che pur agendo sullo stesso sito recettoriale e pur avendo un'attività agonista, non raggiungono il 100% dell'attività del ligando endogeno o di ligandi che raggiungono il 100% dell'attività massima. Queste molecole tipo il salmeterolo e il salbutamolo che si comportano come agonisti parziali significa che hanno un'attività intrinseca minore di 1. Nel caso del salbutamolo è 0,86 e nel caso del salmeterolo è 0,63. Questo è un aspetto positivo perché i recettori β_2 sottoposti a esposizione cronica di agonisti pieni danno origine al fenomeno della down regulation e cioè

Composto	Atrio attività inotropa	Bronchi attività rilassante	Adipociti attività lipolitica	Selettività	
	β_1	β_2	β_3	β_2/β_1	β_2/β_3
Isoproterenolo	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Salbutamolo	0,0004	0,55	0,002	1.375	275
Fenoterolo	0,005	0,6	0,02	120	30
Salmeterolo	0,0001	8,5	0,009	85.000	945

Composto	Efficacia %	
	β_1	β_2
Isoproterenolo	100	100
Salbutamolo	14	86
Fenoterolo	100	100
Formoterolo	100	100
Salmeterolo	4	63

rispondono meno alla stimolazione dei ligandi. La desensitizzazione o down regulation dei recettori è mediata da vari meccanismi, sia una minore sintesi della proteina recettoriale, sia una sua internalizzazione nella membrana. Questo comporta che con l'uso cronico, il recettore risponda sempre meno. Questo effetto di down regulation recettoriale diminuisce quando non si ha un'attivazione del 100% del recettore. Quindi nel caso specifico dei recettori β_2 , l'utilizzo di agonisti parziali (ovviamente devono avere una certa attività e affinità) è favorevole perché dà meno origine a questi fenomeni di down regulation. Nonostante siano agonisti parziali sono farmaci molto efficaci. Il salmeterolo, oltre a stimolare i recettori β_2 a livello bronchiale, quindi tramite l'aumento dell'AMP ciclico si ottiene broncodilatazione, ha anche un altro effetto nel processo infiammatorio di edema che si osserva nelle patologie asmatiche e nella broncopneumopatia ostruttiva cronica ovvero agisce anche nell'inibizione del rilascio di mediatori infiammatori quali per esempio bradichinina, prostaglandine, istamina che sono alla base delle patologie asmatiche. Questo favorisce ulteriormente l'effetto broncodilatatorio e porta ad una diminuzione dello stravaso e quindi dell'edema che si osserva in queste patologie. L'azione, oltre che mediata dai recettori β_2 , è anche mediata da un'inibizione del rilascio di mediatori infiammatori.

Potenze degli enantiomeri di alcuni agonisti β_2 adrenergici

Un altro aspetto importante è l'importanza della stereochimica. Qui sono messi in evidenza i vari eutomeri e distomeri dei vari derivati. In tutti i casi l'EC50 dell'enantiomero R è molto inferiore rispetto a quello dell'enantiomero S e questo vuol dire che la costante di dissociazione è favorevole per l'enantiomero R in quanto è molto più attivo dell'enantiomero S a concentrazioni molto inferiori. Il rapporto eudismico è molto superiore a 1. Ad esempio, la Terbutalina S è completamente inattiva.

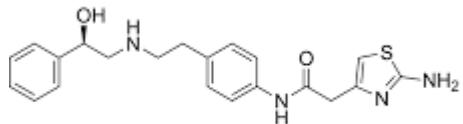
Composto	Enantiomero R EC50 nM	Enantiomero S EC50 nM	Rapporto S/R
Salbutamolo	3,6	1.070	300
Salmeterolo	1,7	80,7	47,5
Terbutalina	52,0	174.000	3.350

È stato dato maggiore rilievo agli agonisti dei recettori β_2 in quanto sono quelli maggiormente rappresentati ed usati nelle patologie di broncospasmo. Ma l'uso degli agonisti che agiscono sui recettori β_1 non va dimenticato; infatti, essendo questi recettori alla base degli effetti cronotropo, dromotropo e batmotropo del cuore, qualora ci siano delle turbe della conduzione soprattutto atrio-ventricolare e la sindrome che porta ad un effetto dromotropo negativo, in questo caso vengono usati gli agonisti B non selettivi, come l'orciprenalina non selettiva. In questo caso, l'effetto collaterale di broncodilatazione è un effetto accettabile. Il problema è quando si ha un effetto β antagonista non selettivo poiché in quel caso si verifica anche broncocostrizione. Oltre all'orciprenalina, altre molecole che vengono usate sempre nello scompenso cardiaco, quindi nelle patologie cardiache sono: isoprenalina non selettiva è un agonista β_1 e β_2 , dobutamina che è prevalentemente un agonista B1 e vengono usati per aumentare la forza di contrazione del cuore, per dare un supporto inotropo. Altro effetto è quello spasmolitico uterino. L'isoxsuprina non si usa più a causa dei maggiori effetti collaterali ipertensivi, ma per l'effetto β_2 si usa una molecola non di prima scelta che è la ritodrina, spasmolitico uterino usato per diminuire le contrazioni nelle donne che rischiano di partorire in grande anticipo rispetto al previsto.

AGONISTI β_3 ADRENERGICI

Gli studi che si stanno facendo per identificare gli agonisti β_3 adrenergici, essendo coinvolti nella lipolisi sia degli adipociti bruni che bianchi, va nella direzione del controllo delle patologie metaboliche in particolare dell'obesità e del diabete di tipo II. In realtà, siccome i recettori β_3 sono presenti anche a livello vescicale, l'unico farmaco β_3 adrenergico che è usato in terapia è per le disfunzioni urologiche e non per i disturbi metabolici. Il problema principale per trovare un'attività β_3 selettiva è che hanno anche un'attività β_1 e quindi hanno effetti anche cardiaci. Il problema principale dei farmaci studiati (molecole che hanno raggiunto la fase di sperimentazione clinica 1 e 2 ma che poi spesso sono state abbandonate) è che gli studi sugli adipociti delle cavie animali non sono traslabiliblì sugli adipociti umani perché le caratteristiche sono molto diverse. Anche se ci sono varie molecole in fase di studio per la loro attività nei confronti del recettore β_3 , l'unica molecola che ha una certa selettività verso i recettori B3 e che è in terapia per la sua azione di rilassamento sulla muscolatura liscia vescicale, permettendo uno svuotamento regolare della vescica, è il Mirabegron. Esso richiama le

feniletanolammime a cui è legata una catena che porta sia un anello aromatico con un'ammide e termina con un amminotiazolo. Sebbene la molecola sia più selettiva nei confronti del recettore β_3 rispetto agli altri β_1 e β_2 , un effetto collaterale di questa molecola, se usata cronicamente, è l'ipertensione arteriosa perché mantiene anche un certo effetto nei confronti degli altri recettori adrenergici.

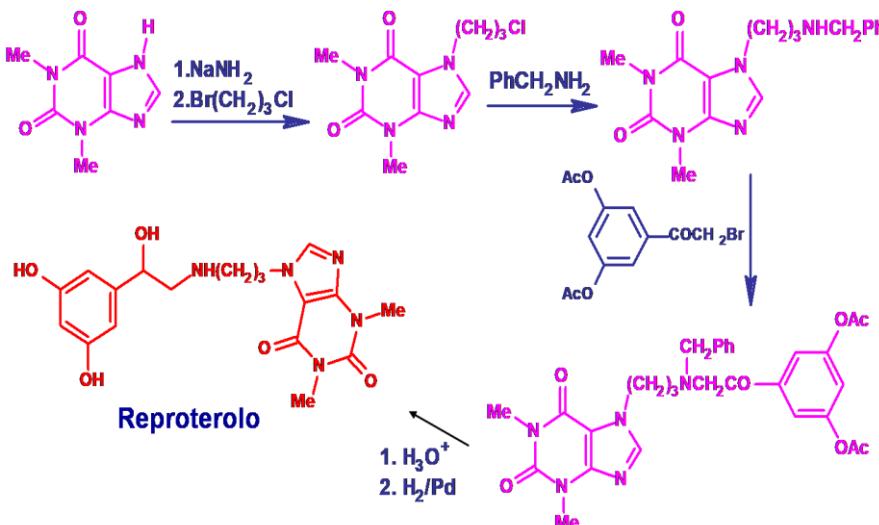


Sintesi del Reproterolo



gruppi ammidici. Si può spostare l'equilibrio verso la forma cheto andando a bloccare gli idrogeni, in questo modo si elimina la tautomeria in senso opposto. Nella tautomeria si osserva un trasferimento di massa e si eliminano questi idrogeni andando a sostituirli per esempio con delle metilazioni che sono utili perché nella molecola della teofillina si hanno gli azoti metilati. La prima reazione che si fa è la metilazione con dimetisolfato che porta alla metilazione di ambedue gli azoti. Quindi si blocca la struttura nella forma cheto e non si ha più la possibilità di avere l'equilibrio verso la forma enolica. Adesso si fa una nitrosazione dell'unica posizione libera dell'anello e si usa nitrito di sodio in ambiente acido che dà origine al nitrosonio, il quale attacca la posizione libera resa reattiva dalla vicinanza di un gruppo carbonilico e imminico. La nitrosazione di questi CH_2 non dà come prodotto principale il nitroso derivato ma questo, sempre per stabilizzazione in quanto si formano doppi legami coniugati, dà origine al suo tautomero ossimico. L'ossima è la forma tautomera del gruppo NO. Si ha un tautomero perché si ha il trasferimento di massa dal CH in questa posizione sull'O del gruppo NO. Adesso, per chiudere l'anello, e quindi per passare dall'anello pirimidinico all'anello purinico, si deve inserire un anello imidazolico. Quindi si deve fare in modo che l'immina e l'ossima diventino due gruppi amminici in maniera da chiudere il ciclo. Prima di tutto si deve ridurre sia l'ossima che l'immina e questo si può fare con ferro e acido cloridrico o con zinco e acido cloridrico. In queste condizioni, a freddo, non si ha nessuna preoccupazione di ridurre anche le ammidi più difficili da ridurre, e quindi questa riduzione è selettiva per gruppi più facilmente riducenti e cioè per l'ossima e l'immina. Da questa riduzione, si ottengono i due gruppi amminici che si fanno reagire con l'acido formico che permette di chiudere l'anello e permette di ottenere il secondo anello imidazolico. Il gruppo amminico dà l'ammidazione con l'acido formico e il secondo gruppo amminico attacca il carbonile e dà origine al secondo anello imidazolico e così si è ottenuto l'anello purinico. All'anello purinico, attraverso il linker di tre metileni, si deve legare la porzione resorcinolica, cioè, dell'orciprenalina e della terbutalina. Per fare questo, si sfrutta l'NH della porzione imidazolica dell'anello purinico. Per strappare questo protone, non essendo così acido, si deve usare una base molto forte come la sodio ammide. Essa strappa il protone e a questo punto si può fare la reazione con il dialogenuro differentemente sostituito nelle due estremità e cioè il bromopropilcloruro. L'estremità col bromo è più reattiva dell'estremità col cloro perché il bromo è un miglior gruppo uscente del cloro. Anche se uso questo reattivo, si deve comunque stare attenti a non avere il dimero e quindi anche in questo caso si deve fare la reazione in eccesso di bromopropilcloruro per evitare la disostituzione e cioè che l'anello pirimidinico attacchi entrambe le estremità. A questo punto, la reazione avviene prevalentemente a livello dell'estremità che porta come alogenuro il bromo dato che è un miglior gruppo uscente e in questo modo si ha già la catena inserita attivata con un cloro. Adesso si deve legare l'altra porzione e prima di tutto si fa una reazione con la benzilammina.

Il Reproterolo è un ibrido strutturale che si è ottenuto tra i derivati resorcinolici quali orciprenalina e terbutalina e un anello purinico della teofillina. Prima di tutto si deve costruire l'anello purinico e siccome è un anello pirimidinico fuso con un anello imidazolico, si parte da una pirimidina. In particolare, si parte da una 2,6-diidrossi-4-amminopirimidina. Questa si trova in equilibrio tautomerico cheto-enolico e può dare origine a questo derivato nella forma cheto dove si ha i due



Si usa la benzilammina per prima cosa perché è molto più maneggevole, e poi soprattutto perché non dà origine, essendo uno degli idrogeni protetti con il benzile, a polialchilazione che si potrebbe avere se l'ammina non fosse protetta. Anche in questo caso, non si deve lavorare con un eccesso del derivato, cioè dell'alogenuro, perché, se si lavorasse in difetto dell'ammina si potrebbero avere delle polialchilazioni. Lavorando in eccesso di benzilammina, si ottiene per sostituzione nucleofila sull'alogenuro il corrispondente derivato che si deve fare reagire con la porzione resorcinolica. Questo derivato è un bromoacetofenone che ha i due gruppi OH del resorcinolo e per farlo si è dovuto proteggere il resorcinolo perché facendo la bromurazione della catena laterale se si avessero due gruppi OH liberi, questi potrebbero interferire sia dando una sostituzione elettrofila aromatica del bromo (essendo due gruppi attivanti sull'anello) e sia potrebbero sostituirsi col bromo. Principalmente potrebbero dare la bromurazione dell'anello essendo due gruppi attivanti. Quindi, prima di fare la bromurazione dell'acetofenone sostituito con i due OH si devono proteggere in forma di acetili, cioè di esteri con l'acido acetico. In questo modo sono protetti, sono due gruppi disattivanti e quando si va a fare la bromurazione dell'acetofenone si ha la reazione pulita e si attiva solo il CH₃ dell'acetofenone. A questo punto, si ha un'ammina e un alogenuro alchilico che danno sostituzione sul gruppo amminico e si è così inserito questa porzione nell'intermedio per arrivare al Reproterolo. A questo punto, in ambiente debolmente acido, che a freddo non rompe le ammidi, si deprotecteggono i due esteri ripristinando i due gruppi OH del resorcinolo e inoltre, con idrogeno su palladio si ha sia la riduzione del carbonile che dà origine al gruppo alcolico, sia la debenzilazione dell'azoto per ripristinare il gruppo NH. Nel caso in cui il gruppo carbonilico non si riducesse completamente, si può per esempio intervenire con sodioboroidruro. Ma siccome la debenzilazione è la reazione più lenta tra le due, se si debenzila si è già anche ridotto il carbonile. In questo caso, visto che l'idrogenazione fa 2 reazioni in una è il modo più favorevole. Si ottiene il Reproterolo, che dalla riduzione del carbonile esce come miscela racemica e come al solito si dovrà fare la separazione.

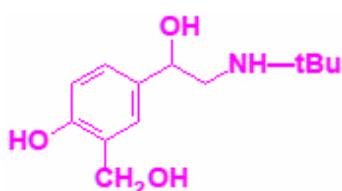
Lezione #15 di Chimica Farmaceutica II dell' 10/11/23

Docente: Anna Minarini

Sbominatore: Isabella Natali

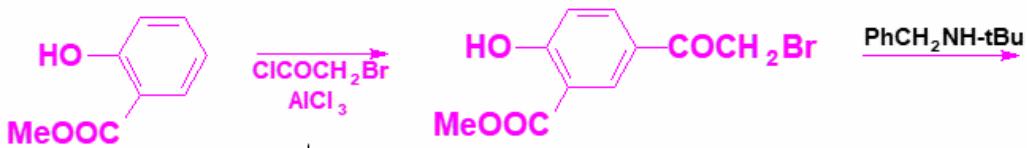
Revisore: Letizia Passali

Sintesi Salbutamolo

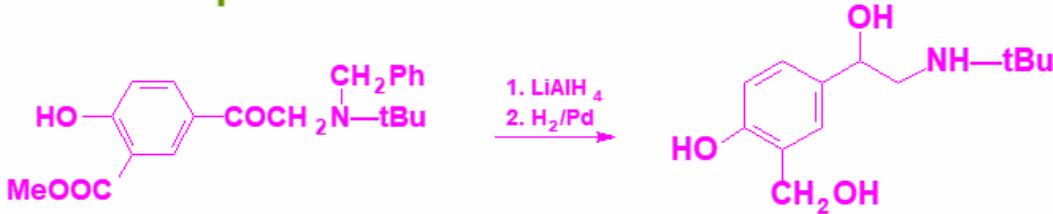


Il **Salbutamolo** è il derivato in cui il gruppo OH in meta è stato sottoposto a sostituzione bioisosterica con il gruppo CH₂OH. Per avere l'azione β₂ termina con terbutile come nella Terbutalina.

È caratterizzato da due sintesi ma solo quella che segue verrà affrontata.



Meccanismo visto in precedenza



Salbutamolo

1. Si parte dall'estere metilico dell'acido salicilico, quindi da un anello aromatico sostituito con un gruppo OH e con estere COOCH_3 in orto al gruppo OH.

Osservando il Salbutamolo è evidente che questa porzione implica che si abbia già pronto l'OH ed il vicino sostituente CH_2OH che si otterrà per riduzione dell'estere.

Bisogna a questo punto inserire la catena laterale e si hanno sull'anello aromatico due gruppi con caratteristiche diverse da un punto di vista di attivazione e disattivazione dell'anello. In particolare, il gruppo COOCH_3 è disattivante metaorientante, mentre l'OH è attivante a ortoparaorientante.

È una reazione già vista più volte ovvero un'acilazione di Friedel-Crafts (sostituzione elettronofila). Si ha un composto con due funzioni di cui quella con il bromo serve per attaccare tutta la catena laterale, mentre la funzione acilica dà una sostituzione elettronofila aromatica. Quindi, pur essendo un composto bifunzionale avviene favorevolmente l'acilazione rispetto all'alchilazione. Si utilizza sempre l'acido di Lewis AlC_3 che favorisce la formazione dello ione acilonio che è la specie elettronofila. Dalla reazione di acilazione di Friedel-Crafts si ottiene il derivato Bromoacetofenone sostituito in meta con il gruppo COOCH_3 e in para con l'OH. È stata quindi inserita la catena laterale.

2. A questo gruppo attivato ovvero all'alogenuro bisogna legare la catena amminica con una sostituzione nucleofila classica. Per evitare polialchilazioni si utilizza la terbutilammina (dato che bisogna attaccare il gruppo terbutilamminico) sempre protetta con il benzile, come è stato già visto precedentemente.

Quindi dalla sostituzione nucleofila si ottiene il corrispondente derivato protetto con il benzile.

3. A questo punto seguono una serie di reazioni perché il carbonile va ridotto, l'azoto debenzilato e il gruppo acetossilico ridotto. Quindi, si deve utilizzare un riducente diverso dal sodioboroidruro o dall'idrogeno su palladio. Si ricorre al litioalluminiodruro, un riducente forte che riduce l'estere metilico nel corrispondente alcol CH_2OH che è il gruppo funzionale caratteristico del Salbutamolo. Tramite il litioalluminiodruro avviene anche la riduzione del carbonile.

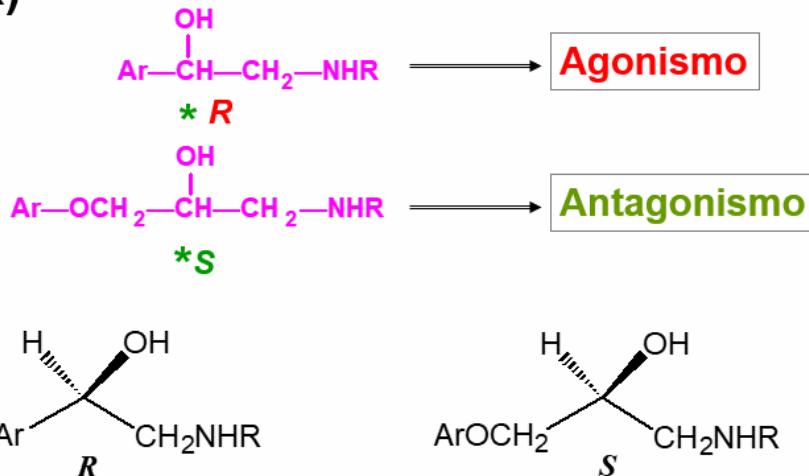
Quindi il litioalluminiodruro riduce contemporaneamente l'estere ad alcol ed il carbonile ad alcol. Poi tramite un'idrogenazione su palladio si fa la debenzilazione per deproteggere l'atomo di azoto che deve essere secondario. In questo modo si ottiene il Salbutamolo.

Segue un argomento relativo sempre agli agonisti/antagonisti del recettore adrenergico, in particolare si sono trattati finora i beta-agonisti. Non rappresenta però l'ultimo argomento relativo agli agonisti adrenergici perché

oltre ai diretti ci sono gli agonisti ed antagonisti indiretti. Nelle lezioni che seguono vedremo soprattutto gli agonisti indiretti che sono farmaci usati in terapia soprattutto come antidepressivi.

ANTAGONISTI β -ADRENARGICI

(SAR)



Ci sono differenze sostanziali tra agonisti ed antagonisti β -adrenenergici. In particolare, le caratteristiche strutturali prevedono che gli agonisti appartengano alla classe delle fenietanolammine, mentre gli antagonisti beta di seconda generazione (utilizzati di più attualmente) facciano parte della classe delle arilossipropanolammine.

Nella prima classe il requisito fondamentale per avere azione agonista beta è che il carbonio che porta l'OH sia in configurazione R nelle fenietanolammine, mentre nelle arilossipropanolammine la configurazione assoluta è la S (a causa della diversa priorità dei gruppi legati all'atomo di carbonio).

Nell'immagine sono messe a confronto le due strutture. L'OH nell'una e nell'altra classe deve interagire nello stesso modo con il recettore. Quindi, la diversa configurazione è dovuta alle regole di priorità dei gruppi.

Come sono state modificate le strutture degli agonisti β per ottenere degli antagonisti selettivi per il sottotipo recettoriale $\beta 1$?

Il punto di partenza non è rappresentato dalla Terbutalina che ha una selettività prevalentemente $\beta 2$ ma dall'**Isoprenalina** che è una molecola agonista con attività $\beta 1$ in cui è proprio l'isopropile a mantenere questa affinità per $\beta 1$.

Quindi nel corso della storia della scoperta di molecole ad azione $\beta 1$ antagonista l'Isoprenalina è stata modificata in un primo step per portare ad

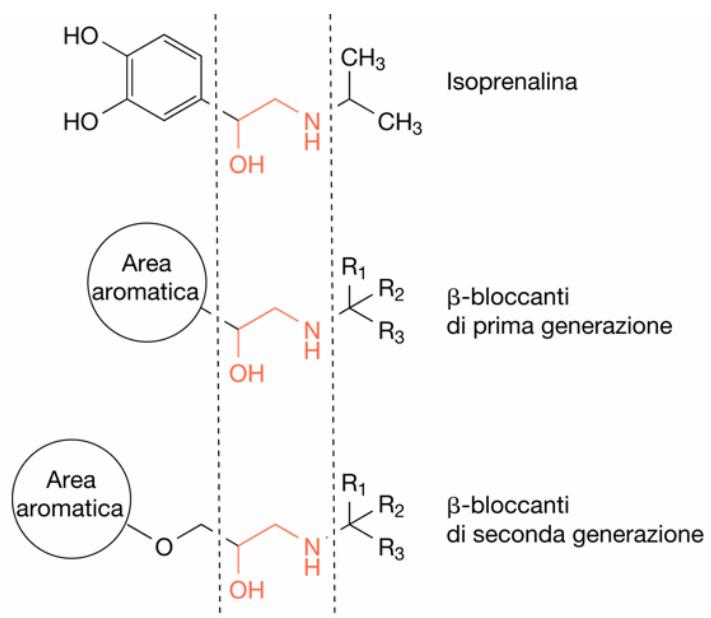
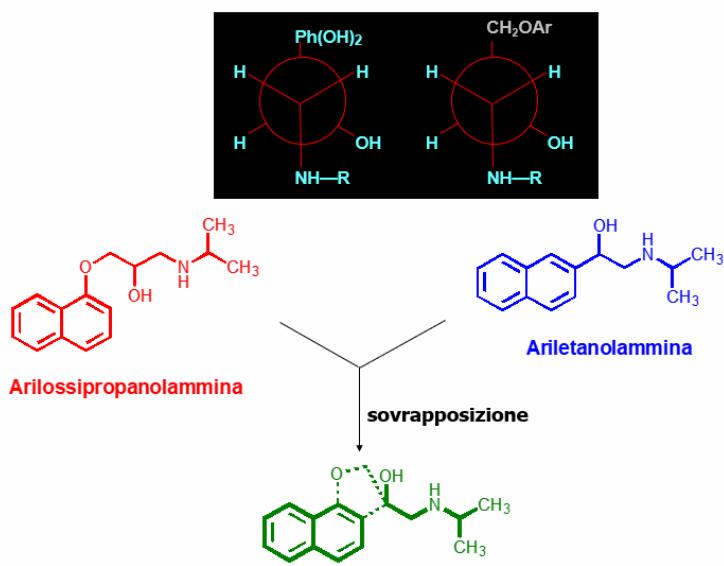


Figura 19.6 Struttura generale dei β -bloccanti, riproducendo il motivo strutturale dell'isoprenalina.

antagonisti di prima generazione il cui prototipo è il Propanololo, successivamente sulla base di studi di relazione struttura-attività visti per le molecole di prima generazione si è arrivati agli antagonisti $\beta 1$ di seconda generazione ovvero le arilossipropanolammine con un' aumentata selettività $\beta 1$ rispetto ai β antagonisti di prima generazione.

In queste molecole è sempre presente un'area aromatica mai più rappresentata da un anello catecolico, non è più sostituita con 2 gruppi OH, perché a questo o ai suoi bioisosteri è associata prevalentemente l'attività agonista e di nostro interesse sono gli antagonisti adesso. C'è sempre un atomo di azoto secondario la cui sostituzione per avere $\beta 1$ selettivi è data da un isopropile in genere. L'azione deve essere separata rispetto alla $\beta 2$ antagonista perché si rischierebbe di avere dei broncocostrittori. Siccome i farmaci betabloccanti (un altro modo per definire i farmaci antagonisti beta) sono utilizzati nelle aritmie cardiache come fibrillazioni atriali, ad esempio, la broncocostrizione rappresenta un effetto collaterale molto peggiorativo della patologia, per cui la separazione dell'attività risulta molto importante.



Il diagramma mostra la sovrapposizione delle due strutture. Le due molecole hanno una struttura simile, con un anello aromatico centrale e un gruppo amminico laterale ($\text{NH}-\text{R}$). La differenza principale è nel gruppo sostituente dell'anello aromatico: nell'Arilossipropanolamina c'è un gruppo $\text{Ph}(\text{OH})_2$ (dipolo alto), mentre nell'Ariletanolammina c'è un gruppo CH_2OAr (dipolo basso).

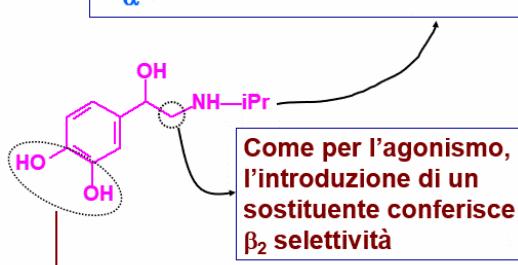
L'**Arilossipropanolammina** mantiene l'attività e l'interazione dell'OH analoga a quella di un' **Ariletanolammina** per via della porzione della molecola flessibile che può adattare il gruppo OH. Quindi le due strutture possono essere sovrapposte, come si vede nell'immagine sopra ed entrambe possono adattare il gruppo OH nella giusta posizione per interagire con la serina del recettore.

Una delle prime modifiche su queste molecole è stata la sostituzione dell'anello catecolico con un anello del naftalene.

Il gruppo catecolico è caratteristico per l'attività agonista; quindi, per ottenere un'azione antagonista i due OH sono stati sostituiti con un naftalene oppure sono stati eliminati o sostituiti con gruppi bioisosterici (non c'è più residuo catecolico).

(SAR)

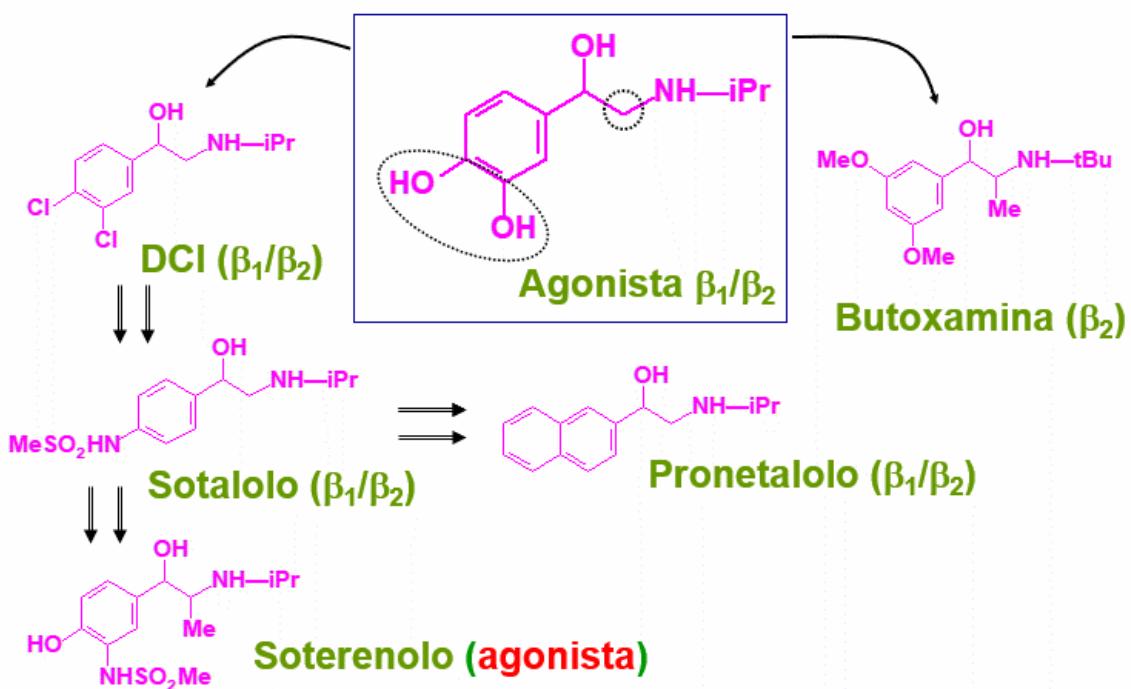
Fondamentale per l'azione α e/o β :
 $\text{H, Me, Et, i-Pr, t-Bu}$ $\xrightarrow{\beta}$
 $\xleftarrow{\alpha}$



**Il gruppo catecolico è caratteristico per l'attività agonista.
Per ottenere antagonismo si sono sostituiti i due gruppi fenolici con altri residui.**

In ogni caso è stato mantenuto solo il gruppo in posizione para. Inoltre, essendo l'isopropile quello a cui è associata l'attività $\beta 1$, i derivati che saranno oggetto di studio hanno un sostituente isopropilico sull'azoto. Un altro aspetto già visto per gli agonisti beta e che qui viene richiamato è che, anche per l'antagonismo, l'introduzione di un sostituente in catena laterale ovvero in α al gruppo amminico porta ad uno spostamento della selettività verso i $\beta 2$ e non è favorevole per queste strutture che devono essere $\beta 1$. Fatte queste premesse, vediamo le modifiche apportate:

I Generazione



L'Isoprenalina è il punto di partenza.

Qual è stata la prima evidenza che ha fatto scaturire l'idea che, sostituendo l'anello catecolico in maniera sostanziale, si potesse ottenere un'azione agonista, agonista parziale e antagonista?

Il primo dato che si è avuto è stato nel corso degli studi di relazione struttura-attività tramite la sostituzione dei due OH catecolici con degli atomi di Cl.

Quando sono stati affrontati gli α -adrenergici anche sulla molecola dell'adrenalina e della noradrenalina sostituendo degli atomi di cloro si aveva un calo di attività drastico per gli α_2 , mentre per gli α_1 si passava da un agonismo pieno ad un agonismo parziale.

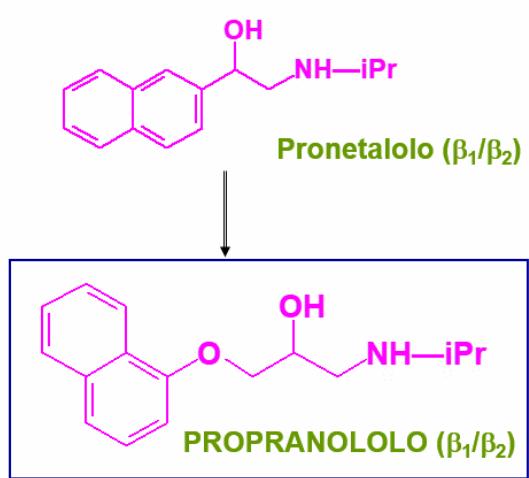
Anche nel caso dell'Isoprenalina la modifica dei due gruppi OH con due atomi di cloro per ottenere il **DCI** dicloroisoproterenolo o dicloroisoprenalina ha consentito di ottenere un agonista parziale β_1 e β_2 , cioè una residua attività agonista. Questo ha fatto pensare che la sostituzione di due gruppi con caratteristiche elettroniche quali gli alogenri diminuiva l'attività agonista e questa caratteristica poteva essere sfruttata per progettare degli antagonisti puri, ovvero senza azione agonista residua. Si è agito su due fronti; si è pensato a cosa potesse far aumentare la densità elettronica di un anello analogamente a due clori; quindi, è stato progettato un derivato con un naftalene. Cioè, si è fuso al primo anello, al posto dei due clori, un altro anello aromatico. In questo modo si è aumentata la densità elettronica.

Si è ottenuto il **Pronetalolo** che con l'anello naftalenico rappresenta il primo antagonista puro dei recettori β . Questo però non è selettivo, quindi è sia β_1 sia β_2 e non è mai entrato in terapia perché è estremamente hepatotossico, nel senso che il suo uso cronico può portare a carcinoma epatico.

In più si è pensato di vedere cosa potesse succedere con l'eliminazione di uno o entrambi gli OH del catecolo, considerando che nel catecolo risiede l'attività agonista. Già si è visto che due atomi di Cl diminuiscono l'attività, portando ad un agonismo parziale residuo e che quindi queste sostituzioni possono essere favorevoli allo spostamento verso l'attività antagonista. Quindi sono stati fatti degli studi eliminando uno o l'altro OH.

Si è visto che eliminando l'OH in meta e sostituendo all'OH in para un gruppo bioisosteroico (già visto come gruppo bioisosteroico dell' OH ovvero una solfonammide) si otteneva antagonismo senza avere selettività $\beta 1$ sopra i $\beta 2$. Il **Sotalolo** è ancora usato come β -bloccante ma non è di prima scelta perché ha ancora azione $\beta 2$. Per confermare l'importanza dei gruppi OH o loro bioisosteri sull' anello basta osservare cosa succede quando si rimette un gruppo OH e una solfonammide sulla molecola della Isoprenalina. Si ottiene di nuovo un agonista. Infatti, abbiamo già visto che andando a sostituire, tramite una sostituzione bioisostetica, il CH₂OH in meta della terbutalina e della orciprenalina si mantiene l'agonismo presente nel salbutamolo.

Quindi l'eliminazione dell'OH in meta è un punto importante. Un altro dato importante che si è avuto è che, se si mette un terbutile, si inserisce un metile che dà maggiore selettività per $\beta 2$, si eliminano gli OH catecolici e si sostituisce il resorcinolo con due metossili, si ottiene un antagonista $\beta 2$. Sono quindi delle sostituzioni da evitare per un antagonista $\beta 1$ selettivo.



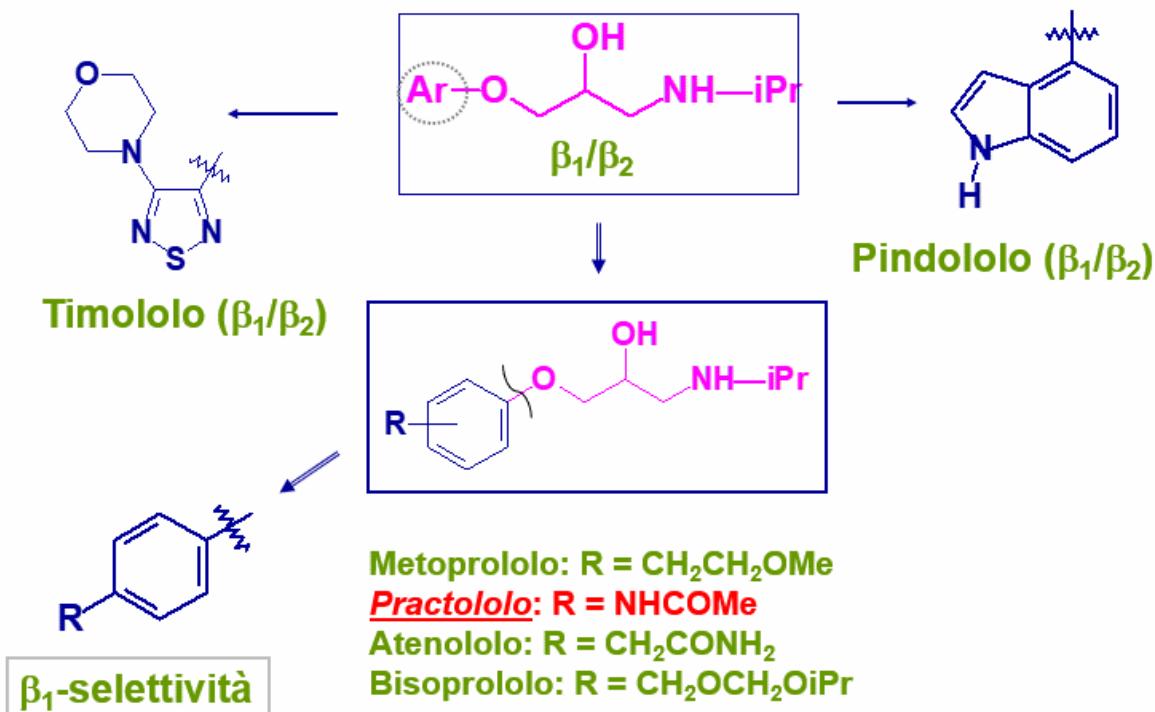
Per capire come si arrivati a quelli di seconda generazione si parte dal Pronetalolo e dal Sotalolo.

Il **Pronetalolo** non è mai stato un farmaco. È molto tossico per il fegato per un accumulo di naftalene che è un intermedio tossico.

Per prima cosa e per caso si è pensato di vedere cosa potesse succedere utilizzando come metabolita il naftolo con un gruppo OH (coniugato e escreto più facilmente) al posto del naftalene. Un' azienda farmaceutica, quindi, ha provato ad utilizzare al posto del naftalene l' α -naftolo perché l'unico disponibile. In realtà guardando la molecola del pronetalolo, sarebbe stato meglio fare il derivato con il β -naftolo, a causa della posizione dell'inserzione sul naftalene.

Comunque si è ottenuto il **Propranololo** che risultava essere un potente antagonista non selettivo, $\beta 1$ e $\beta 2$ con effetti collaterali molto minori per via della formazione dal metabolismo del naftolo più facilmente escreto. Vista quindi l'attività elevata del Propranololo è stato sintetizzato anche il derivato con il β -naftolo, cioè con l'inserzione della catena arilossipropanolamminica in posizione β del naftalene e non in α . L' attività però è risultava inferiore. Probabilmente partendo direttamente dal β naftolo non si sarebbe arrivati al Propranololo perché la distanza ottimale per avere l'interazione di questo gruppo OH è quando l'inserzione non è in β ma in α . Da questo caso è nata la classe di arilossipropanolammime. Il Propranololo è usato come beta-bloccante e anche nella profilassi di attacchi di emicrania, con un meccanismo non ancora del tutto chiaro.

II Generazione



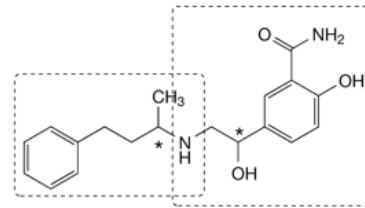
Nella seconda generazione sono state unite le due relazioni struttura- attività trovate, ovvero da un lato la catena arilossipropanolammina favorevole per antagonismo β_1 e dall’ altro la sostituzione in posizione para di gruppi bioisosteri dell’OH. Sono state ottenute varie molecole usate in terapia. Uno dei primi è il **Practololo** che è un ottimo β_1 bloccante ma ha degli effetti collaterali soprattutto a livello dell’occhio, quindi è stato ritirato dal commercio. **Metoprololo**, **Atenololo** e **Bisoprololo** sono i tre betabloccanti maggiormente utilizzati. Sono derivati arilossipropanolaminici, R è in posizione para e i sostituenti o contengono un gruppo ammidico (Atenololo= ammide invertita del Practololo) o l’ossigeno appartiene ad un gruppo metossilico (Metoprololo) o si hanno due ossigeni eterei (Bisoprololo). Per queste molecole β bloccanti è stata fatta poi una sostituzione bioisosterica dell’anello aromatico e i due risultati migliori si sono avuti con il **Timololo** e con il **Pindololo** che hanno una selettività β_1 e β_2 inferiore però a Metoprololo, Atenololo e Bisoprololo. Infatti, il Timololo presenta un anello tiadiazolico sostituito con una morfolina (anello morfolinico) e non è usato per uso sistemico ma in colliri per il glaucoma. Un’altra sostituzione bioisosterica è quella dell’anello aromatico con un indolo che dà origine al Pindololo.

ANTAGONISTI β -ADRENERGICI

Nella scorsa lezione abbiamo visto gli antagonisti beta adrenergici di seconda generazione, caratterizzati dalla catena arilossipropanolamminica, con il centro chirale in configurazione S e hanno in posizione para dei gruppi bioisosteri dell'OH in quanto mantengono la possibilità di dare legami a H con il recettore. Oltre a questi antagonisti beta adrenergici esistono delle molecole, non tutte sono in terapia in Italia, progettate come ibridi strutturali che hanno la capacità di agire contemporaneamente come antagonisti beta 1 e antagonisti alfa 1. Quale è il vantaggio di avere questa duplice azione antagonista?

Oltre agli effetti sul sistema cardiaco agiscono anche sul sistema vascolare e quindi si coniugano nella stessa molecola l'azione antipertensiva e antiaritmica. Una di queste molecole, presenti in terapia in Inghilterra ma non in Italia, è **Labetalolo**: contiene 2 centri chirali, che danno origine a 4 diastereoisomeri, lo stereoisomero con configurazione 1R4R, considerando che il C4 è quello che porta il metile, è più attivo sui recettori beta 1 e beta 2 con la stessa attività (per avere selettività β 1 il C1 deve avere configurazione R). Mentre l'1S4R è più attivo sugli alfa 1 (azione vascolare) e meno sui beta 1 e beta 2. In questo caso, negli stati in cui è commercializzato, è venduto come miscela dei 4 diastereoisomeri.

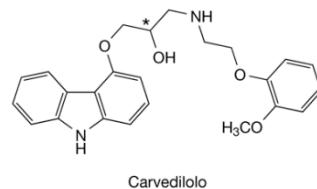
N.B Nella tabella c'è un errore, il diastereoisomero è 1S4R!



Labetalolo

	$\alpha 1$	$\beta 1$	$\beta 2$
1R4R	5.87	8.26	8.52
SS	5.98	6.43	< 6.0
SR	5.50	6.97	6.33
1R4S	7.18	6.37	< 6.0

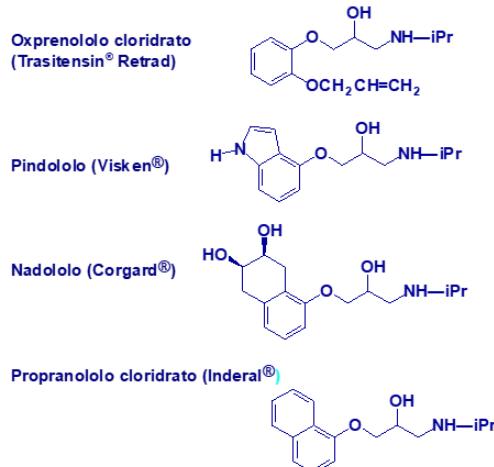
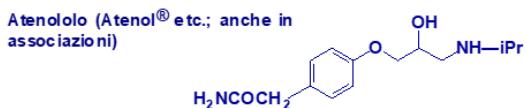
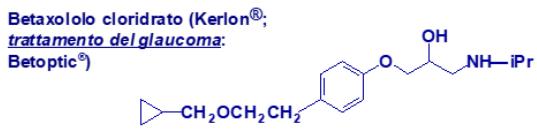
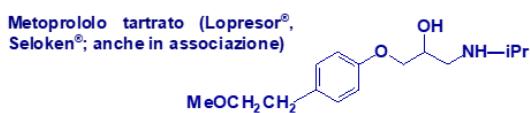
Un'altra molecola, usata in terapia in Italia, è il **Carvedilolo**: prende il nome dal triciclo legato alla catena arilossipropanolamminica, ovvero il carbazolo. Per l'attività betal la configurazione migliore è la S, mentre per l'alfa 1 abbiamo un'azione antagonista analoga per S ed R, quindi in questo caso quello che si usa è l'entantiomero S, perché è quello attivo sui beta 1 e ugualmente attivo sugli alfa 1. Se andiamo a vedere ER, notiamo che il pA2 per quello che riguarda l'atrio è 100 volte maggiormente potente l'S rispetto all'R (quindi sui recettori beta 1), mentre per quello che riguarda l'aorta (quindi gli alfa 1 vasali) il pA2 dell'S e dell'R sono molto simili, ciò significa che S ed R sono ugualmente attivi, quindi l'ER = 1. In conclusione, si utilizza l'S(-). Il Carvedilolo è quindi caratterizzato da



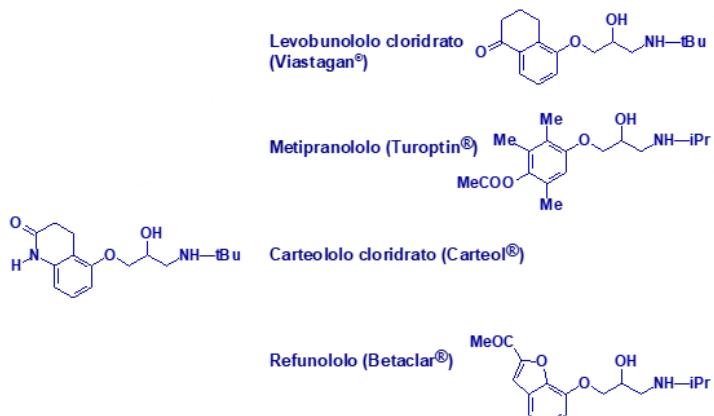
Carvedilolo

- Catena arilossipropanolamminica
- Catena ingombrante sul terminale amminico
- Carbazolo (triciclo): grazie alla presenza di questa struttura il Carvedilolo non avrà solo attività alfa1 antagonista e beta1 antagonista, ma anche calcio antagonista. I calcio antagonisti sono delle molecole che agiscono sui canali del calcio voltaggio dipendenti a livello cardiaco ma anche a livello vasale. Alcune molecole sono più affini ai canali a livello vasale altre molecole sono più affini a quelli che si trovano a livello cardiaco. Normalmente i calcio antagonisti sono utilizzati come antiaritmici, antipertensivi e antianginosi

Tra i farmaci usati in terapia (non è importante studiarle) per trattamento delle turbe cardiache funzionali, infarto miocardico, angina pectoris, ipertensione arteriosa e trattamento profilattico dell'emicrania abbiamo:



In terapia per il glaucoma abbiamo invece:



Metabolismo:

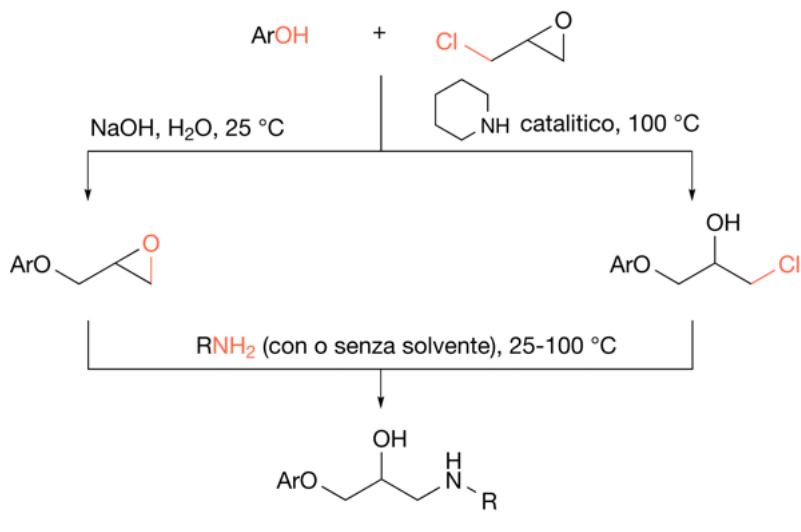
Oltre alla liberazione del corrispondente alcol per idrolisi, si verifica anche amputazione della catena legata al gruppo amminico. Il gruppo amminico ora libero può essere ossidato prima ad aldeide e successivamente l'aldeide può:

- essere ridotta ad alcol
- essere ulteriormente ossidata al corrispondente acido carbossilico

Aspetti sintetici:

La sintesi di tali composti può avvenire in vari modi. In questa immagine notiamo una sintesi generica che ha inizio con una eterificazione di Williamson a partire dal corrispondente alcol e etilcloridrina, la quale è utilizzata perché è un composto bifunzionalizzato; infatti, ha sia l'anello epossidico, che quando si apre dà origine all'OH della catena arilossipropanolamminica, ma ha anche l'alogenuro alchilico. In seguito all'eterificazione di Williamson, la sintesi può procedere in due modi:

- in ambiente basico di NaOH, a freddo, utile per formare il fenolato. Successivamente si ha apertura dell'epossido con la corrispondente ammina che si vuole andare a legare in catena laterale; l'epossido aprendosi dà origine al gruppo OH.
- In presenza di concentrazioni catalitiche di piperidina, a 100 °C. In queste condizioni si ha apertura catalitica dell'etilcloridrina, mantenendo però l'alogenuro alchilico che posso far reagire tramite una SN con la corrispondente ammina.



Sintesi del Practolo:

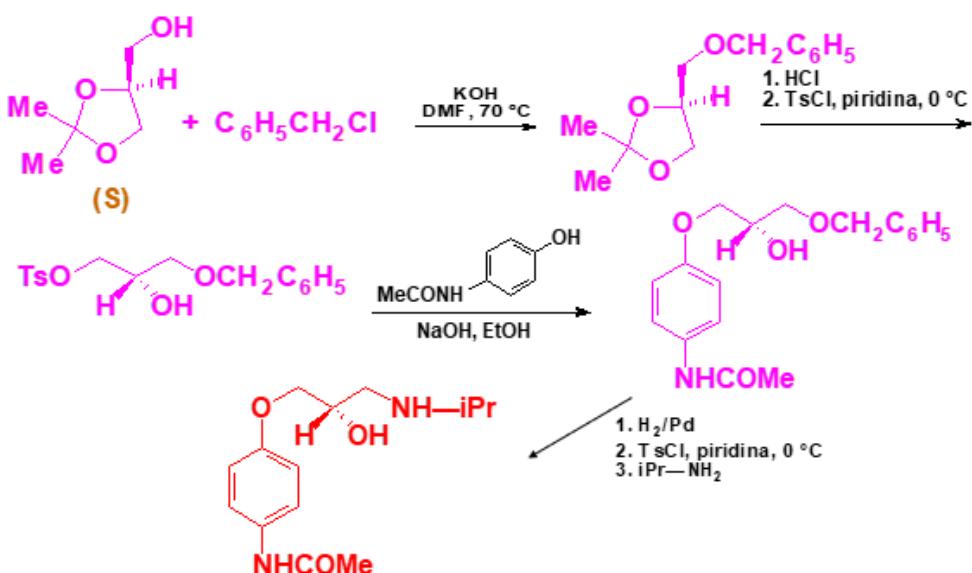
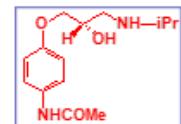
Non è più in terapia dal 2016 perché dava effetti collaterali a livello dell'occhio.

La strategia sintetica utilizzata in questo caso è partire dalla forma chetalica del glicerolo. Il glicerolo è una molecola con 3 gruppi alcolici, la forma chetalica è la forma protetta del glicerolo che posso realizzare facendo reagire il glicerolo con acetone, in presenza di acido paratoluensolfonico, che mi serve per fare la condensazione. Il glicerolo non ha centri chirali, ma nel momento in cui faccio la reazione con l'acetone, il C centrale del glicerolo è prochirale, sostituendolo diventa chirale perché legato a 4 gruppi differenti; utilizzo la configurazione S perché è quella che mi serve per fare le arilosipropanolamine. La forma protetta del glicerolo è un anello 1,3 diossolanico sostituito con due metili in posizione 2 e con gruppo idrossimetilico in posizione 5, quindi è un 2 di metil,5 idrossimetil 1,3 diossolano.

A questo punto posso proteggere anche l'altro gruppo OH; lo posso fare in ambiente basico per KOH in solvente, quale dimetilformammide, con benzil cloruro, faccio quindi una O-benzilazione. I 2 OH del glicerolo sono già protetti in forma di chetale, devo proteggere il terzo OH poiché nel passaggio successivo avviene l'apertura del chetale. Si ha apertura del chetale con HCl, si ripristinano i due OH e si libera acetone. Adesso ho nella molecola, un alcol secondario e poi quello iniziale del glicerolo che è primario. Sfrutto la diversa reattività di alcol primario e secondario facendo una reazione con Cloruro di tosile, che è uno dei modi con cui si attivano i gruppi OH per la sostituzione nucleofila. L'obiettivo è quello di mantenere l'alcol secondario in forma di OH e attivare solo l'alcol primario, per cui per rendere selettiva la reazione uso cloruro di tosile in piridina a 0 gradi (piridina serve come base per neutralizzare HCl che si libera dalla reazione), avrò così la tosilazione solamente dell'OH dell'alcol primario. Dopo aver tosillato l'OH primario, posso fare una SN per avere l'eterificazione: uso l'opportuno fenolo a seconda della catena legata in para all'anello aromatico. Dato che nel Practolo c'è l'acetanilide, sfrutto come fenolo il Paracetamolo. Si realizza la reazione in ambiente

basico (NaOH ha la funzione di strappare l' H dell' OH fenolico a dare il fenolato) e in EtOH che solubilizza entrambi i reattivi. Si ha la reazione di eterificazione sull' OH felico che porta alla formazione di un intermedio con gruppo secondario alcolico libero, la configurazione è rimasta S, ma ho formato la porzione arilossi. Vado ora a deproteggere il primo OH protetto con cloruro di benzile, facendo una debenzilazione con H_2 su palladio, poi vado ad attivare selettivamente l' OH primario appena liberato mediante tosil cloruro (ripeto la reazione di prima). L' OH secondario invece rimane libero. A questo punto faccio una SN con il gruppo amminico che devo legare. In questo caso l' N terminale deve essere legato ad un isopropile; quindi, faccio la reazione con isopropilammina e ottengo il Practololo.

ANTAGONISTI β -ADRENERGICI (aspetti sintetici:practololo)



ANTAGONISTI INDIRETTI

Terminiamo l'argomento relativo al sistema adrenergico, con gli agonisti indiretti, facendo un cenno anche sugli antagonisti, ma quello che dobbiamo studiare in maniera più approfondita è il tema degli agonisti indiretti, perché sono farmaci che agiscono soprattutto a livello centrale e molti di essi sono usati in terapia come antidepressivi.

Molte delle molecole che studieremo oggi influenzano anche il sistema dopaminergico e serotonergico, oltre che quello adrenergico, questo perchè per avere un aumento della dell'attività adrenergica devo agire sul rilascio e re up take delle catecolammime ed è inevitabile che, essendo i trasportatori delle catecolammime delle molecole molto simili nella struttura agli agonisti indiretti, andando ad agire su questi trasportatori ho azioni anche sui sistemi dopaminergico e serotonergico.

Questi sono farmaci che interferiscono con i meccanismi biosintetici e metabolici delle ammine biogene; possono bloccare la sintesi delle ammine biogene, possono anche andare ad influenzarne il rilascio e il re up

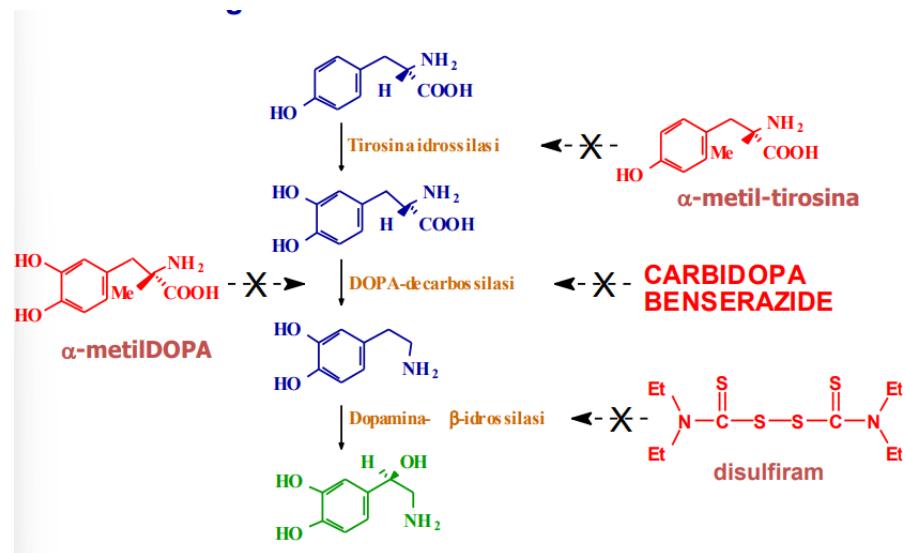
take. I meccanismi che oggi analizziamo riguardano le fasi del catabolismo e del metabolismo delle ammine biogene, del loro rilascio e del loro re up take. Tutti gli antagonisti o agonisti indiretti vanno a modificare una di queste fasi. A seconda dell'azione che hanno si distinguono in antagonisti o agonisti; se vanno ad aumentare la concentrazione sinaptica di adrenalina e noradrenalina sono degli agonisti indiretti, se invece ne bloccano il rilascio, metabolismo o biosintesi, abbiamo degli antagonisti indiretti.

Riprendiamo il meccanismo con cui dalla tirosina otteniamo la noradrenalina:

Si parte dalla tirosina che subisce ossidrilazione dell'anello aromatico, per mezzo della tirosinaidrossilasi, formando la Levodopa. A questo punto interviene la DOPA-decarbossilasi che provvede a rimuovere il gruppo COOH e successivamente si ha la beta idrossilasi che va ad ossidrilare la catena laterale, dando origine alla noradrenalina.

La dopa carbossilasi è molto importante per farmaci per il Parkinson, quindi nelle patologie che coinvolgono il sistema dopaminergico.

Come strutture recettoriali abbiamo: il recettore alfa 2 adrenergico presinaptico (il quale ha anche l'attività di modulare negativamente l'ulteriore rilascio di noradrenalina), i recettori alfa1 e beta1 adrenergici post-sinaptici e delle strutture

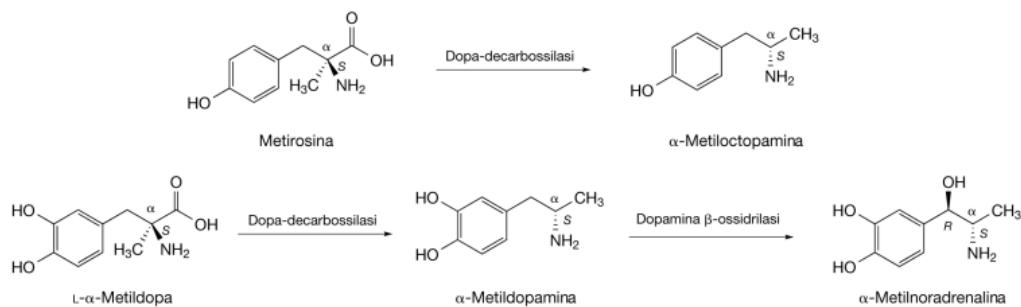


recettoriali e proteine di membrana deputate al re up take delle ammine biogene, nel momento in cui si trovano nello spazio sinaptico.

Possiamo agire a livello dell'enzima tirosinidrossilasi, a livello della DOPA-decarbossilasi o della Beta-idrossilasi, questo per quanto riguarda la via sintetica della noradrenalina. Inoltre, possiamo anche agire sull'inibizione dell'accumulo di noradrenalina. Queste sono le principali vie con cui in cui posso avere un antagonismo indiretto.

Come si evince dalla foto soprastante, le due principali molecole che agiscono a questo livello sono l'**alfa metil tirosina**, che bloccando la tirosin idrossilasi blocca la formazione della levodopa e contemporaneamente dà origine ad un falso NT e l'**alfa metil-dopa** che agisce sulla DOPA-decarbossilasi, ma poi prosegue anche nel processo di ossidrilazione, dando origine anch'essa ad un falso NT, che agisce anche come agonista alfa 2 presinaptico. Più importanti di tutti sono però la **Carbidopa e Benserazide**, che sono 2 inibitori della DOPA-decarbossilasi e si usano in associazione alla levodopa nel Parkinson e hanno un'azione esclusivamente periferica (non riportiamo la struttura, la studieremo quando faremo il sistema dopaminergico). Infine c'è una molecola che agisce sull'ossidrilazione della catena laterale della noradrenalina, ovvero sulla dopamina beta idrossilasi, che è il **disulfiram**, molecola usata anche per la disassuefazione da alcol (etilismo), perché ha anche azione sull' alcol deidrogenasi.

L'**alfa metil tirosina** subisce l'azione della DOPA-decarbossilasi, dando origine all'**alfa metiloctopamina** che si comporta da falso NT. L'**alfa metildopa** agisce analogamente alla Clonidina: subisce l'azione da parte della DOPA-decarbossilasi a formare l'**alfa metildopamina**, poi questa subisce l'azione della dopamina beta ossidrilasi a formare l'**alfametilnoradrenalina** che è un alfa 2 agonista con azione centrale, esattamente come la clonidina.

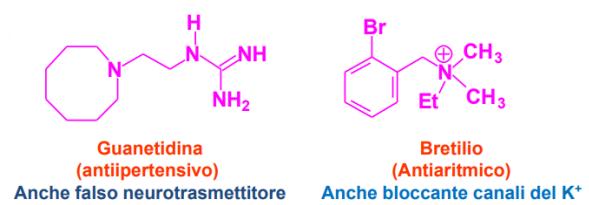
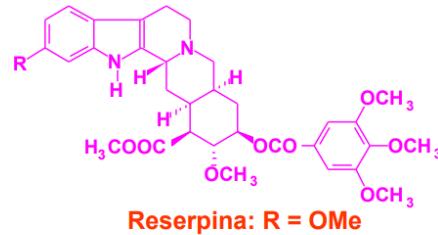


Queste sono le due vie che portano alla formazione di due falsi NT; mentre l'alfametiloctopamina è solo un falso NT, l'alfametilnoradrenalina è anche un agonista alfa2 centrale. Ambedue sono usati come antipertensivi ma non di prima scelta.

Nella Carbidopa invece rispetto alla levodopa, abbiamo il gruppo idrazinico al posto di quello amminico e inoltre un gruppo metilico. La Carbidopa si somministra in associazione alla Levodopa.

Un'altra molecola è la **Reserpina** (alcaloide indolico ormai obsoleto), è una molecola che aumenta la deplezione delle ammine biogene, non è selettiva solo per la noradrenalina, facilita lo svuotamento delle vescicole di immagazzinamento delle ammine biogene. Non è selettivo, agisce bloccando il trasportatore vescicolare. Al rilascio massivo di noradrenalina si accompagnano picchi pressori, che portano poi, a causa della degradazione delle MAO e delle COMT, ad una riduzione dei livelli di catecolammime, quindi si ha un effetto di antagonismo indiretto verso le catecolammime. La reserpina non è più utilizzata ed è stata incriminata come molecola che induce suicidio, perché porta a sbilanciamento delle ammine biogene. Infine, due molecole:

- **Guanetidina**: non è in terapia in Italia. Inibisce il rilascio di catecolammime e si comporta anche da falso NT, è caratterizzata dal gruppo guanidinico.
- **Bretilio**: è in terapia in Italia, è inibitore del rilascio di catecolammime ma agisce come bloccante dei canali del K+ e quindi la sua azione antiaritmica è mista, sia perché inibisce il rilascio di catecolammime sia per la sua azione di bloccante dei canali del K+.



AGONISTI INDIRETTI

Gli agonisti α_1 indiretti agiscono prevalentemente attraverso la **facilitazione del rilascio di catecolammime**, anche se hanno anche altri effetti. Ne abbiamo un po' accennato quando abbiamo fatto l'efedrina, che sicuramente agisce come agonista α_1 diretto ma ha anche un'azione agonista indiretta.

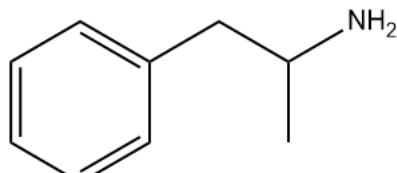
Funzione:

Da un punto di vista della funzione queste molecole hanno:

- azione **decongestionante nasale** (tipica come abbiamo già visto degli agonisti α_1 diretti),
- effetti **anorezzizzanti**,
- ma anche effetti psicotropi (es. anfetamine), euforizzanti e alcune di esse anche allucinogeni.

Quindi non sono molecole di interesse terapeutico.

Struttura:

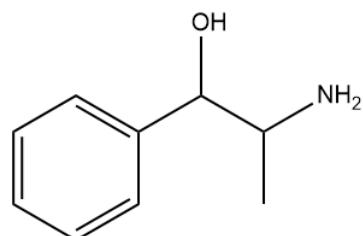


Struttura base delle fenilpropilammime

Da un punto di vista strutturale sono **fenilpropilammime**, o **fenilpropanolammime** a seconda della catena laterale.

Abbiamo questa struttura caratterizzata da un anello aromatico a cui è legata una catena propilaminica dove l'ammina può essere

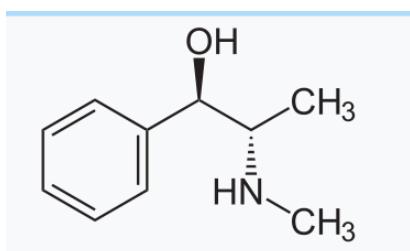
ulteriormente sostituita con gruppi metilici.



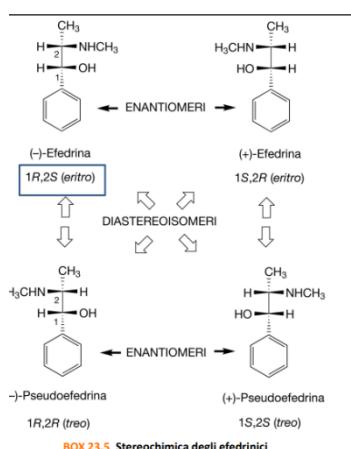
Struttura base delle fenilpropanolammime

Efedrina

L'**efedrina** è una fenilpropanolammima. Ha un gruppo OH in catena laterale, un gruppo metilico in catena laterale e un metile sul gruppo amminico. Ha due centri chirali: l'efedrina corrisponde allo **stereoisomero 1R,2S** e come abbiamo già detto ha azione anche **agonista α_1 diretta**. La presenza di due centri chirali da origine a coppie di enantiomeri e coppie di diastereoisomeri.



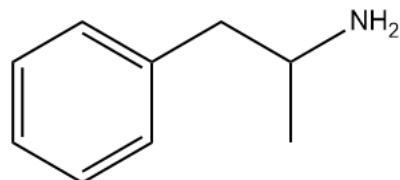
Efedrina



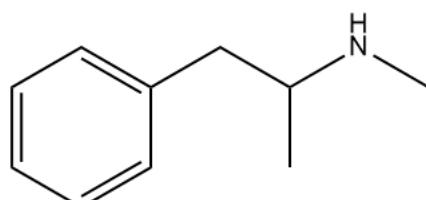
Il **diastereoisomero 1S,2S**, chiamata **pseudoefedrina**, ha solo azione **agonista indiretta**, quindi di facilitazione del rilascio di catecolammime.

Amfetamine e catinoni

L'eliminazione dell'OH in catena laterale è la caratteristica tipica della classe delle amfetamine, di cui fa parte, ad esempio, la **metanfetamina** che è ancora più potente a livello centrale in quanto la lipofilia della molecola è aumentata dalla presenza del metile sull'atomo di N terminale.



Struttura base delle amfetamine (sono quindi semplicemente fenilpropilammime)



Methamphetamine

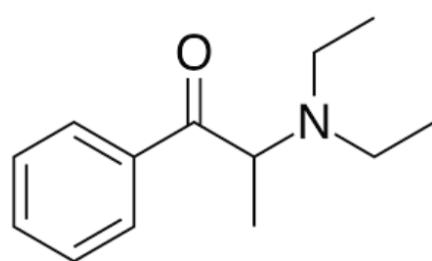
Amfetamina e S-metanfetamina sono considerate droghe d'abuso: attraversano entrambe la barriera ematoencefalica e hanno numerosi effetti collaterali, soprattutto a livello del sistema cardiovascolare e portano a danni irreversibili a livello centrale.

La loro azione anoressigena ha fatto sì che soprattutto l'amfetamina negli anni '70-'80 venisse associata alla dieta dimagrante.

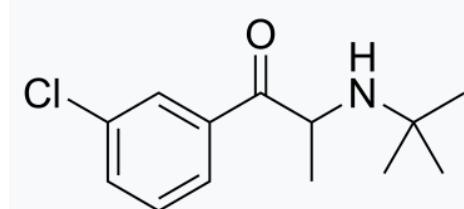
In realtà per il trattamento dell'obesità veniva molto usato l'**amfepramone**: questa molecola possiede due etili sull'atomo di N terminale e al posto dell'OH in catena laterale ha un carbonile, da qui il nome -one.

L'amfepramone è un analogo molto stretto della famiglia dei catinoni, di cui un rappresentante è il **bupropione**. Il bupropione possiede un

atomo di Cl sull'anello aromatico e un terz-butile sull'N terminale. Questa molecola viene utilizzata nella disassuefazione da fumo (come la varenicrina che abbiamo già fatto quando abbiamo studiato il sistema nicotinico).



Amfepramone



Bupropione

In Italia l'AIFA ha emesso note già da anni sull'amfepramone e quindi non viene più utilizzato, infatti viene considerata anch'essa una molecola psicotropa con gravi effetti collaterali quali soprattutto ipertensione.

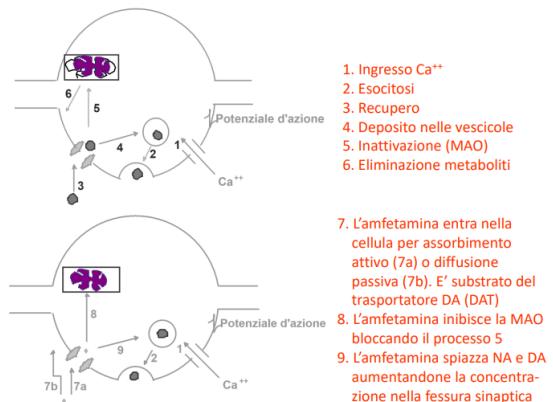
Meccanismi d'azione delle amfetamine

- Il meccanismo primario è la **facilitazione del rilascio di catecolammine**.

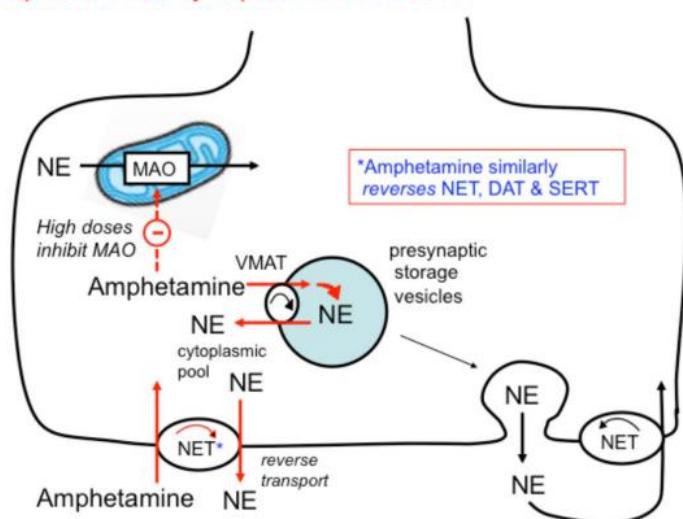
- Le amfetamine interagiscono con il trasportatore vescicolare della noradrenalina e quindi provocano la fuoriuscita di catecolammime da queste vescicole di immagazzinamento.

- Le amfetamine interagiscono anche con il trasportatore della noradrenalina della membrana presinaptica. L'amfetamina subisce il re-uptake a scapito della noradrenalina, che quindi rimane nella fessura sinaptica.
- 2. Ad alte dosi hanno anche un meccanismo secondario: hanno un'azione **inibitoria** nei confronti delle **monoammino-ossidasi (MAO) mitocondriali**. Le MAO mitocondriali sono gli enzimi deputati alla degradazione ossidativa del terminale amminico delle catecolammime. Quindi chiaramente le amfetamine aumentano la concentrazione di catecolammime perché inibiscono la loro degradazione.

Meccanismo d'azione delle amfetamine



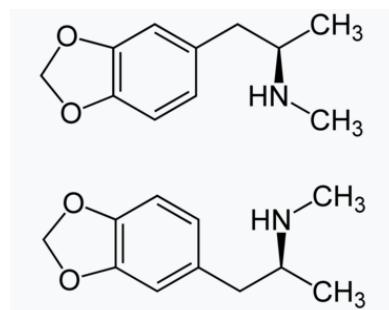
Amphetamine Synaptic Mechanisms

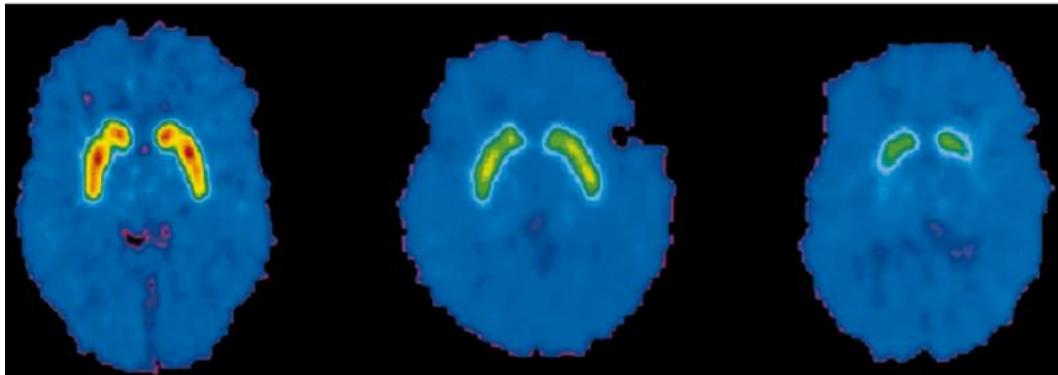


Le amfetamine agiscono prevalentemente con il trasportatore delle catecolammime (NET in inglese [da norepinefrina], NAT in italiano), ma hanno anche un effetto sul trasportatore di dopamina (DAT) e di serotonina (SERT).

Ecstasy

L'MDMA, comunemente nota come ecstasy, è un derivato amfetaminico. La struttura presenta due atomi di O congiunti in un ciclo, come se i due gruppi catecolici dell'adrenalina fossero legati tra di loro, da cui il nome metilendiossimetanfetamina. Pur avendo questi due atomi di O questa molecola attraversa la barriera emato-encefalica in dosi massive, infatti ha degli effetti non solamente euforizzanti ma anche allucinogeni, tipo l'LSD che studieremo poiché agisce sul sistema serotoninergico. Non sono solo effetti momentanei ma portano a danni irreversibili a livello dell'encefalo.





Progressione di un encefalo dopo due anni di assunzione di ecstasy

Molecole di uso terapeutico nella depressione

La patologia della depressione viene definita dall'*American Psychiatric Association* il più comune disordine mentale caratterizzato da sintomi quali mancanza di interesse e piacere nelle attività quotidiane, significativa perdita o acquisizione di peso, insonnia o ipersonnia, mancanza di energia, difficoltà di concentrazione, sensi di colpa e pensieri ricorrenti di morte o suicidio. Questi possono rappresentare episodi sporadici o una condizione cronica.

La depressione rappresenta una patologia che ha spesso un impatto sociale. Può essere una condizione primaria oppure può coesistere con altre malattie fisiche o mentali; può insorgere improvvisamente a causa ad esempio di lutti o stress oppure insorgere lentamente nell'arco di mesi o anni.

Domanda: Perché nel trattamento della depressione uno dei possibili approcci terapeutici involve molecole che agiscono a livello centrale aumentando la concentrazione di catecolammime, in particolare di noradrenalina?

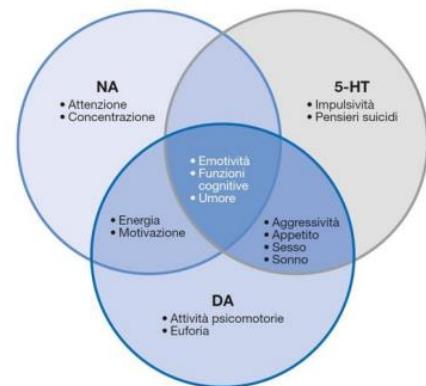
Risposta: Perché si pensa che alla base dell'alterazione del comportamento, del pensiero, dell'umore e dell'attività fisiologica siano sicuramente coinvolti squilibri delle principali ammine biogene, ovvero dopamina, serotonina e noradrenalina.

Nel caso della depressione dunque il principale intervento terapeutico è attraverso molecole che agiscono sul sistema dopaminergico, noradrenergico e serotonergico: alcune di esse in maniera selettiva, altre che agiscono contemporaneamente su più sistemi*.

*in realtà si interviene sul sistema dopaminergico nel caso principalmente di disturbi bipolari o schizofrenie.

Depressione

- Il trattamento della depressione è reso difficile dalla incompleta comprensione della natura e delle cause della malattia.
- La maggior parte delle teorie sulle cause della depressione si concentrano **sull'alterazione dei livelli delle amine biogene** come serotonina o 5-idrossi triptamina (5-HT), noradrenalina (NA) e dopamina (DA). Questi tre neurotrasmettitori regolano all'interno delle strutture del cervello funzioni fondamentali quali emozioni, reazioni allo stress, sonno, appetito e sessualità.



Interazioni dei neurotrasmettitori NA, 5-HT e DA nella depressione

Il trasportatore delle ammine biogene, costituito da 12 domini transmembrana, ha la funzione sulla membrana presinaptica di riportare all'interno delle sinapsi le catecolammime e altre ammine biogene nel momento in cui sono rilasciate. È dunque uno dei meccanismi con cui ho la terminazione dell'azione.

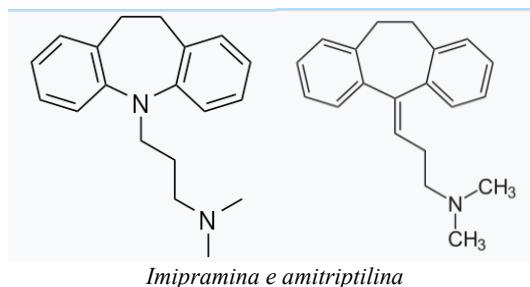
Farmaci antidepressivi

- Antidepressivi triciclici (TCA)

Gli antidepressivi triciclici agiscono andando ad inibire il **re-uptake delle ammine biogene** (non sono quindi selettivi, anche se agiscono prevalentemente sul sistema noradrenergico).

Queste molecole a struttura triciclica devono essere assolutamente differenziate da un punto di vista strutturale rispetto a quelli che sono i tricicli che studieremo invece come antipsicotici. Sono sempre molecole a struttura triciclica ma il triciclo ha una composizione e una struttura spaziale tale per cui tali antipsicotici agiscono sul sistema dopaminergico.

Le molecole prototipo di TCA sono l'**imipramina** e l'**amitriptilina**.

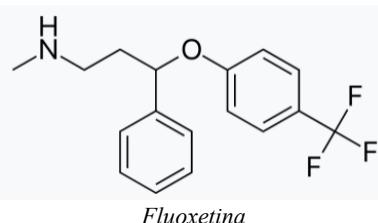


Imipramina e amitriptilina

- Inibitori selettivi del re-uptake della serotonina (SSRI)

Il prototipo di questa classe è la **fluoxetina**, ma oltre a questa troviamo il **citalopram** e altre.

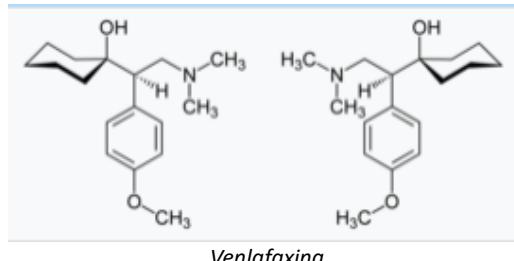
In questo caso l'inibizione è selettiva, mentre non possiamo dire la stessa cosa per i TCA, che non sono completamente selettivi per il sistema noradrenergico.



Fluoxetina

- Inibitori del re-uptake di noradrenalina e di serotonina (SNRI)

Il prototipo di questa classe è la **venlafaxina**.

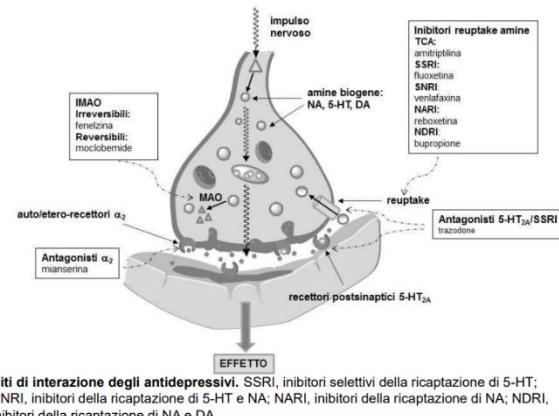


Venlafaxina

- Inibitori selettivi del re-uptake della noradrenalina (NaRI o NRI)

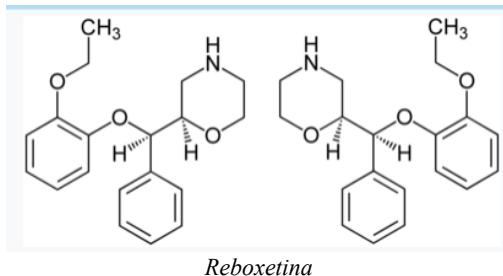
L'unica molecola che viene considerata selettiva per il solo re-uptake di noradrenalina con azione sempre antidepressiva è la **reboxetina**.

Farmaci usati nei disturbi affettivi e nella depressione



Siti di interazione degli antidepressivi. SSRI, inibitori selettivi della ricaptazione di 5-HT; SNRI, inibitori della ricaptazione di 5-HT e NA; NARI, inibitori della ricaptazione di NA; NDRI, inibitori della ricaptazione di NA e DA

EFFETTO



- **Inibitori del re-uptake di noradrenalina e dopamina (NDRI)**

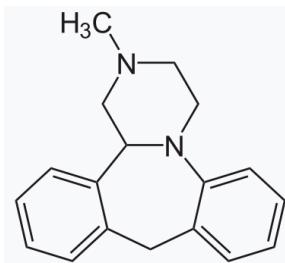
A questa classe appartiene il **bupropione**.

- **Inibitori delle monoammino-ossidasi (IMAO)**

Sono stati utilizzati molto in passato. Si distinguono in irreversibili: **tranilcipromina** e **fenzelzina**, e più nuovi i reversibili: **moclobemide**, ma per gli ampi effetti collaterali non risultato farmaci attualmente di prima scelta nel controllo della depressione.

- **Antagonisti α_2 -adrenergici presinaptici**

Per aumentare la concentrazione di noradrenalina nella fessura sinaptica possiamo usare un antagonista α_2 presinaptico. A questa classe appartiene la **mianserina**.



Mianserina

- **Antagonisti e inibitori del re-uptake della serotonina (SARI)**

Queste molecole hanno un effetto misto sul sistema serotoninergico, attraverso due meccanismi congiunti: si comportano come degli SSRI quindi sono inibitori del re-uptake della serotonina, ma hanno anche un'azione di antagonista dei recettori 5-HT2a.

Struttura delle proteine di membrana deputate al re-uptake delle ammine biogene

I trasportatori di serotonina, dopamina e noradrenalina condividono un'omologia strutturale abbastanza elevata tant'è che è difficile ottenere delle molecole selettive per l'una o per l'altra. Maggiormente si è riusciti ad avere una selettività d'azione nei confronti del SERT.

Queste proteine di membrana appartengono alla famiglia dei trasportatori SLC6 (soluble carrier) e hanno una struttura a 12 domini transmembrana. Questi 12 domini sono collegati tra di loro da loop di connessione sia extracellulari che intracellulari.

Questi trasportatori sono localizzati sia a livello presinaptico ma possono essere anche a livello degli assoni e dei dendriti. Per esempio nella serotonina si trovano spesso a livello dell'assone o anche a livello delle cellule gliali, quindi anche nella microglia, di supporto alle sinapsi.

Domanda: Come funzionano i trasportatori delle ammine biogene?

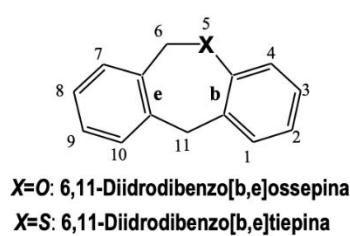
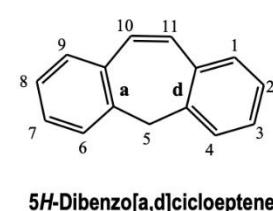
Risposta: Le ammine biogene a pH fisiologico hanno carica positiva, come gli ioni Na^+ . I trasportatori di questi neurotrasmettitori sono dei simporti: sfruttano un gradiente originato da ioni Na^+ che sono quindi cotrasportati nel neurone.

L'argomento degli adrenergici diretti è in stretta connessione con il sistema dopaminergico e serotoninergico, dal momento che queste molecole non sono selettive esclusivamente per il trasportatore della noradrenalina, sebbene la loro attività sia da associare principalmente all'aumento della concentrazione di NA a livello centrale.

Antidepressivi triciclici, “TCA”

Questa classe di farmaci va sotto l'acronimo di TCA (antidepressivi triciclici) ed ha come prototipo la molecola dell'imipramina. Vista la stretta correlazione tra queste strutture e quelle degli antagonisti dopaminergici (che sono antipsicotici e non antidepressivi come in questo caso), è necessario evidenziare le differenze che spingono una molecola verso una attività piuttosto che un'altra.

Sono caratterizzati dalla fusione di tre anelli. Generalmente, i composti triciclici congiunti possono essere **6,6,6** dove tutti gli anelli sono a 6 termini, o **6,7,6** in cui i due anelli laterali sono a 6 termini mentre quello centrale a 7. Questa è una prima grande differenza tra antipsicotici e antidepressivi: mentre nei TCA, che sono inibitori del trasportatore della NA, si hanno delle giunzioni di tre anelli 6,7,6, negli antipsicotici, che agiscono invece da antagonisti dopaminergici, gli anelli sono 6,6,6. Questo si traduce nella diversa capacità dei due anelli laterali di essere più o meno spazialmente ripiegati: quando l'anello è 6,6,6 il triciclo è più vicino alla planarità (forma un piccolo angolo di ripiegamento intorno ai 160°), mentre per i cicli 6,7,6, la parte centrale fa sì che il ripiegamento dei due anelli laterali formi un angolo più stretto, vicino ai 120-140°.



Negli antidepressivi usati in terapia sono sempre presenti i due anelli benzenici (dibenzo-), mentre cambia l'anello centrale a 7 atomi. Il caso più comune è quello rappresentato dalle dibenzoazepine, dove l'anello a 7 presenta un atomo di azoto e, in posizione 10-11, è possibile avere un doppio legame (5H-

dibenzoazepine), oppure l'anello può essere saturo (10,11-diidrobienzoazepine). Se contiene due atomi di azoto, l'anello centrale prende il nome di diazepina.

È stato inoltre studiato che, anche senza la presenza dell'azoto intraciclico, le molecole sono ugualmente attive; N può infatti essere sostituito con un carbonio e l'anello centrale prende così il nome di cicloheptene (parliamo quindi di dibenzocicloheptene). Questo anello può inoltre essere sostituito o con un atomo di ossigeno (dibenzoossepina) o un atomo di zolfo (dibenztiepina).

Questi sono i possibili cicli che troviamo nei TCA.

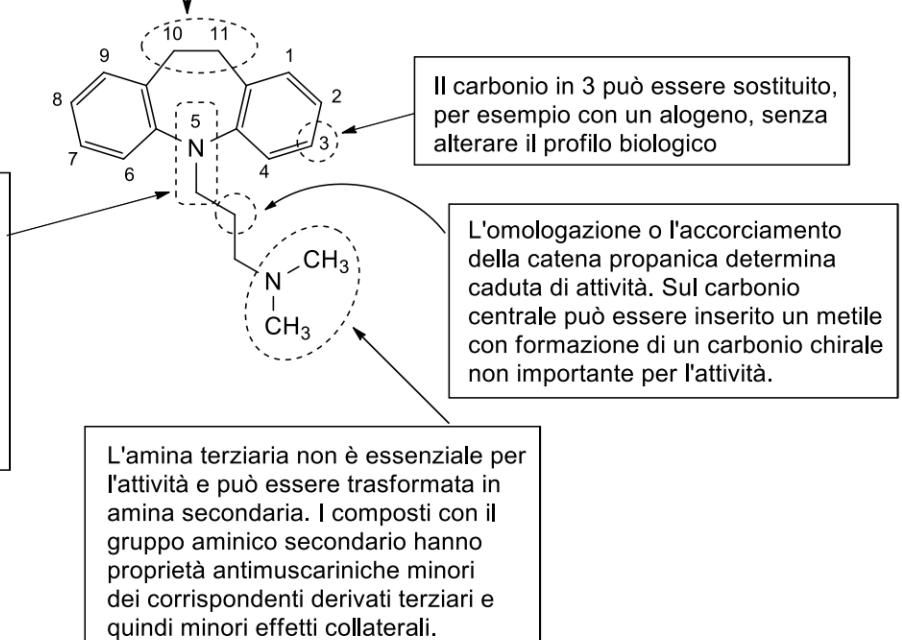
SAR antidepressivi triciclici

I cicli 6,7,6 a livello della posizione 10-11 possono quindi essere saturi, avere un doppio legame o avere eteroatomi (N, O, S).

Guardando la molecola riportata in figura (l'**imipramina**), la struttura in questione presenta un piano di simmetria, indice del fatto che la molecola non ha stereoisomeri. Andando a modificare un lato della molecola, inserendo ad esempio dei sostituenti in posizione 3 o un eteroatomo in posizione 10 o 11 e ponendo un doppio legame tra l'N in 5 e il CH₂ della catena propionica, la presenza di eteroatomi dà la possibilità di avere isomeri cis o trans (più precisamente E, dove i sostituenti a maggiore priorità stanno da parti opposte, e Z, dove sostituenti a maggiore priorità stanno dalla stessa parte).

SAR ANTIDEPRESSIVI TRICICLICI

Il ponte CH₂CH₂ può essere sostituito da CH=CH. Inoltre un metilene può essere sostituito da un eteroatomo, per esempio S. La trasformazione dell'anello a 7 termini in uno a 6 determina una diversa disposizione degli anelli aromatici con conseguente diminuzione dell'attività antidepressiva e aumento dell'attività antipsicotica



(N.B: la numerazione riportata è quella del caso in cui non si hanno altri sostituenti; la numerazione può cambiare se ci sono eteroatomi nella parte centrale).

Un importante aspetto stereochemico, quindi, è la posizione della catena laterale rispetto all'anello sostituito; è possibile inserire sostituenti come alogeni o trifluorometile, ma è necessario che questi siano in posizione 3 (potrebbero essere inseriti anche in posizione 2 ma le molecole risultano avere una peggiore attività).

Questi non possono però essere inseriti in 4; per l'attività sia degli antidepressivi che degli antipsicotici, la catena deve stare in cis (nella forma Z quindi dalla stessa parte del sostituente), e questo non potrebbe mai avvenire se si venisse a creare ingombro sterico a livello della posizione 4. Si avrebbe infatti una distorsione della catena che andrebbe a disporsi verso l'altro anello aromatico dando origine alla forma transoide (si parla di transoide e cisoide perché la struttura è flessibile e la catena ha libertà di muoversi da una parte e dall'altra).

La catena laterale, considerando sia la porzione esociclica che l'N endociclico, è una catena propilamminica (diamminica nel caso riportato in figura). Come è stato detto, l'atomo di N in 5 non è indispensabile e può anche essere sostituito con un doppio legame; è però necessario che la distanza tra il triciclo e l'atomo di azoto della catena laterale (fondamentale per l'attività perché si protona a pH fisiologico), deve sempre essere di 3 metileni, e questo vale anche per gli antipsicotici. Questa catena può inoltre essere ramificata con piccoli sostituenti come ad esempio un metile, generando così un centro chirale ulteriore; in questo caso però, ai fini dell'attività, non è importante avere un enantiomero rispetto ad un altro.

Sebbene l'ammina terminale non possa essere eliminata, questa non deve per forza essere terziaria.

Negli antidepressivi anche le ammine secondarie hanno un buon funzionamento e, sebbene in vivo vengano demetilate, generano un metabolita che è comunque attivo. Negli antipsicotici, invece, la demetilazione porta ad una diminuzione dell'attività.

L'imipramina è anche un debole antimuscarinico, e la sua struttura ricorda molto la pirenzepina (molecola già studiata nel sistema colinergico), anche questa avendo un ciclo dibenzodiazepinonico. Queste molecole, infatti, hanno come effetti collaterali la diminuzione della salivazione e, ad alte dosi, possono portare a costipazione. L'eliminazione del metile dall'ammina terminale (quindi la presenza di una ammina secondaria) porta a composti molto meno attivi nei confronti del muscarinico; infatti, i composti più frequentemente usati sono quelli demetilati.

In alcuni libri di testo queste molecole vengono riportate sotto il nome di "timolettici", mentre gli antipsicotici vengono chiamati anche "neurolettici" e gli inibitori delle MAO antidepressivi "timeretici". È una nomenclatura non più utilizzata.

Inibitori del reuptake (Timolettici)

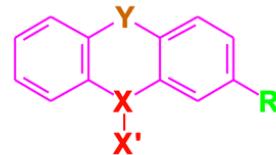
X-X'	Y	R	Farmaco (specialità medicinale)
<chem>N-CH2CH2CH2NMe2</chem>	<chem>CH2CH2</chem>	H	Imipramina cloridrato (Tofranil®)
<chem>C=CHCH2CH2NMe2</chem>	<chem>CH2CH2</chem>	H	Amitriptilina cloridrato (Adepril®, Amilit-IFI, Laroxyl®, Triptizol®; in associazione con psicolettici: Diapatol, Limbitryl®, Sedans, Mutabon®)
<chem>N-CH2CH2CH2NHMe</chem>	<chem>CH2CH2</chem>	H	Desipramina cloridrato (Nortimil®)
<chem>C=CHCH2CH2NHMe</chem>	<chem>CH2CH2</chem>	H	Nortriptilina cloridrato (Noritren®, Vividyl®, in associazione con flufenazina: Dominans)

Come inibitori del re-uptake antidepressivi troviamo:

- **Imipramina**, prototipo della classe analizzata prima.
- **Amitriptilina**, ottenuta sostituendo il gruppo N-CH₂ con un doppio legame.

- **Desipramina** e **nortriptilina**, le due rispettive molecole demetilate ottenute eliminando rispettivamente il metile dall'imipramina e il metile dall'amitriptilina (l'N terminale è secondario).

Inibitori del reuptake (Timolettici)

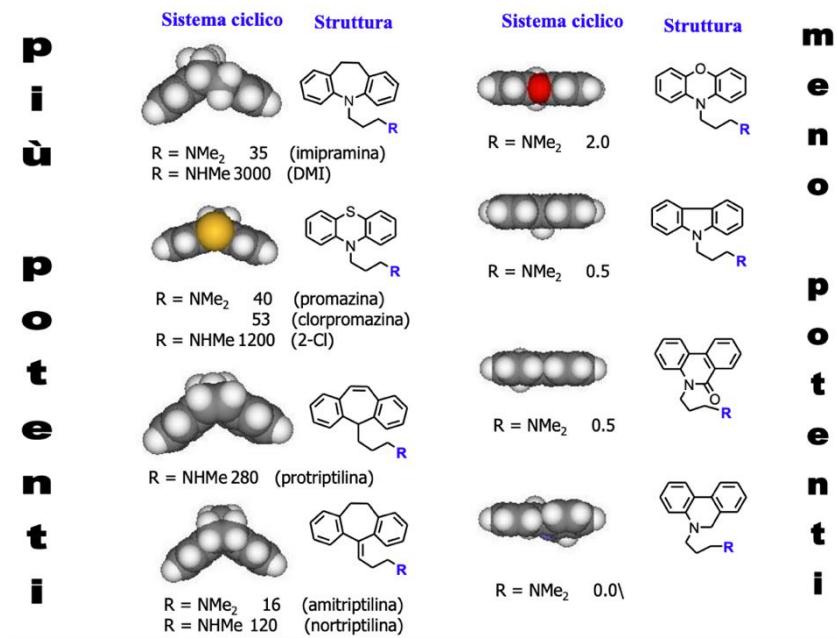


X-X'	Y	R	Farmaco (specialità medicinale)
N-CH₂CHMeCH₂NMe₂	CH₂CH₂	H	Trimipramina maleato (Surmontil®)
CHCH₂CHMeCH₂NMe₂	CH₂CH₂	H	Butriptilina cloridrato (Evadene®)
N-CH₂CH₂CH₂NMe₂	CH₂CH₂	Cl	Clomipramina cloridrato (Anafranil®)
N(H₂C)₃N NCH₂CH₂OH	CH=CH	H	Opipramolo dcloridrato (Insidon®)
C=CHCH₂CH₂NMe	CH₂S	H	Dosulepina cloridrato (Protiaden®)

Aggiungendo un sostituente in 3, invece, possiamo avere:

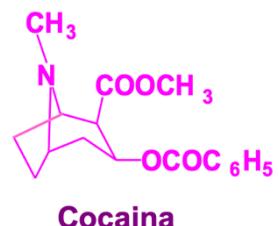
- **Clomipramina**, imipramina a cui è stato aggiunto un cloro in posizione 3.
- **Opipramolo**, dove la catena laterale termina con un idrossietilpiperazina. L'alcol permette di effettuare un preparato a rilascio prolungato come, ad esempio, l'opipramolo decanoato. Facendo l'esterificazione del gruppo OH si ha l'aumento della lipofilia della molecola; questa potrà essere somministrata con una iniezione e il farmaco verrà rilasciato nel giro di una o due settimane, quando le esterasi ematiche romperanno il legame estereo ripristinando la molecola attiva. Questo approccio è molto più importante per gli antipsicotici (la flufenazina è il farmaco corrispondente all'opipramolo) che per gli antidepressivi, che normalmente il paziente assume con piacere perché favoriscono un miglioramento dell'umore. Nel caso degli antipsicotici, invece, non c'è un gradimento del farmaco da parte del paziente, poiché questo porta ad un ottundimento e quindi ad un peggioramento dell'umore; normalmente, per evitare che il paziente non lo assuma, si usano dei preparati deposito con acidi grassi a lunga catena (tipo la flufenazina decanoato o eptanoato).
- **Dosulepina**: tiepina, in cui si ha un atomo di zolfo nel ciclo a 7 centrale.

- La struttura è molto più ripiegata nei cicli a 7 mentre è più planare nei cicli a 6. Un esempio è il ciclo fenotiazinico che studieremo quando faremo gli antipsicotici: ha due benzeni ai lati e una tiazina come anello centrale e contiene contemporaneamente un atomo di zolfo e un atomo di azoto.

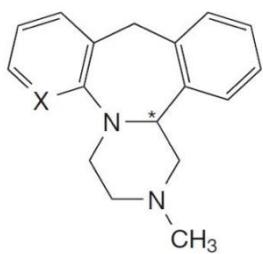


- **Cocaina**, anche questa è uno degli inibitori del re-uptake. È meno importante per la noradrenalina ma più importante per la dopamina, infatti agisce maggiormente sul trasportatore DAT. Causa un aumento della concentrazione delle monoamine a livello cerebrale ed ha effetti psicoattivi; non è infatti un farmaco ma una sostanza psicotropa (droga da abuso).

Ha un ciclo che richiama l'atropina (azabiciclo) ma, a differenza di questa, un gruppo carbossilico è esterificato con un metilestere e l'OH è esterificato con l'acido benzoico. Non ha solo un effetto inibitore del up-take delle monoamine (in particolare del trasportatore della dopamina), ma appartiene anche alla classe degli anestetici locali, come la procaina e la lidocaina che, infatti, presentano sempre o un gruppo ammidico o un gruppo estero. Le sue proprietà anestetiche sono associate principalmente all'azione che ha al livello dei canali del sodio voltaggio dipendenti, dove va ad inibire la depolarizzazione della membrana. Gli effetti collaterali sono associati ad un abuso della droga e sono disturbi della memoria e della visione, sechezza delle fauci, costipazione, tachicardia, palpitazioni e tremori. Il decesso per overdose avviene soprattutto per gli effetti cardiovascolari.



Antagonisti α_2 -adrenergici presinaptici



Mianserina: X = CH
Mirtazapina: X = N

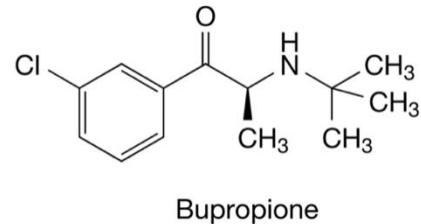
Gli α_2 -adrenergici presinaptici modulano il rilascio delle catecolammine (per questo non sono stati affrontati nel capitolo riguardante gli antagonisti del sistema adrenergico); la **mianserina** e la **mirtazapina** non agiscono solo sul rilascio di adrenalina e noradrenalina, ma anche su quello della serotonina.

Gli autocettori ed eterocettori del tipo α_2 presinaptico hanno un'azione di inibizione del rilascio; antagonizzando questa inibizione si va quindi a favorire il rilascio di catecolammine e ammine biogene.

La Mirtazapina che ha anche una azione diretta come antagonista dei recettori 5HT2A (che vedremo in modo più dettagliato quando faremo il sistema serotoninergico), anche questi molto coinvolti nelle funzioni celebrali che presiedono al comportamento. Anche in questo caso la molecola è un triciclo a cui è però stato fuso un anello metilpiridinico; l'azoto che si protona a pH fisiologico è presente all'interno di un ciclo, a differenza degli altri tricicli dove N era in una catena laterale flessibile. Differisce dagli altri inibitori del re-uptake solo per la presenza del gruppo benzopirido.

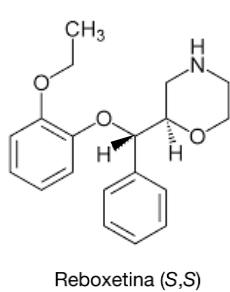
Inibitori del reuptake di NA e DA

Analogo dell'amfepramone (chetoamfetamina usata in alcuni paesi come anorettante), sono sempre presenti il carbonile e il metile a livello della catena laterale ma il terminale della catena, invece che essere metilenico, è terbutilico. La differenza sostanziale si ha nell'anello aromatico, dove nell'amfepramone non si ha nessuna sostituzione mentre nel **bupropione** è presente un cloro.



Bupropione

Viene utilizzato per vari scopi. È un inibitore del reuptake della noradrenalina e in misura minore di dopamina e serotonina; viene commercializzato come antidepressivo e, a dosi inferiori rispetto a quelle antidepressive, viene utilizzato anche come molecole nella disassuefazione da fumo. Questo suo effetto, oltre ad essere in parte dovuto all'attività di inibizione del reuptake di NA, è dovuto principalmente alla sua azione antagonista nei confronti dei recettori α_{2B} , β_4 nicotinici; infatti, l'altra molecola studiata nella disassuefazione da fumo è un agonista parziale di questi eterocettori presenti sulle fibre dopaminergiche a livello dell'area tegmentale ventrale. Questi recettori presinaptici modulano il rilascio di dopamina e sono stimolati dalla nicotina (quindi dall'uso della sigaretta).



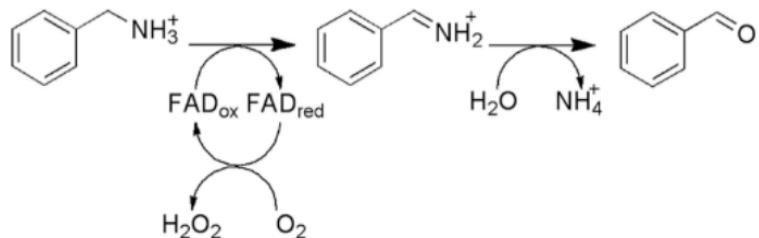
Reboxetine (S,S)

La **reboxetina** è stata inizialmente commercializzata come la più selettiva nei confronti del reuptake della noradrenalina; in realtà ha una debole attività anche nei confronti del trasportatore della serotonina. Nonostante questo, tra le molecole viste oggi, è la più potente nei confronti del reuptake di NA rispetto alle altre ammine biogene. Ha due centri chirali e la configurazione attiva dei due centri è S,S. È caratterizzata da un gruppo amminico che si protona a pH fisiologico inserito all'interno di un anello morfolinico. È la struttura più vicina agli inibitori selettivi del re-uptake della serotonina.

Inibitori delle MAO

Questo argomento sarà visto più dettagliatamente quando verranno trattati i farmaci utilizzati nel parkinson, in quanto la maggior parte degli inibitori delle monoamino ossidasi, in particolare delle MAO-B, sono utilizzati come farmaci nella patologia del parkinson, essendo che aumentano la concentrazione di dopamina. Le monoamino ossidasi sono degli enzimi che hanno come cofattore il FAD e agiscono come enzimi ossido-riduttivi per la degradazione della porzione terminale delle ammine biogene, la reazione che svolgono è quindi una deaminazione ossidativa che utilizza come cofattore il FAD. Si ha un intermedio imminio nella degradazione della catena laterale, questo intermedio poi viene degradato per dare la corrispondente aldeide e liberare ioni ammonio.

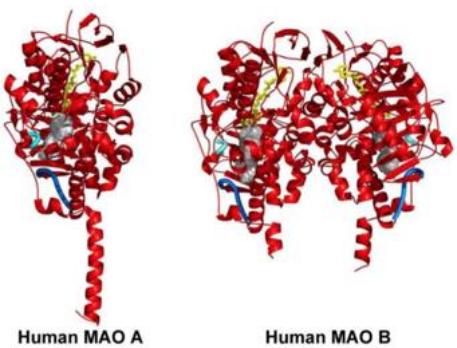
Deamminazione ossidativa
ad opera delle MAO



Questi enzimi mitocondriali si classificano in due classi: MAO-A e MAO-B. La MAO-A è maggiormente coinvolta nella degradazione del terminale amminico della serotonina, mentre i substrati maggiormente affini per la MAO-B sono la 2-feniletilammina e la benzilammina. MAO-A e MAO-B hanno un'uguale azione su noradrenalina, dopamina e tiramina.

Quindi entrambe sono deputate alla degradazione della dopamina, tuttavia la MAO-B si trova in maggiore concentrazione a livello delle fibre micro striatali, dove il deficit dopaminergico da origine alla patologia del parkinson, perciò è richiesta una selettività delle molecole verso la MAO-B nel trattamento della patologia del parkinson.

Le due MAO sono diverse a livello strutturale, la MAO-A è un monomero, mentre la MAO-B è un dimero.



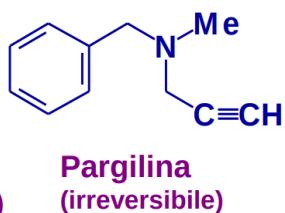
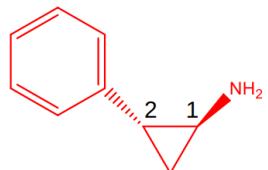
Inibitori delle MAO (Timeretici) non selettivi

Gli inibitori delle MAO-A e B negli anni si sono contraddistinti per la loro più o meno selettività nei confronti di una isoforma rispetto all'altra e i primi inibitori delle MAO progettati sono i derivati dell'idrazina.

Derivati idrazina



Derivati amminici



L'azione di inibizione della MAO si è evidenziata con l'utilizzo di queste molecole come antitubercolari. In particolare si trova l'**iproniazide**, un'ammide con derivato idrazinico, "ipro" per la presenza dell'isopropile e "azide", perché è un derivato dell'acido isonicotinico con l'isopropil idrazina. Un altro derivato, sempre caratterizzato dall'idrazina, è la **fenelzina**.

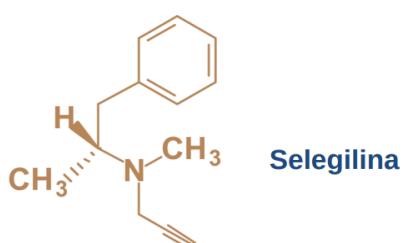
Sono tutti derivati con azione irreversibile, perché agiscono dando un legame covalente con il FAD, cioè con il coenzima. Oltre i derivati dell'idrazina, altri derivati clinici utilizzati per tanto tempo come antidepressivi sono, per esempio, la **tranilcipromina** e la **pargilina**. La tranilcipromina è interessante perché viene dall'irrigidimento strutturale dell'amfetamina, la catena laterale dell'amfetamina, che è una catena propilamminica, è stata inserita in un ciclo, cioè è stata irrigidita in una ciclo propilammina.

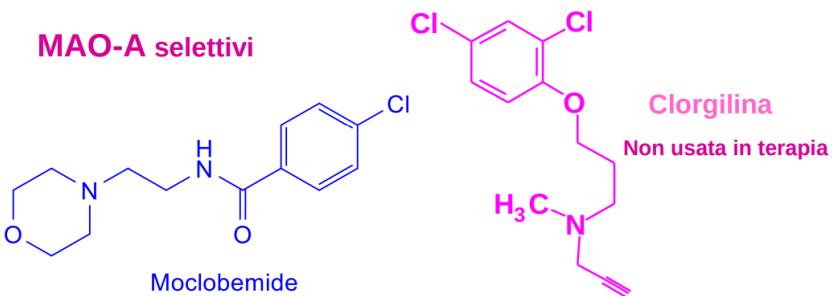
Questo irrigidimento strutturale tendeva a cercare molecole con meno effetti collaterali rispetto alle amfetamine, in realtà passando dalla molecola flessibile a quella irrigidita, una delle attività dell'amfetamina, quella di debole inibitore delle MAO, veniva amplificata, mentre scompariva completamente l'altra attività di facilitatore del rilascio.

Questo è un caso in cui l'analogo rigido cambia l'attività della molecola, amplifica da un lato un'attività debole che aveva la molecola iniziale (di inibizione delle MAO) ed elimina completamente l'azione sul trasportatore di membrana che hanno le amfetamine.

La tranilcipromina creando questo ciclopamil amminico fa sì che ci siano due centri chirali, che hanno configurazione 1-S, 2-R, dove il carbonio 1 è quello legato al gruppo amminico e il 2 è legato all'anello aromatico. La pargilina è stata la prima molecola con il gruppo propargilamminico, che è stato il punto di partenza per gli inibitori delle MAO-B usati nel parkinson. Questi inibitori verranno visti più approfonditamente quando si tratteranno i dopaminergici e sono le molecole selegilina e trasagilina.

MAO-B selettiva
nel Parkinson





Ci sono anche degli inibitori MAO-A selettivi. La **moclobemide**, che presenta l'atomo di azoto che si protona a pH fisiologico all'interno di un anello morfolinico, è un ammide dell'acido p-clorobenzoico ed è stata usata per molto tempo come inibitore MAO selettivo per le MAO-A, nel caso dell'inibizione delle MAO-A si ha un'azione prevalentemente antidepressiva, perché aumenta la concentrazione di serotonina e noradrenalina, ma anche la moclobemide non è un farmaco di prima scelta nella depressione.

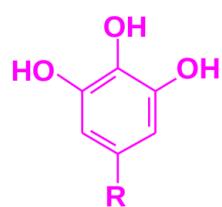
Questi farmaci non sono più usati, perché sono molecole che hanno effetti collaterali importanti. Inibendo le MAO, che degradano le catecolamine, a livello periferico possono dare origine a crisi ipertensive, in particolare occorreva fare molta attenzione all'assunzione di queste molecole con alcuni cibi, quelli ricchi di tiramina. Queste reazioni di crisi ipertensive sono dovute al fatto che la tiramina in questi cibi non viene più metabolizzata per inibizione dell'enzima che la dovrebbe degradare, questo effetto ipertensivo dovuto alla mancata metabolizzazione della tiramina viene chiamato "*cheese reaction*", perché il formaggio è uno degli alimenti in cui è maggiormente presente la tiramina, che si trova anche nella cioccolata, in alcuni pesci, nell'avocado... Quindi il paziente che assumeva inibitori MAO doveva fare molta attenzione alla dieta.

Inibitori delle COMT

L'altra via con cui si può avere un aumento della concentrazione di catecolamine è con l'inibizione delle catecol-O-metiltrasferasi, anche questo approccio viene utilizzato nella terapia del parkinson.

Le molecole che possono dare inibizione delle COMT sono anelli aromatici poliossidrilati, cioè ricchi di gruppi OH, che vengono metabolizzati dalle COMT al posto delle catecolamine.

Alcune di queste molecole sono naturali, come l'acido gallico e il pirogallolo, e da questi anelli poliossidrilati si è basata la progettazione degli inibitori delle COMT utilizzati nella patologia del parkinson.



Pirogallolo: R = H
Acido gallico: R = COOH

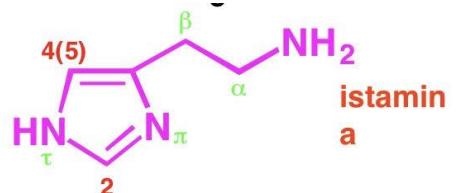
Farmaci che influenzano la trasmissione ammine biogene

Sede di azione	Farmaco	Effetto	Uso
Biosintesi	α -Metil-p-tirosina	Inibz. tirosina idrossilasi	Sperimentale
	α -Metildopa	Sintesi falso trasmettore	Antipertensivo
	Disulfiram	Inibizione dopamina- β -idrossilasi e aldeide deidrogenasi	Alcolismo
Deposito	Reserpina,	Svuotamento vescicole	Antipertensivo
	I-MAO	Incremento del deposito	Antidepressivo
Rilascio	Guanetidina, Bretilio	Diminuzione del rilascio	Antipertensivo
	Amfetamina, ed Efedrina	Facilitazione rilascio	Psicostimolante
Riassorbimento	Timoletti (es. Imipramina e Amitriptilina)	Inibizione riassorbimento	Antidepressivo
	Cocaina	Inibizione riassorbimento	Psicostimolante
Metabolismo	I-MAO (es. Fenelzina, Tranilcipromina)	Inibizione MAO	Antidepressivo
	Pirogallolo	Inibizione COMT	Sperimentale

Da ricordare che nella prima parte sono stati accennati gli antagonisti, però in terapia si ha l'alfa-metildopa e il disulfiram che, pur essendo un inibitore della beta-idrossilasi (l'enzima che ossidrila la catena laterale della dopamina), in realtà è anche un inibitore dell'aldeide deidrogenasi che viene utilizzato nella disassuefazione da alcol in quanto crea un accumulo di aldeidi che da un effetto spiacevole e stimola a non utilizzarlo. Sono state viste tutte le molecole che agiscono nel reuptake e nel metabolismo, quelle ancora in uso in terapia sono principalmente i timoletti.

Il SISTEMA ISTAMINERGICO

Il neurotrasmettore di cui si parlerà riporta principalmente a livello del sistema nervoso periferico, perché l'**istamina**, caratterizzata da un anello imidazolico a cui è legata una catena etilamminica, è sintetizzata principalmente a livello dei mastociti, dei basofili e delle cellule enterocromaffini gastriche. L'istamina è, però, anche un neurotrasmettore, perché ha anche un sistema di trasmissione tramite i neuroni; quindi la sede di biosintesi dell'istamina non sono solo le cellule mastocitarie e enterocromaffini gastriche, ma anche le cellule nervose.

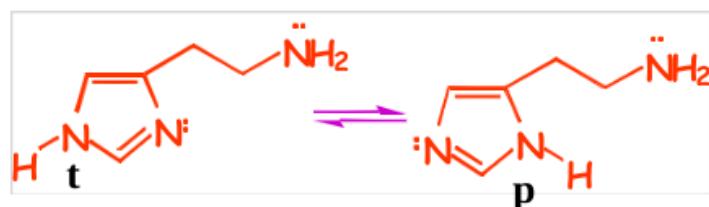


L'istamina è caratterizzata da un anello imidazolico e come tutti i neurotrasmettitori visti deriva da un amminoacido: l'istidina. L'istidina è l'unico amminoacido con anello imidazolico e per decarbossilazione, tramite istidina decarbossilasi, da l'istamina.

Biosintesi:



La numerazione dell'histamina può partire sia da un azoto che dall'altro, perché i due azoti, chiamati **proxy** (l'azoto più vicino alla catena laterale) e **tao** (il più lontano dalla catena laterale), danno origine a tautomeria e quindi a un **equilibrio prototropico**, cioè l'idrogeno si può trovare su entrambi gli azoti.



Questo equilibrio prototropico è stato visto anche con il meccanismo di funzionamento dell'acetilcolinesterasi, l'histidina in quel caso è importante, perché col suo anello imidazolico e il suo equilibrio prototropico favorisce la nucleofilicità dell'OH della serina, che è coadiuvato a sua volta da un altro glutammato, ed è proprio in virtù di questo shift dell'idrogeno che assiste la serina nella sua azione catalitica.

Per capire se la forma più attiva è quella proxy o tao bisogna vedere quali sono i diversi sottotipi recettoriali del sistema istaminergico. Attualmente i sottotipi recettoriali del sistema istaminergico sono i sottotipi: H1, H2, H3, H4. Verranno trattati principalmente i sottotipi H1 e H2.

H1 è il recettore istaminergico su cui vanno ad agire i farmaci antistaminici antiallergici, tuttavia gli antistaminici sono anche tutti i farmaci antiacidi che si usano nell'ulcera gastrica, questi sono gli anti H2. Quindi gli antiallergici sono gli anti H1 e gli antiacidi sono gli anti H2, perché il recettore **H2** è quello principalmente presente nelle cellule enterocromaffini gastriche.

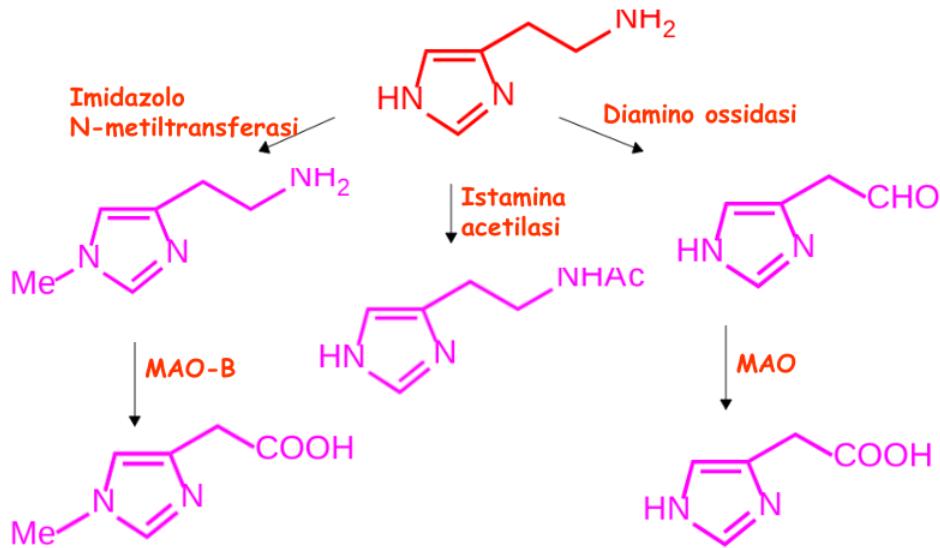
Il recettore **H3** è un recettore prevalentemente presinaptico, dove modula in maniera negativa il rilascio di histamina, non è solo un autorecettore, soprattutto a livello centrale si comporta da eterorecettore, in quanto modula il rilascio di altri neurotrasmettitori, tra i quali anche l'acetilcolina e l'acido gamma-amminobutirrico.

Infine il recettore **H4**, di cui si hanno meno informazioni dal punto di vista farmacologico, è importante nel regolare il sistema immunitario ed è un recettore principalmente periferico e post sinaptico.

Tutti questi recettori sono recettori accoppiati a proteina G, in particolare l'H1 è accoppiato a proteina Gq, l'H2 a Gs e l'H3 e l'H4 a Gi. E' stato facile separare le attività verso i diversi sottotipi recettoriali, perché i requisiti strutturali dei vari sottotipi sono differenti. Gli antistaminici anti H1 sono selettivi per gli H1 e non agiscono come antagonisti H2, allo stesso modo gli antagonisti H2 non hanno azione antistaminica H1. Anche fra gli agonisti è stato possibile separare l'attività H1 dalla H2, per esempio, la betaistina ha attività H1 e anche H3, ma non ha attività H2, il dimafrit ha attività H2, ma non agisce sugli altri sottotipi.

La molecola maggiormente selettiva per gli H3 è quella ramificata in catena laterale, cioè ha un metile in posizione alfa nella catena laterale che dà origine a un centro chirale, questa molecola è l'R-alfa-metilistamina. Degli antagonisti selettivi si parlerà più nel dettaglio perché sono i farmaci che verranno trattati.

Metabolismo



Il metabolismo dell'istamina non è esattamente sovrapponibile a quello delle altre ammine biogene, cioè serotonina, dopamina e noradrenalina.

- Il metabolismo dell'istamina vede la metilazione di uno degli azoti dell'anello imidazolico attraverso l'imidazolo N-metiltransferasi, questa metilazione impedisce qualsiasi tautomeria, perché è stata eliminata la possibilità dell'equilibrio prototropico dell'idrogeno. La N-metilistamina che si forma è substrato delle MAO-B, dalla sua degradazione ossidativa si forma la corrispondente aldeide che viene ulteriormente ossidata ad acido, si forma l'acido N-metilimidazolacetico.
 - Una novità, che non si è vista nelle altre ammine, è l'acetilazione del gruppo amminico terminale, cioè attraverso una istamina acetilasi viene trasferito un gruppo acetile per formare la corrispondente acetamide.
 - Un'altra via di catabolismo della molecola prevede l'intervento di diamino ossidasi, diamino perché la molecola dell'istamina ha due gruppi amminici, che agiscono come le MAO, cioè con la degradazione ossidativa del gruppo amminico terminale, portando alla corrispondente aldeide la quale può subire ulteriore ossidazione a carico delle MAO per dare l'acido.
- Diventano substrati delle MAO dopo un primo intermedio metabolico.

Ruolo fisiologico dell'istamina

L'istamina agisce su vari distretti, non la vedremo dettagliatamente a livello centrale.

L'istamina ha un'azione sulla muscolatura liscia di alcuni organi e visceri in particolare porta alla contrazione della muscolatura liscia bronchiale, a livello gastrico e a livello intestinale.

La contrazione bronchiale determina un ulteriore peggioramento della reazione allergica.

La reazione istaminergica spesso da origine a gonfiore, nello shock anafilattico si ha ingrossamento della glottide, ma anche edema, non solamente nel corpo, ma soprattutto nel viso e questo edema è dovuto all'aumento della permeabilità capillare.

Da poi origine a tachicardia.

Mediata dai recettori H₂ si ha anche un aumento della secrezione gastrica tramite le cellule enterochromaffini che sono adiacenti alle cellule parietali, l'istamina prodotta dalle cellule enterochromaffini da l'impulso di stimolazione alla produzione da parte delle cellule parietali di acido cloridrico.

Quando si ha uno shock anafilattico normalmente il problema principale è che si ha un collasso cardiocircolatorio dovuto alla diminuzione della pressione arteriosa per vasodilatazione. L'istamina media tutte le risposte allergiche, perché è prodotta dalle cellule mastocitarie e in presenza di una reazione allergica si osserva la degranulazione di queste cellule con liberazione massiva di istamina che è una sostanza autocoide, agisce sulle stesse cellule o su cellule adiacenti a quelle che l'hanno sintetizzata, per cui sugli stessi mastociti su cui viene bio sintetizzata ci sono i recettori H1 su cui agisce. Non ha bisogno del circolo ematico per raggiungere la sede di azione, ma agisce sulle cellule contigue.

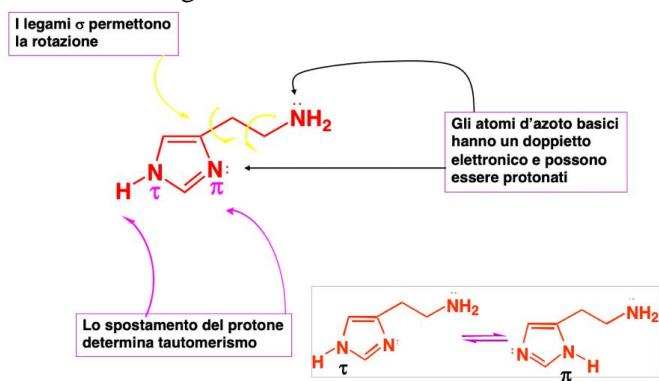
CONFORMAZIONI DELL'ISTAMINA

Riprendendo il sistema istaminergico, andiamo a considerare le varie conformazioni che può assumere l'istamina;

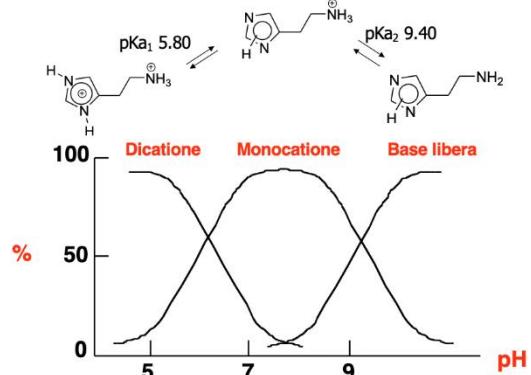
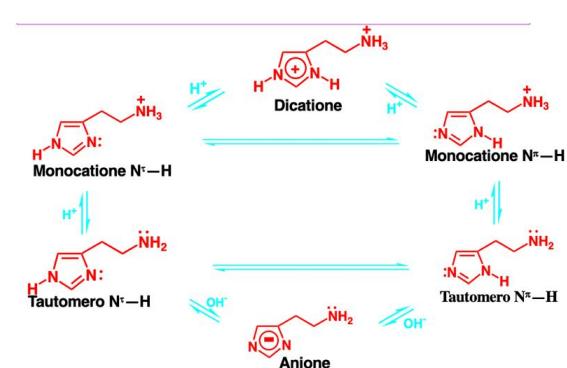
Nella tautomeria tao e proxi per cui ci si riferisce allo shift dell'H sugli azoti nell'anello imidazolico: in Proxi \rightarrow l'N è più vicino rispetto alla catena laterale;

in Tao \rightarrow l'N è più lontano rispetto a catena laterale;

questo è importante per quello che riguarda l'attività degli antagonisti verso il sottotipo recettoriale H₂ mentre lo è di meno per quanto riguarda l'attività sugli antagonisti H₁ infatti non sono strettamente connessi alla struttura dell'istamina cosa invece che risulta essere importante per gli antagonisti H₂.



La molecola ha diversi atomi di N che si protonano in maniera differente a seconda del tipo di ambiente e di pH;



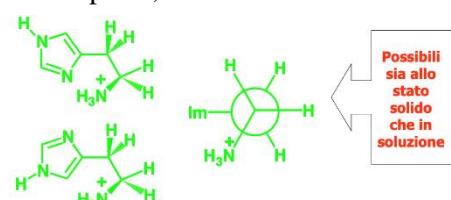
In ambiente acido l'istamina si può trovare in forma monocationica e dicationica ed anche in forma di base libera o anione.;

È dicatione a pH acidi, sopra pH=5 si ha la protonazione della catena laterale e anche dell'altro N imidazolico (dicatione);

la forma maggiormente presente a pH fisiologico è sottoforma di monocatione dove si ha la protonazione dell'N amminico terminale primario che è in equilibrio tautomerico tra tao e proxi;

A pH più basici si ha esclusivamente la base libera che si trova sia in tautomero tao che proxi.

Infine, a pH molto basici, sopra a 10 c'è la forma anionica in cui viene strappato l'altro protone sull'anello imidazolico.

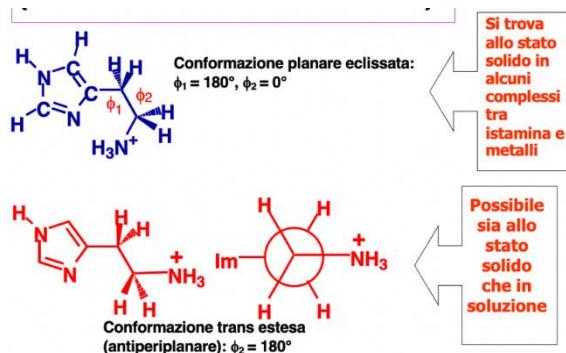


Conformazione gauche (sinclinale): $\phi_2 = 60^\circ$ o 300°

A livello fisiologico sono rinvenute anche le altre forme presenti in conformazione anti e gauche.

L'eclissata che sembrerebbe meno stabile può essere stabilizzata dalla complessazione con metalli perché il doppietto dell'anello imidazolico può dare dei complessi di coordinazione con metalli.

Allo stato solido, in soluzione, l'istamina si può trovare nella forma trans estesa (più stabile) ma anche nella forma gauche (sfalzata).



LOCALIZZAZIONE E FUNZIONE DEI RECETTORI ISTAMINERGICI

I recettori istaminergici si trovano a livello di sistema cardiovascolare, muscolatura liscia, ghiandole esocrine, terminazione nervose.

Anche in questo caso sono presenti antagonisti indiretti e agonisti; gli agonisti vengono usati come diagnostici per valutare la funzionalità gastrica e un altro uso si ha a livello della vasodilatazione periferica; ci sono anche gli antiulcera (del sottotipo recettoriale H₂) e sono i farmaci che hanno svoltato la cura dell'ulcera gastrica (come prototipo la cimetidina).

A livello di inibitori della pompa protonica si è riscontrato che gli anti H₂ danno assuefazione e hanno minore attività se non si interrompe la cura difatti sono meno prescritti rispetto a omeprazolo, pantoprazolo infatti in terapia è praticamente rimasta la famotidina; la ranitidina sempre classificata in questa classe di farmaci per l'ulcera gastrica è stata ritirata dal commercio perché i lotti provenienti probabilmente dall'India contenevano grandi quantità di nitroso-derivati che possono originare sostanze pro cancerogene.

Gli antistaminici come la ciclizina sono usati anche come antinefetosici (per malesseri da mozione) per ridurre nausea e vomito causati dal movimento.

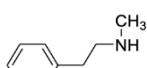
Queste molecole vengono usate anche per vertigini causate da sindrome di Meniere; si tratta di una patologia dell'orecchio interno (non sono chiare le cause ma probabilmente è dovuta ad una pressione del liquido a livello cocleare e vestibolare) che porta a crisi vertiginose; in questi casi si usa la betaistina che è un antagonista H₃ e ha una debole azione agonista H₁.

Ci sono anche gli antagonisti indiretti che non agiscono andando direttamente a bloccare il recettore H₁ ma come antistaminici tendono ad inibire il rilascio di istamina; il prototipo di questa classe è il cromoglicato sodico (usato in aerosol per asma o in colliri per evitare congiuntiviti allergiche); in questi casi si parla maggiormente di profilassi perché si deve limitare la liberazione di istamina (se questa è già stata liberata in seguito a degranulazione mastocitaria queste molecole sono completamente inefficaci perché non vanno ad agire direttamente sul recettore).

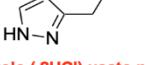
Agonisti dell'istamina. Gli agonisti dell'istamina hanno un uso clinico limitato.

Agonista	H1	H2	H3
	100	100	100
	5.6	0.2	-
	26	0.3	<0.08
	13	7	-

La tautomeria sull'anello imidazolico non è importante per la funzionalità sul recettore H₁, mentre è importante per il recettore H₂.



Betaistine (.2HCl) usata come vasodilatatore periferico e sindrome di Menier



Betazole (.2HCl) usato per verificare la funzionalità delle cellule parietali per la secrezione gastrica

Nei casi in cui L'istamina ha un effetto massimo su H₁ H₂ H₃ e viene modificata, può dare origine ad una diminuzione di affinità verso i vari sottotipi recettoriali andando quindi ad aumentare la selettività H₁/H₂ o viceversa H₂/H₁;

Ad esempio, la **betaisitina** si ottiene andando a modificare la molecola dell'istamina sostituendo all'anello imidazolico l'anello piridinico sostituito in posizione 2 che termina con un'ammina secondaria. La betaistina ha una minore attività sui recettori H₁ ma è molto diminuita l'attività sul recettore H₂; questa si comporta da antagonista dei recettori H₃ e il suo effetto vasodilatatore periferico e nella sindrome di Meniere è da attribuirsi a questo effetto antagonista H₃.

Quindi modificando l'anello imidazolico con altri residui ottengo un grande calo dell'attività H2;

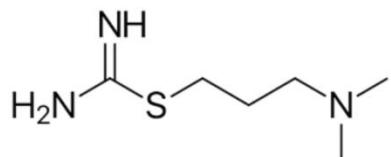
Sono state effettuate altre modifiche come sostituzione bioisosterica dell'anello imidazolico con altri anelli azotati; quando si modifica con un tiazolo si perde l'attività verso gli H2 e ancora di più verso gli H3 ma viene mantenuta una residua attività H1; se al posto del tiazolo si sostituisce con un pirazolo (caso del **betazolo**) si mantiene un elevata affinità per il recettore H2 istaminergico;

il betazolo in forma di sale cloroidrato è impiegato come diagnostico per valutare la funzionalità delle cellule parietali gastriche nella produzione di HCl; se dando uno stimolo istaminergico si ha la produzione di HCl vuol dire che i disturbi del paziente non sono dovuti ad un deficit dovuto alla produzione di acido gastrico da parte delle cellule parietali.

il betazolo difatti ci dà una prima indicazione riguardo al fatto che ci sono dei requisiti strutturali più stringenti per l'affinità nei confronti dei recettori H2 rispetto all'H1.

Un altro agonista H2 che è usato esclusivamente per gli studi sui recettori è il **dimaprit**;

il dimaprit ha un gruppo tioformamidinico che rappresenta la forma aperta dell'anello imidazolico; questo porta ad avere l'attività agonista H2 ma non viene usato come farmaco perché è un agonista H2 più potente del betazolo ma è usato negli studi sul recettore H2.



Un altro anello usato come bioisostero dell'imidazolo è l'anello triazolico che porta ad avere un agonismo parziale nei confronti del recettore H1, c'è un debole agonismo sul recettore H2 mentre scompare l'attività sull'H3.

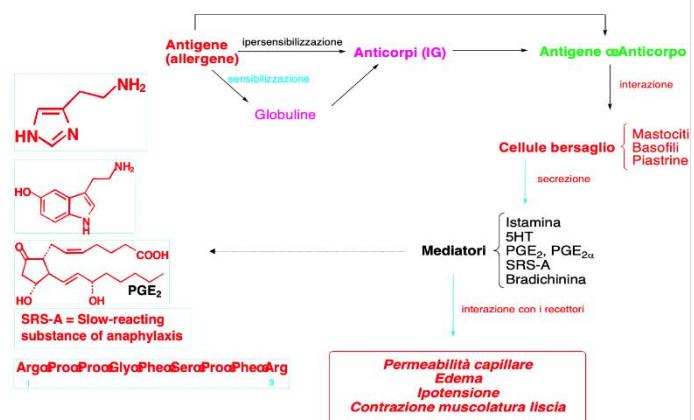
Si deduce quindi che le modifiche sul recettore H1 sono maggiormente tollerate, sul recettore H2 ci sono dei requisiti soprattutto riferiti all'anello imidazolico molto più stringenti e per il recettore H2 la tautomeria di tipo tao è quella maggiormente importante e cruciale.

ANTAGONISTI H1 ISTAMINERGICI

Gli antagonisti H1 istaminergici impiegati nelle reazioni di tipo allergico come asma, orticaria, allergia da farmaci, febbre da fieno, shock anafilattico o dermatiti hanno un uso terapeutico differente in relazione al tipo di formulazione e della via di somministrazione (nel caso di uno shock anafilattico è previsto anche l'uso di cortisonici e di adrenalina per evitare il collasso cardiocircolatorio).

Nella reazione antigene-anticorpo non è coinvolta solo l'istamina ma tanti altri mediatori;

Antagonisti H₁ Istaminergici



In seguito

all'esposizione con l'antigene si ha la formazione di immunoglobuline che portano ad avere una reazione antigene-anticorpo che per interazione con cellule bersaglio quali mastociti e basofili portano alla produzione di istamina, piastrine, 5 idrossi triptamina, prostaglandine del sottotipo E2, SRS-A cioè una miscela di leucotrieni e bradichinina; tutte queste portano ad aumento della permeabilità capillare, ipotensione, edema e contrazione della muscolatura liscia in particolare quella bronchiale.

Dalla scoperta dei primi antistaminici si è visto come questi possono essere classificati in più classi; nella prima generazione si hanno molecole con una struttura molto vicina a quella degli anticolinergici e hanno per la maggior parte come effetto collaterale un effetto sedativo che ne limita l'uso per chi deve svolgere quotidianamente un'attività lavorativa;

nel corso degli anni si è cercato di modificare la struttura di questi antistaminici con il mantenimento dell'attività anti-H1 ma con minori effetti collaterali passando dalla prima alla seconda generazione;

In questo caso si è visto come la maggior parte di queste molecole hanno una struttura triciclica ma che non hanno una selettività solo per i recettori H1 ma agiscono anche su altri sistemi recettoriali come Azelastina o Ketotifene che hanno azione antistaminica e sono anche modulatori cioè impediscono la degranulazione mastocitaria quindi la liberazione dei mediatori delle reazioni allergiche. Hanno comunque minori effetti collaterali, in particolare si diminuisce l'attività anticolinergica e sedativa.

Anche quelli di 2° generazione hanno un grosso problema (tipo Terfenadina) perché a livello cardiaco nei pazienti cardiopatici possono essere agenti pericolosi; la Terfenadina è poi stata modificata in maniera da diminuire questi effetti collaterali che hanno portato alla Fexofenidina.

All'ultima generazione appartengono gli antistaminici più moderni come la Loratadina che hanno minori effetti collaterali: danno minore sedazione, non hanno azione anticolinergica e non danno disturbi a livello cardiaco;

Lezione #18 di Chimica Farmaceutica e Tossicologica II del 16/11/2023

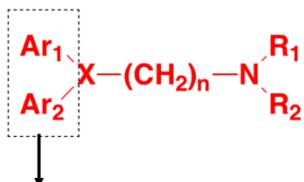
Docente: Anna Minarini

Sbordinatrice: Marta Dostuni

Revisore: Marija Valentina Vilniskyte

SISTEMA ISTAMINERGICO

Antagonisti H1 istaminergici I generazione (SAR)



Hanno la struttura che richiama molto la struttura generale degli anticolinergici: si separa l'attività degli anticolinergici dagli antistaminici andando a modificare alcune parti di questa struttura. Negli anticolinergici il gruppo R1 ed R2 non è indispensabile che sia un anello aromatico, ma potrebbe essere anche un ciclosile o possono essere entrambi i gruppi degli anelli saturi. Per quanto riguarda gli antistaminici R1 ed R2 devono essere due anelli aromatici, cioè fenili, anello piridinico e inoltre i due anelli possono essere inseriti in un triciclo, per esempio in un anello fenotiazinico. I cicli possono essere anche sostituiti e normalmente i sostituenti migliori sono gli alogeni Br e Cl.

Un'altra importante posizione dove si è riuscito a differenziare l'attività colinergica da quella antistaminica X ha dato origine a 3 classi principali di antistaminici che appartengono a questa struttura generale:

- se X è N e n è 2 sono i **derivati etilendiamminici**
- Se X è CHO sono i **derivati etanolamminici o eteri**
- Se X è CH sono i **derivati propilamminici**
- Manca la funzione esterea e la presenza di OH in grado di dare legami a idrogeno H
- La presenza di due gruppi etilici sposta l'attività maggiormente verso l'azione anticolinergica: un altro aspetto molto importante è la protonazione dell'atomo di N nel senso che questi atomi di azoto non vanno mai quaternarizzati per il sistema istaminergico. Anche la quaternarizzazione aumenta l'attività anticolinergica.
- L'N può essere inserito all'interno di un ciclo e normalmente il ciclo è un ciclo piperidinico
- La catena può essere ramificata per esempio con l'inserimento del metile e questo è il caso generale in cui abbiamo la Prometazina dove la catena laterale contiene anche un metile.

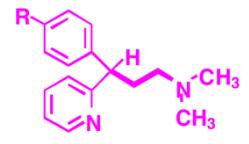
1. Alla classe delle **Etilendiammine** appartiene la **TRIPELENNAMINA**: si hanno due anelli aromatici caratterizzati da un eteroatomo (piridina)
2. Tra i derivati **etanolamminici** si ha la **DIFENIDRAMINA**: caratterizzati dal CHO (etero)



3. I derivati **propilamminici** presentano l'atomo di azoto sostituito con i metili, al posto di un anello aromatico si ha un piridina e questi possono essere sostituiti. Quando c'è la sostituzione sull'anello aromatico la sostituzione deve avvenire in *para* perché i due anelli aromatici devono stare sullo stesso piano, per cui la sostituzione in altre posizioni per ingombro sterico farebbe ruotare l'anello. I sostituenti sono gli alogenini, normalmente Br e Cl.

Il derivato non sostituito è la **FENIRAMINA**, poi ci sono **CLORFENAMINA** e **BROMFENAMINA** sostituiti da Br e Cl.

CLORFENAMINA, BROMFENAMINA e anche DIFENIDRAMINA sono quelle che danno maggiore sedazione come effetto collaterale insieme alla famosa PROMETAZINA



Feniramina: R = H
Clorfenamina: R = Cl
Bromfenamina: R = Br
(propilammina)

4. Nella **PROMETAZINA** si trova il triciclo 6 6 6 (anello fenotiazinico), la catena CH₂-CH₂ (due metileni importanti per la distanza tra i due atomi di N), non è importante il centro chiarale, sono presenti i due metili sull'atomo di N e si osserva la complanarità del triciclo. Quando si ha un anello fenotiazinico la giunzione 6 6 6 ha un minor ripiegamento dei due anelli laterali e quindi la struttura è vicino alla complanarità (160 gradi). La **PROMETAZINA** è la molecola da cui è stata derivata la classe dei fenotiazinici ad azione antipsicotica, cioè è l'isomero strutturale della **PROMAZINA**, dove i CH₃ in catena laterale sono inseriti tra i due atomi di N; quindi, gli atomi di N nella PROMAZINA sono distanziati da una catena a tre propilica. Quindi la **PROMETAZINA** è la PROMAZINA nella forma ramificata.

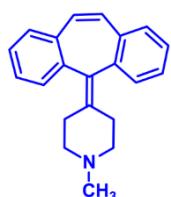
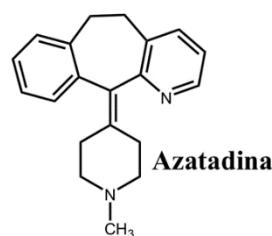
Anche la fenotiazina, pur non essendo un antipsicotico, ha una forte azione sedativa, attraversa la barriera emato-encefalica, può essere anche utilizzata per uso veterinario per indurre sonno negli animali. Non sono farmaci che devono essere utilizzati come induttori del sonno, ma di fatto sono molto sedativi.

Queste molecole sono ancora usate, però solo in alcuni casi, perché l'utilizzo cronico di queste modifica le funzioni quotidiane. Negli anni, quindi, si è cercato di trovare delle molecole che avessero una limitata sedazione, ma per la maggior parte queste molecole non sono selettive, cioè non agiscono solo ed esclusivamente sui recettori istaminergici.

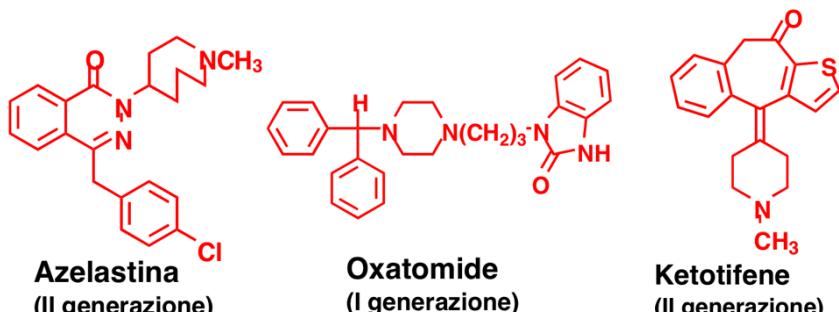
AZATADINA e **CIPROEPTADINA** sono molecole che oltre ad avere un effetto antistaminico hanno anche come effetto additivo e favorevole per l'azione antistaminica l'antagonismo verso altri mediatori della risposta allergica (effetti collaterali positivi): bradichinina, serotonina, leucotriene.

La **CIPROEPTADINA** è un antagonista del recettore 5-HT_{2A} oltre ad essere antagonista H1: da un effetto sull'ormone della crescita, infatti, *Periactin* veniva utilizzato nei bambini che dimostravano dei difetti di crescita.

L'**AZATADINA** e la **CIPROEPTADINA** contengono questi tricicli, in particolare l'**AZATADINA** è un benzopiridocicloephtano, mentre la **CIPROEPTADINA** è un dibenzocicloephtene. Viene mantenuta la presenza di un elemento fondamentale di questi antistaminici, ovvero un atomo di N terziario che nel caso specifico di Azatadina e Ciproeftadina sono contenuti all'interno di un anello piperidinico.



Altri stabilizzatori della membrana mastocitaria, quindi diminuiscono la fuoriuscita di mediatori della reazione allergica, sono questi derivati come **AZELASTINA** (appartiene alla seconda generazione), **OXATOMIDE** (viene classificato tra quelli di prima generazione) e **KETOTIFENE** (di seconda generazione).

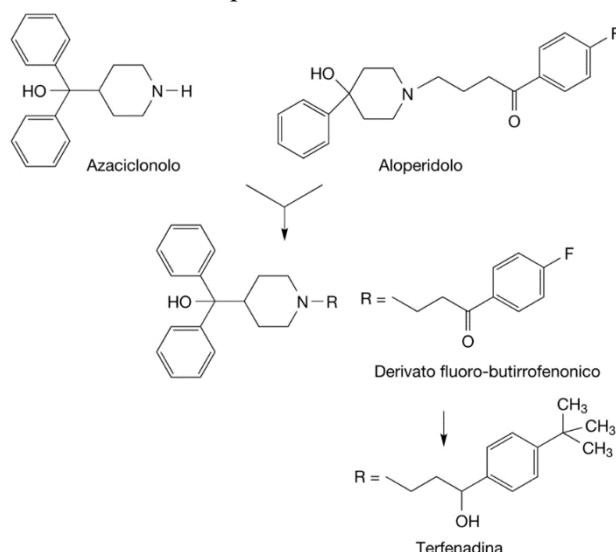


In realtà l'Oxatomide ha le caratteristiche ciclizzate dei derivati Etilendiamminici, presenta i due gruppi basici che sono ad una distanza di due CH₂.

Progettazione TERFENADINA

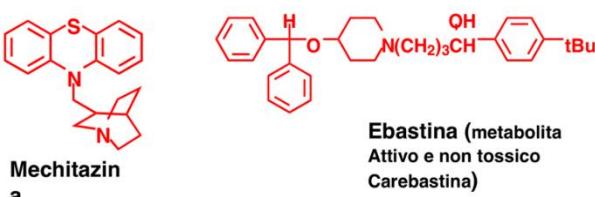
Un aspetto importante è quello che si è fatto per andare verso i derivati con i minimi effetti centrali sedativi: quello che è scaturito da questa ibridazione strutturale ha dato origine a delle molecole diverse da quelle che si stavano cercando. In particolare si sono ibridati tra di loro due molecole con azione antipsicotica.

Aloperidolo e l'Azaciclonolo si ibridano strutturalmente: dall'ibridazione strutturale è stata progettata una struttura che si è visto perdeva l'attività antipsicotica andando a modificare il carbonile dell'Aloperidolo da



gruppo carbonilico a gruppo alcolico e così da questo **derivato fluoro-butirrofenonico**, andando a fare questa modifica e anche andando a cambiare i sostituenti sull'anello, si è ottenuta la **TERFENADINA**. La molecola non ha azione antipsicotica proprio perché quel carbonile ,che è stato trasformato in OH, fa perdere l'attività per il dopaminergico, invece la sostituzione con il gruppo terbutilico favoriva l'attività antistaminica. La Terfenadina è una molecola in cui si ha il carbonile ridotto dal precedente Aloperidolo e il fluoro modificato da un terbutile.

Oltre alla TERFENADINA è stata sviluppata l'**EBASTINA, MECHITAZINA** quasi contemporaneamente.



Terfenadina

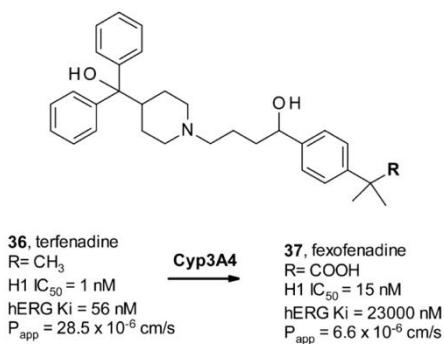
La Terfenadina ha una buona azione antistaminica, ma è una molecola che ha effetti collaterali a livello cardiaco. Siccome la sua azione antistaminica era molto interessante e soprattutto non aveva effetti collaterali centrali si è pensato che la presenza dei gruppi OH la rendono molto più idrofila rispetto agli altri antistaminici; andando a studiarne la lipofilia globale ci si è resi conto che in realtà il logP di questa molecola non è così differente dal logP delle altre molecole di prima generazione. Probabilmente non è la lipofilia della molecola che ne determina un minore passaggio della barriera emato-encefalica. Andando a studiare maggiormente la Terfenadina si è visto che la molecola rappresenta un substrato delle glicoproteine P, che sono delle proteine di efflusso che sono molto rappresentate a livello centrale e che sono

causa dell'estruzione di farmaci e di altre sostanze come protezione anche a livello della barriera emato-encefalica (causa principale della resistenza ai chemioterapici come utilizzo perché hanno la funzione di protezione della cellula, quindi di portare al di fuori della cellula sostanze che riconoscono come strane).

La Terfenadina ha una minore permeabilità a livello centrale semplicemente perché è il substrato delle proteine di efflusso.

La Terfenadina induce un'aritmia che in alcuni pazienti può essere fatale perché prolunga l'intervallo QT cardiaco e questo è dovuto principalmente alla sua azione sui canali del K (hERG). Questo blocco dei canali del K è la causa principale di queste aritmie causate da Terfenadina e quindi nonostante la molecola fosse un potente antistaminico , non aveva azioni sedative rappresenta un farmaco non utilizzabile. È stato utilizzato per un certo periodo, poi si è scoperto che la Terfenadina in vivo viene metabolizzata attraverso l'ossidazione di uno dei metili del terbutile (tipica ossidazione metabolica), cioè uno dei metili del gruppo terbutilico viene trasformato in gruppo COH.

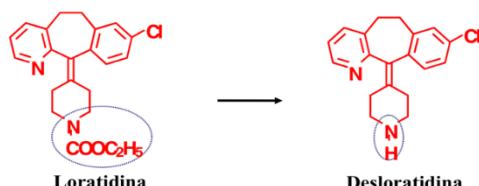
Il metabolita carbossilico che ne deriva è la **Fexofenadina**, e si è visto che questo metabolita oltre ad avere un'attività antistaminica seppur un po' inferiore, non ha azione sui canali del K hERG e inoltre ha ancora una minore esposizione a livello centrale.



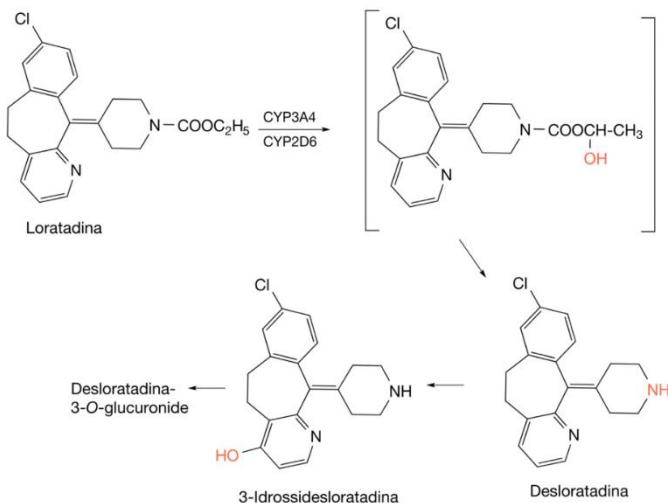
Nella molecola è presente contemporaneamente un gruppo carbossilico e un gruppo amminico, quindi sarà anche in forma di switterione. Questa forma favorisce il legame alla glicoproteina P, quindi favorisce il suo efflusso a livello centrale. La *Permeabilità apparente Papp* è più alta per la Terfenadina rispetto alla Fexofenadina, quindi attraversa ancora meno la barriera emato-encefalica. Gli *IC₅₀* su H1 è di 1 nM per la Terfenadina, quindi è molto potente; mentre per la Fexofenadina è di 15nM, quindi è 10 volte meno attiva mantenendo un'attività antistaminica molto elevata. Il dato più importante di tutti è l'affinità nei confronti dei canali del K hERG è di 56 nM per la Terfenadina, mentre crolla a 23000 nM per la Fexofenadina (quindi è molto meno affine ai canali del K). Tutto ciò fa sì che il farmaco utilizzato sia la Fexofenadina.

Alcuni antistaminici, quelli più moderni e dell'ultima generazione, apparentemente non sono basici.

La **LORATIDINA**, presenta un carbammato e il carbammato fa sì che la Loratidina sia un profarmaco. Si utilizza in forma di questo etilcarbammato, perché chiaramente ne migliora le proprietà farmacocinetiche di assorbimento. In vivo la Loratidina viene trasformata in **DESLORATIDINA**, quindi l'atomo di N basico si ripristina che è fondamentale per avere l'attività antistaminica. In questo caso ritorna la struttura del triciclo, cioè la presenza di un gruppo piridobenzoetano. Il Cl della Desloratidina e della Loratidina è fondamentale per l'attività perché ne aumenta la potenza notevolmente. Queste molecole sono le molecole attualmente più utilizzate in quanto non hanno effetti collaterali a livello cardiaco e danno anche una minore effetti di sedazione



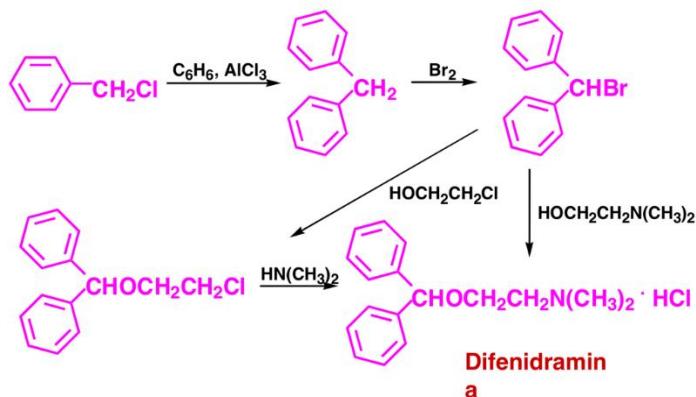
La Loratadina nel passaggio prevede prima una ossidazione del carbonio del gruppo etilico in catena laterale, non viene direttamente idrolizzato il carbammato ma viene prima ossidrilato e poi scisso dall'esterasi. La Desloratadina è attiva, mentre invece il metabolita ossidrilato sull'anello piridinico perde molta attività ed è quello che subisce la coniugazione per il metabolismo di fase 2 .



Questo è un aspetto interessante perché non si potrebbe pensare che si idrolizzi e basta, ma prima viene ossidrilato in catena laterale. Questo è uno degli altri metaboliti molto presenti a livello fisiologico.

SINTESI della DIFENIDRAMINA

- Benzilchloruro:** sul quale insieme al benzene si fa una reazione di Alchilazione di Friedel Crafts in presenza dell'Acido di Lewis AlCl_3



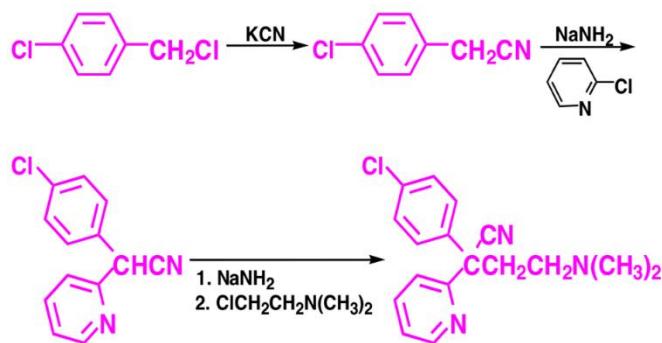
- Difenilmetano:** le posizioni del benzene sono equivalenti; bisogna attivare il derivato del Difenilmetano in quanto successivamente avviene la Sostituzione Nucleofila: si attiva il derivato con il **Br₂** in modo da ottenere il **bromo derivato**

- Bromo-derivato:** può prendere due strade

- Fare la reazione con la Cloridrinaetilenica, in questo caso si fa una reazione di eterificazione di Williamson e poi successivamente una reazione di Sostituzione Nucleofila con la dimetilammina
- Fare la reazione con la dimetiletoliammina in ambiente basico formando l'Alcolato e quindi poi si fa la reazione di Eterificazione di Williamson per avere la **DIFENIDRAMINA**

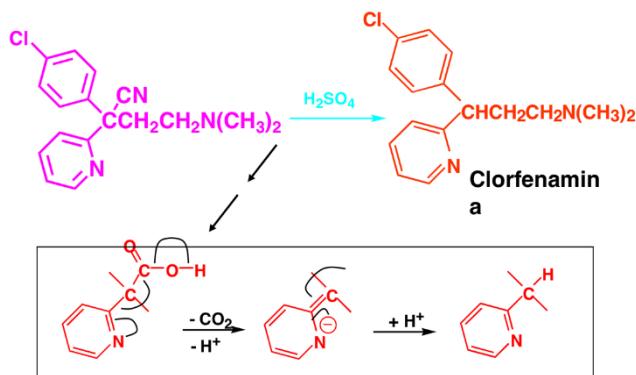
SINTESI della CLORFENAMINA

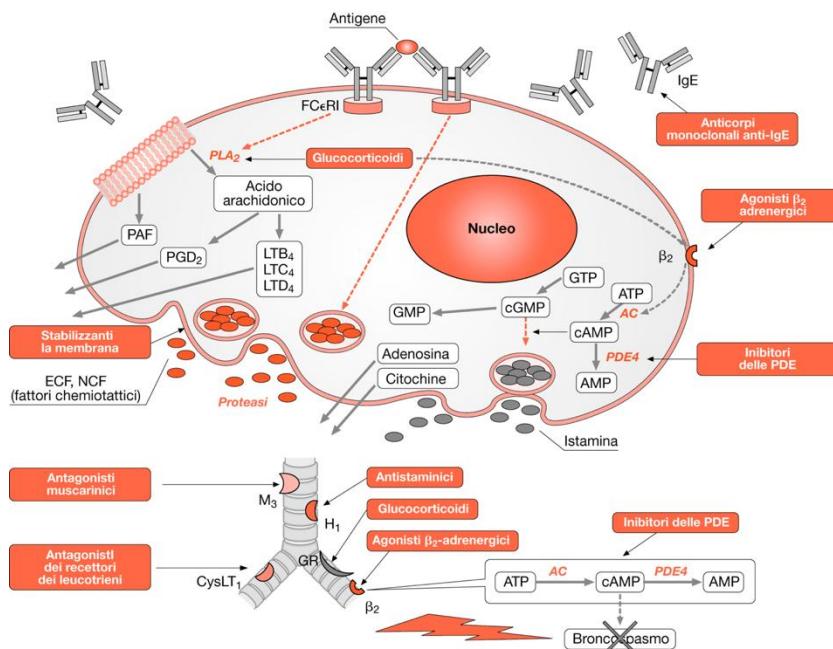
1. Paraclorobenzilcloruro: si sostituisce il cloro con KCN in ambiente non acido per evitare la



formazione di acido cianidrico. In questo caso si sono resi più acidi i CH₂ benzilici perché sono legati all'anello aromatico e il CN è un gruppo fortemente elettronattrattore

2. Con la Sodioammide NaNH₂ si strappa uno degli H benzilici e si fa una sostituzione con l'8 cloropiridina
3. Bisogna lavorare sul nitrile, che ha la funzione di rendere più reattivo il CH: si fa un'ulteriore sostituzione per legare il resto della catena laterale e si strappa l'altro H benzilico con NaNH₂
4. **Dimetilcloroetilammina:** lego il resto della catena al CH benzilico; il CN viene eliminato tramite una reazione di idrolisi in ambiente acido, che prevede prima la formazione del gruppo carbossilico e poi si ha la decarbossilazione spontanea del carbossile per ottenere la **CLORFENAMINA**.





In foto l'ingrandimento della cellula mastocitaria, l'attività è strettamente connessa con le patologie respiratorie. La cascata di attivazione degli agenti infiammatori porta alla formazione di leucotrieni, questi derivano dalla cascata dell'acido arachidonico che si forma dai lipidi di membrana a partire dalla fosfolipasi A2. I glucocorticoidi agiscono bloccando l'enzima e interrompendo la cascata. Oltre ai leucotrieni vengono prodotte prostaglandine, sono mediatori dell'infiammazione allergica e sono rilasciate in seguito a degranulazione mastocitaria.

Sono importanti anche gli agonisti β_2 adrenergici, alcune delle molecole che agiscono come broncodilatatori nelle patologie come asma o broncopatie ostruttive agiscono anche sulla stabilizzazione della membrana mastocitaria; questa è un'azione additiva, ad esempio il salmeterolo ha questa azione che inibisce ulteriormente la liberazione di mediatori dell'infiammazione e delle allergie. Sono importanti gli inibitori delle fosfodiesterasi e, allo stesso modo degli agonisti beta 2 adrenergici, hanno come meccanismo quello di aumentare l'AMP ciclico ma in modo diverso. Gli agonisti beta 2 attivano l'adenilato ciclasi e aumentano l'AMP ciclico; gli inibitori delle fosfodiesterasi, come le xantine, agiscono aumentando l'AMP ciclico. Interrompendo la reazione si inibisce la fosfodiesterasi e si accumula a monte l'AMP ciclico e diminuisce la liberazione dei mediatori.

Le cellule mastocitarie sono importanti per la produzione di istamina, questa è un neurotrasmettore e mediatore delle reazioni allergiche che viene rilasciato in seguito a degranulazione. I meccanismi limitano lo stravaso delle sostanze, nel tratto bronco respiratorio sono presenti recettori e regolatori della contrazione della muscolatura liscia bronchiale; i recettori M3 attivati contraggono la muscolatura liscia bronchiale, quando si vuole broncodilatazione servono antagonisti muscarinici. I recettori β_2 si trovano nelle cellule mastocitarie, ma anche a livello bronchiale e hanno effetto opposto, ossia la stimolazione porta a broncodilatazione ci sono i farmaci agonisti β_2 . Ci sono anche i recettori dei glucocorticoidi che fanno sì che questi ultimi abbiano un'azione antinfiammatoria quando interagiscono con i recettori; i recettori H1 portano a broncocostrizione, l'effetto degli antistaminici è la broncodilatazione.

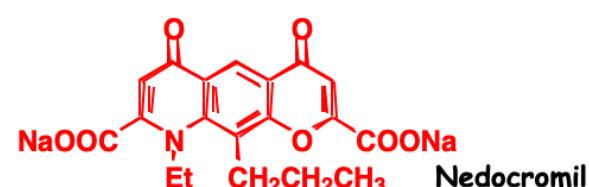
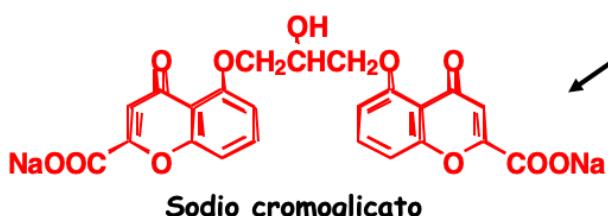
Gli antagonisti dei recettori dei leucotrieni sono usati come farmaci per patologie asmatiche e bronchiali. Il fattore di attivazione piastrinica porta alla liberazione di serotonina. La degranulazione mastocitaria è importante e deve essere controllata per avere un effetto profilattico nelle patologie: la profilassi deve evitare di scatenare la reazione allergica quando si è esposti all'antigene. Un modo è l'azione istaminergica, ma non solo (data la liberazione di altre specie), per ridurre la degranulazione tramite la stabilizzazione della membrana mastocitaria.

Antagonisti H₁ Istaminergici

(azione indiretta)

Antagonisti H₁ Istaminergici (azione indiretta)

- Inibitori della liberazione d'istamina



Uno dei primi composti che ha manifestato l'attività di stabilizzare la membrana mastocitaria è il furocromone, nel quale l'anello del promone è anellato con il furano. La Kellina è una sostanza naturale e mostra un'attività di stabilizzazione della membrana mastocitaria ed è stata il punto di partenza per la progettazione delle molecole usate in terapia il cui prototipo è il sodio cromoglicato.

La Kellina viene utilizzata in pomate per la vitilagine, ha manifestato questa attività e sono iniziati studi di relazione struttura

attività per rendere alla molecola un profilo farmacocinetico accettabile: dagli studi sono emerse due molecole, ossia il disodio cromoglicato (2 gruppi carbossilici sono salificati con il sodio) e il più recente nedocromile. Le due molecole mantengono la struttura del cromone con in posizione 2 il gruppo carbossilico salificato che facilita la somministrazione della molecola. Il sodio cromoglicato non viene somministrato per via orale a causa dello scarso assorbimento, è somministrato in aerosol e colliri, deve essere solubilizzato e dall'acido coromoglicico si deve fare il sodio cromoglicato per renderlo formulabile.

Questa molecola è simmetrica, il carbonio centrale non è chirale. Il meccanismo d'azione non è stato del tutto chiarito, ma le ipotesi principali riguardano la capacità chelante del calcio fondamentale per la degranulazione mastocitaria; la stabilizzazione deriva dalla complessazione degli ioni calcio. La molecola è stata studiata con SAR, il nedocromil ha una buona farmacocinetica ed è usato in terapia anche in Italia.

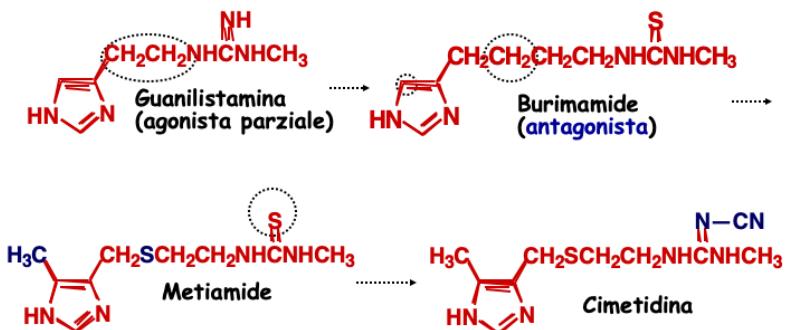
I gruppi acidi vengono mantenuti e salificati per garantire la possibilità di solubilizzarlo in soluzione fisiologica, la molecola non è simmetrica, l'anello del cromone viene fuso con un anello avente un carbonile alfa-beta insaturo, ma con un atomo di azoto. La catena propilica e la sostituzione con l'etile favoriscono la capacità della molecola di avere un buon profilo farmacocinetico, l'azoto deve essere sostituito. Questi farmaci agiscono inibendo la liberazione di istamina stabilizzando la membrana mastocitaria e per questo sono antagonisti indiretti, non antagonizzano l'effetto dell'istamina sui recettori H₁, ma ne limitano la liberazione. Le molecole non sono utili se la reazione istaminica ha preso l'avvio, non contrastano l'interazione dell'istamina con i recettori, ma ne prevengono l'azione.

Antagonisti H₂ Istaminergici

I recettori anti H₂ sono presenti a livello delle cellule enterocromaffini gastriche e sono adiacenti alle cellule parietali aventi la pompa K-H⁺-ATPasica che controlla la secrezione di acido cloridrico. Gli antagonisti H₂ agiscono andando ad antagonizzare i recettori H₂ nelle cellule cromaffini che, se stimolati, stimolano la pompa protonica a liberare acido cloridrico; questi sono i primi importanti farmaci antiulcera progettati. Si richiama alla struttura dell'istamina che può dare origine all'equilibrio prototropicco nella porzione imidazolica, l'H può trovarsi sull'azoto più lontano dalla catena laterale ovvero il Tau o sull'azoto proxi più vicino alla catena laterale. Nel caso degli antistaminici H₁ la tautomeria non è importante, ma in questo ambito la tautomeria è importante perché l'atomo di azoto in Tau deve essere protonato. Quando si è la

Antagonisti H₂ Istaminergici

- Uso terapeutico: ulcera gastrica
- Sviluppo degli antagonisti H₂



La guanilistamina ha portato non ad un'eliminazione dell'attività agonista, ma all'agonismo parziale che risiede nella molecola in virtù della basicità del gruppo guanidinico. Il passaggio successivo è stato l'allontanamento del gruppo planare terminale allungando la catena che separa l'anello imidazolico dalla parte terminale della catena, è stato sostituito in modo da non avere più un gruppo basico; oltre ad aggiungere la catena butilica, al posto del gruppo metilguanidinico è stato inserito un gruppo metiltioureidico che non ha N basici, ma ha una planarità uguale al gruppo guanidinico, ma caratteristiche basiche diverse.

La buriramida non è mai diventata un farmaco perché il gruppo metiltioureidico dà origine alla tautomeria cheto-enolica con un SH e i derivati con il gruppo mostravano una tossicità per agranulocitosi; buriramida e il suo successori non hanno avuto un futuro come farmaci. La metiamide mantiene il gruppo metiltioureidico per le caratteristiche di planarità favorevoli per dare l'interazione e si è valutato se era importante la tautomeria dell'anello imidazolico Tau-Proxi, si deve creare una situazione di intorno chimico sull'anello imidazolico che stabilizzi maggiormente un tautomero rispetto ad un altro. Si è inserito un gruppo metilico elettronrepulsore adiacente all'azoto Tau, contemporaneamente si è inserito un gruppo elettronattrattore, elettronattrattore diminuisce la basicità dell'azoto, mentre il metile aumenta la basicità di Tau. La protonazione si ha sull'azoto Tau, lo studio ha dimostrato che questa è la forma che dà la migliore attività antagonista per i recettori H₂. La metiamide per la presenza del gruppo metiltioureidico non ha avuto futuro come farmaco, ha portato ad un'ulteriore modifica con la nascita del primo antagonista H₂ istaminergico utilizzato come antiulcera ovvero la cimetidina.

Nella cimetidina si è risolto il problema della tossicità dovuta alla formazione del tiolo per tautomeria cheto-enolica del gruppo metiltioureidico sostituendo questo gruppo con il gruppo metilcianoguanidinico. Il problema del gruppo guanidinico è la basicità, si inserisce un gruppo ciano elettronattrattore per diminuire la basicità del gruppo guanidinico. La molecola ebbe fortuna, dagli studi successivi è nata una molecola con un grande fatturato ovvero l'ranitidina.

Poi è iniziato il declino delle molecole per via della ricerca sugli inibitori della pompa protonica, attualmente d'elezione nel controllo dell'ulcera gastrica, gli H₂ sono comunque efficaci e hanno diminuito gli interventi chirurgici a livello gastrico.

Sviluppo degli antagonisti H₂

La Cimetidina ha degli aspetti importanti:

- Anello imidazolico con tautomeria Tau, ovvero l'H è sull'azoto tele (forse tau?). Nei derivati l'anello può essere anche un anello azotato ovvero un bioisostero dell'imidazolo, ma deve avere un atomo di azoto basico ovvero deve contenere anche a livello esociclico un gruppo basico.

scoperto che il sistema istaminergico è caratterizzato da diversi sottotipi tra cui l'H₂ a livello gastrico sono iniziati degli studi, quindi partendo dalla struttura dell'istamina per capire come si potesse modificare per ottenere degli antagonisti. Il punto di partenza è stato il neurotrasmettore, il gruppo amminico terminale è stato sostituito con il metilguanidinico che mantiene la basicità, la molecola si è resa più ingombrante il gruppo amminico terminale andando a sostituire con un sostituento basico e planare. La modifica dall'istamina alla

Antagonisti H₂ Istaminergici

Sviluppo degli antagonisti H₂

- Un anello imidazolico o un eterociclo azotato simile
- Una catena flessibile in conformazione estesa, in particolare $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}-$
- Un gruppo planare molto polare, in grado di formare legami idrogeno



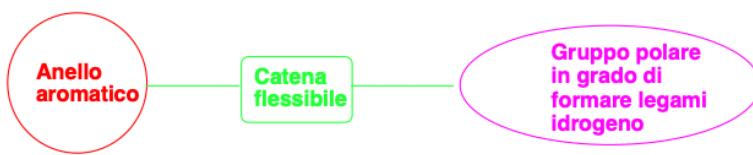
1. Composti a struttura flessibile
2. Composti a struttura diarilica

dare legami ad idrogeno, non basico. Alla guanidina si sostituisce un gruppo ciano elettronattrattore. Questo ha portato ai **composti a struttura flessibile** più somiglianti alla struttura cimetidina e quelli a **struttura diarlica** che sono meno rappresentati, l'unico in terapia ovvero la roxatidina acetato è stato revocato dall'AIFA.

Composti a struttura flessibile

Antagonisti H₂ Istaminergici

Composti a struttura flessibile



- Derivati imidazolici



di trovare degli anelli bioisosteri del metylimidazolo che mantenessero l'attività anti H₂.

Derivati dimetilamminometilfuranici

Dagli studi sulle SAR è nata la molecola della **ranitidina** che ha un anello furanico e non più imidazolico, ma ha un gruppo dimetilammino metilico perché si deve avere un gruppo basico come l'azoto della cimetidina.

La catena laterale è uguale alla cimetidina, il gruppo terminale è planare, non basico, polare quindi in grado di dare legami a H; è un derivato dell'amminonitroetene. Questo è stato il farmaco più utilizzato, ma sono stati fatti controlli su partite di ranitidina provenienti dall'India, i lotti sono stati ritirati in quanto contenevano nitrosammime che sono sostanze cancerogene, nel 2020 EMA e Food and drugs administration l'hanno ritirata e attualmente non è più in commercio. La famotidina resta in commercio.

- Catene flessibile, in questo caso metiletilsolfuro, inizialmente era butilica, lo zolfo favorisce la tautomeria nei derivati imidazolici Tau. La catena flessibile preferibilmente deve essere in forma estesa perché potrebbe posizionarsi avvicinandosi al metile o stando dalla parte opposta; l'avvicinamento al metile crea ingombro sterico e favorisce la conformazione estesa della catena laterale, il metile favorisce la protonazione dell'azoto Tau.

- Al termine della catena c'è un sostituente planare e polare in grado di

I requisiti per l'azione H₂ sono l'anello aromatico, la catena flessibile che per questi derivati è il metiletilsolfuro e gruppo polare in grado di formare legami ad H e non basico.

Il gruppo è il metilciano guanidinico, la cimetidina per la presenza dell'anello imidazolico interagisce con i citocromi p450 e nel maschio dava ginecomastia con ingrossamento delle ghiandole mammarie e in alcuni casi iperprolattinemia, perché l'anello imidazolico influenzava gli enzimi della cascata della formazione degli ormoni.

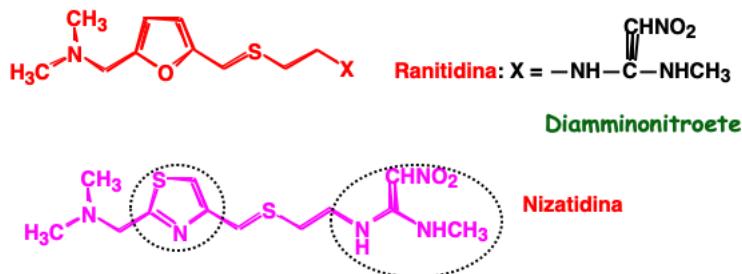
L'effetto collaterale è serio e si è cercato

Un derivato dimetilammino furanico è anche la **nizatidina** che ha come gruppo terminale, al posto del diamminonitroetene, un gruppo guanidinico e invece del nitrile il gruppo elettronattrattore è il gruppo nitro, ha la stessa funzione del nitrile della cimetidina.

Antagonisti H₂ Istaminergici

Composti a struttura flessibile

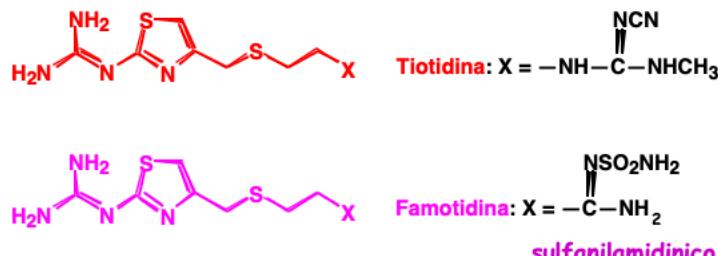
- Derivati dimetilamminometilfuranici



Antagonisti H₂ Istaminergici

Composti a struttura flessibile

- Derivati guanidinotiazolici



elettronattrattore che diminuisce la basicità del gruppo amminico ed è il famotidina e non sono gli unici.

Derivati guanidinotiazolici

Iniziano le sostituzioni bioisosteriche, sostituendo il furano con il tioazolo e si mantiene la basicità del gruppo dimetilamminometilico.

La famotidina è ancora presente ed è un'evoluzione, mantiene l'anello tiazolico bioisostero di furano e imidazolo, il gruppo basico adiacente all'anello aromatico è il guanidinico che fa le veci del dimetilammino metilico.

Nella tiotidina la porzione terminale è uguale alla cimetidina con il gruppo metilamminocianoguanidinico, nella famotidina c'è un gruppo

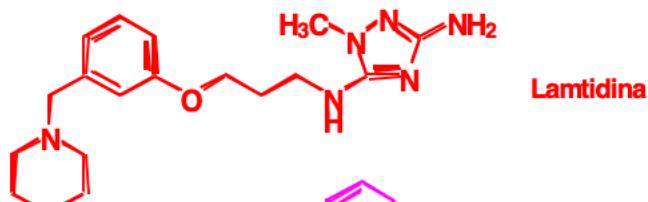
Derivati piperidinometilfenossi

La lamtidina non è più in terapia, ma è stata importante per la Roxatidina acetato non usata in Italia in terapia, I composti hanno una struttura flessibile e hanno un anello aromatico, il gruppo basico esociclico è inserito in una piperidina, si chiamano piperidinometilfenossi. La catena flessibile dei derivati analoghi alla cimetidina è sostituito da una catena con la stessa lunghezza, ma con un ossigeno direttamente legato all'anello sono dei derivati fenossi piperidinometilfenossi. La roxatidina acetato termina con un gruppo planare ha un gruppo idrossimetilammidico, l'ammide per effetto della risonanza può essere rappresentata con un doppio legami azoto-carbonio. Viene somministrato in forma di acetato per migliorare l'assorbimento e farmacocinetica, è un profarmaco perché in vivo si ha l'idrolisi dell'acetato e si ripristina l'OH. È da ricordare solo la roxatidina acetato che è ancora terapia in alcuni paesi.

Antagonisti H₂ Istaminergici

Composti a struttura flessibile

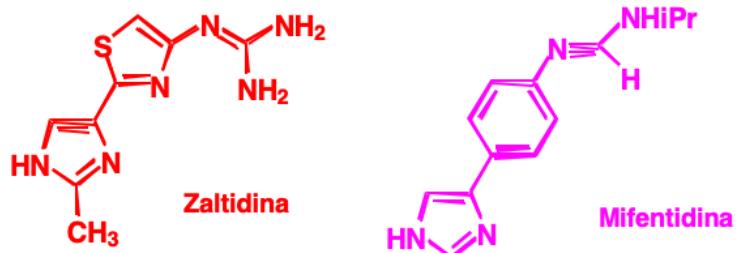
- Derivati piperidinometilfenossi



Composti a struttura diarlica

Antagonisti H₂ Istaminergici

Composti a struttura diarilica



In questo caso è stata bloccata la catena centrale inserendo un anello tiazolico o un benzene , zaltidina e mifentidina sono definiti composti a struttura diarlica e non più utilizzati come farmaci.

INIBITORI DELLA POMPA PROTONICA

La pompa protonica, chiamata anche proteina H⁺/K⁺-ATPasi, appartiene alla stessa famiglia della Na⁺/K⁺-ATPasi, con la quale ha un grado di omologia strutturale molto alta (circa 62%). Tuttavia anche se il livello di omologia è elevato, si è riusciti ad avere un'inibizione selettiva di tale pompa, senza interferire gravemente con altre pompe appartenenti alla famiglia.

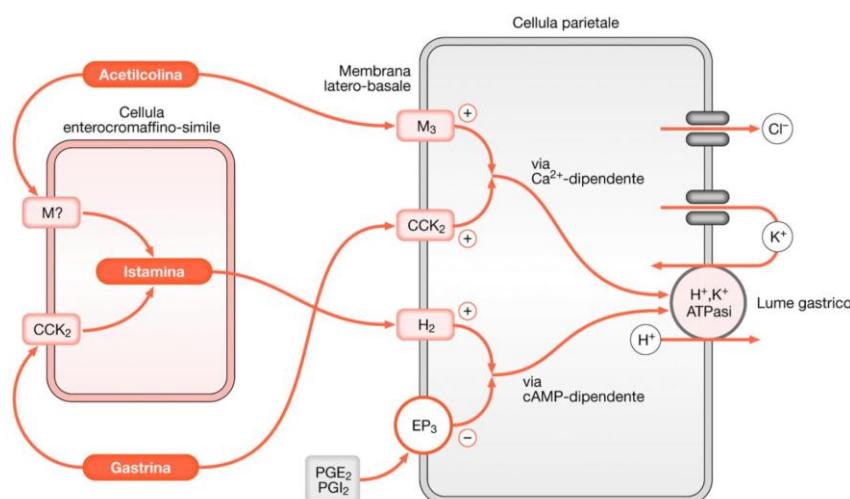
Essa ha il compito di trasferire da una parte all'altra della membrana, coadiuvata dall'ATP, ioni: l'evento fondamentale affinché si verifichi il trasferimento di ioni H⁺ a livello del lume gastrico, è uno scambio attivo con gli ioni K⁺.

Tale pompa si trova a livello della membrana apicale delle cellule ossintiche/parietali gastriche. Oltre allo stomaco, è presente anche in altre porzioni del tratto gastro-enterico (colon) e in parte anche a livello renale, ma differisce da quella gastrica per la sensibilità ai farmaci.

La produzione del succo gastrico dalla cellula parietale è sotto il controllo di neurotrasmettitori, quali istamina e acetilcolina, e di ormoni, quali la gastrina. Inibitori della secrezione gastrica possono essere antagonisti muscarinici M1 (pirenzepina), antagonisti istaminergici H2 (cimetidina, ranitidina e famotidina), antagonisti della gastrina.

Gli inibitori della pompa protonica sono farmaci ampiamente utilizzati in terapia per il controllo delle gastriti e per il reflusso gastro-esofageo. Il nome corretto della pompa protonica è H⁺/K⁺-ATPasi, perché è una pompa che agisce con energia fornita dall'idrolisi dell'ATP scambiando l'idrogeno con il potassio; il potassio viene assorbito all'interno della cellula che lo produce e l'idrogeno viene immesso nel lume gastrico. La pompa appartiene alla stessa famiglia della Na⁺/K⁺-ATPasi, scambiatore ionico.

Essa è controllata sia da neurotrasmettitori, quali l'**acetilcolina** tramite i recettori muscarinici M1 e M3 e **istamina**, che da ormoni, come la **gastrina**. Si ha anche un controllo negativo della pompa protonica, rappresentato dalle **prostaglandine**, motivo per cui, quando si assume un farmaco antinfiammatorio, sia esso steroideo o non steroideo, viene meno il controllo inibitorio della pompa,



con un aumento della secrezione gastrica.

L'istamina prodotta e rilasciata dalle cellule enterocromaffini gastriche, attiva i recettori H₂ presenti sulla cellule parietali e, attraverso una via cAMP-dipendente, questi recettori stimolano positivamente la pompa protonica, quindi la produzione di HCl a livello del lume gastrico (si traduce in una maggior concentrazione di ioni H⁺ a livello del lume gastrico).

Un altro recettore importante presente sulle cellule enterocromaffini gastriche sono i recettori muscarinici (M₁ e M₃): questi ultimi stimolati dall'acetilcolina, aumentano la produzione di istamina a livello delle cellule enterocromaffini e contemporaneamente andando ad attivare i recettori M₃ presenti sulle cellule parietali, tramite una via calcio-dipendente, portano a stimolazione della pompa protonica.

Sunto: anche i recettori muscarinici aumentano l'attività gastrica!

Infine, la gastrina, agisce sui recettori CCK2 (recettori della colecistochinina 2) presenti sia a livello della cellula parietale che della cellula enterocromaffine gastrica: agendo sui recettori CCK2 delle cellule parietali stimola la pompa protonica, così come stimola la produzione e il rilascio di istamina agendo sui recettori CCK2 presenti a livello delle cellule enterocromaffini.

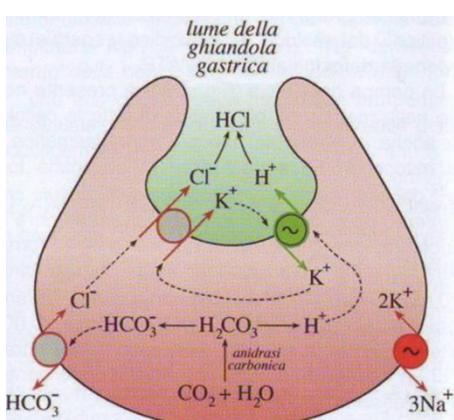
Differentemente, le prostaglandine, andando ad agire sui loro recettori EP3 a livello della membrana della cellula parietale gastrica (su tali recettori agiscono anche le prostacicline), danno un effetto inibitorio sulla pompa protonica, sempre mediato dalla via cAMP-dipendente. È per questo motivo che le prostaglandine sono considerati dei protettivi nella secrezione di acido gastrico. Le prostaglandine sono coinvolte anche nella produzione di muco protettivo e non solo nella stimolazione della pompa protonica: in presenza di terapie con antinfiammatori steroidei e non steroidei, è necessario una protezione con inibitori della pompa protonica dal momento che viene a mancare l'elemento di protezione a livello gastrico.

I recettori attivati di acetilcolina, istamina e gastrina provocano un aumento della secrezione gastrica, mentre le prostaglandine hanno un effetto protettivo, in quanto inibiscono la pompa protonica.

La pompa protonica funziona coadiuvata da antiporti e simporti; si hanno scambi di ioni a livello dei canalicoli secretori delle cellule ossintiche gastriche. La cellula ossintica gastrica presenta una porzione che volge verso il lume gastrico e l'altra porzione a contatto con la circolazione.

Interconnessione tra istamina, acetilcolina, gastrina e prostaglandine relativamente al loro controllo positivo o negativo sulla pompa protonica.

Dall'immagine di fianco, si nota l'esistenza di una stretta connessione tra le cellule parietali e le cellule enterocromaffini gastriche che producono istamina.



Gli antiporti ed i simporti prevedono lo scambio di ioni positivi e ioni negativi. L'evento finale è rappresentato da un simporto, che porta KCl a livello del lume gastrico, dove poi il potassio, tramite un antiporto viene riassorbito, e nel lume viene rilasciato H⁺. Il funzionamento finale della pompa gastrica è lo scambio di K⁺ con H⁺. L'H⁺ deriva dalla dissociazione dell'acido

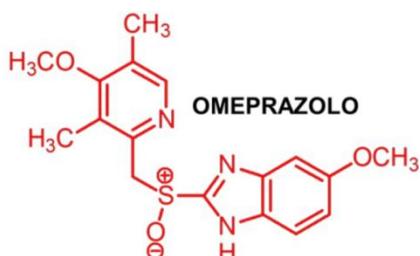
carbonico, a carico dell'enzima anidrasi carbonica; dalla dissociazione si formano H⁺ e bicarbonato; il bicarbonato, tramite un antiporto, viene scambiato con lo ione Cl⁻. Il bicarbonato viene rilasciato nel circolo ematico, mentre lo ione cloruro entra all'interno della cellula ossintica; lo ione cloruro, insieme al potassio, tramite simporto, viene rilasciato nel lume gastrico. Gli ioni H⁺ così formati, tramite la pompa protonica, vengono rilasciati a livello del lume gastrico, e viene riassorbito il potassio.

L'evento netto che si ha con il funzionamento della pompa è la secrezione di HCl a livello del lume gastrico.

La pompa protonica è una proteina; gli inibitori della pompa protonica vanno ad agire tramite un'inibizione irreversibile della proteina. Si ha un attacco covalente da parte degli inibitori, a livello di una cisteina della pompa protonica. La cisteina presenta dei gruppi laterali, che sono dei tioli (-SH), quindi si ha la formazione di un ponte disolfuro tra l'inibitore e la pompa.

La pompa protonica è controllata da vari modulatori, di cui i principali sono acetilcolina, gastrina, istamina e

prostaglandine; acetilcolina, gastrina e istamina vanno ad attivare la pompa, quindi determinano aumento della secrezione di HCl; le prostaglandine, invece, hanno effetto inibitorio.



Il prototipo della classe degli inibitori della pompa protonica è l'omeprazolo, un benzo-imidazolo. Nella molecola si hanno i punti fondamentali che rappresentano i requisiti in cui risiede l'attività, e senza i quali non si avrebbe l'azione inibitoria nei confronti della pompa.

Il gruppo solfossido legato all'anello benzil-imidazolico e l'eterociclo basico, piridina, sono molto importanti per l'attività.

Nella molecola dell'omeprazolo si hanno alcune caratteristiche fondamentali, che ricorrono in tutti gli inibitori della pompa protonica:

- sull'anello piridinico si hanno gruppi elettron-donatori: questo è un aspetto importante perché si deve

rendere l'anello piridinico il più reattivo possibile, per la reazione di ciclizzazione che deve avvenire per

l'attivazione della molecola; quindi, i gruppi elettron-repulsori sull'anello hanno l'obiettivo di rendere più

basico l'azoto piridinico. La molecola non agisce come tale, ma rappresenta un profarmaco: la forma

attiva dell'omeprazolo si ha a pH gastrico, cioè in ambiente acido, ed è importante la presenza di gruppi

elettronondonatori, che rendono più reattiva la piridina;

- il gruppo solfossido è il punto chiave per la reazione di attivazione: in seguito all'attivazione si ha la

formazione, tramite il gruppo solfossido, di due intermedi: acido sulfenico e sulfenamide, in equilibrio tra

loro; l'attacco da parte dell'-SH (gruppo tiolico) della cisteina avviene sull'intermedio sulfenico o sulfenamidico; quindi, il gruppo solfossido che si modifica nella reazione di attivazione è fondamentale.

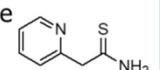
- anche il benzil-imidazolo è fondamentale perché subisce l'attacco da parte dell'azoto piridinico nella reazione di attivazione.

Gli inibitori della pompa protonica vengono spesso somministrati insieme agli anti-H₂, per avere un effetto

sinergico. Un problema degli anti-H₂, ma anche degli inibitori della pompa protonica, è relativo alla creazione di una certa resistenza da parte del paziente, con l'utilizzo cronico delle molecole. Di conseguenza, sia per gli inibitori della pompa, che per gli anti-H₂, è consigliabile sempre assumerli per dei periodi di tempo e alternare all'assunzione dei periodi di sospensione della terapia.

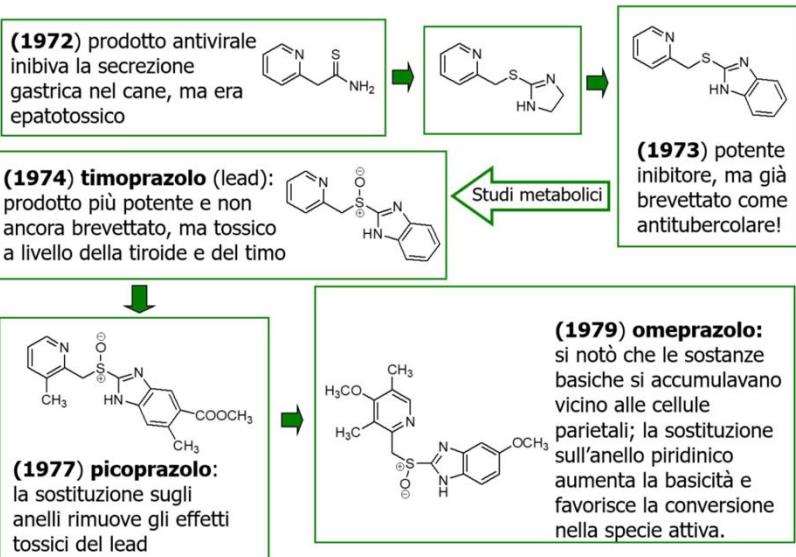
Gli inibitori della pompa protonica sono molecole recenti (i più nuovi sono entrati in terapia dagli anni 90 al 2000); la commercializzazione dell'omeprazolo risale al 1980. Lo sviluppo di queste molecole parte dal 1970, da un prodotto antivirale, noto per il suo utilizzo esclusivamente a livello veterinario, rappresentato da una tio-amide sostituita con una benzil-piridina; questo prodotto antivirale aveva anche un effetto inibitorio nella secrezione acida gastrica del cane; nell'uomo, questa molecola è molto epatotossica. Si considerò l'idea che la tossicità fosse dovuta alla tautomeria che si viene a creare nel gruppo tio-ammidico, che può dare un tiolo; i tioli spesso possono causare granulocitopenia o epatotossicità.

(1972) prodotto antivirale
inibiva la secrezione
gastrica nel cane, ma era
epatotossico



Quindi, il gruppo amminico è stato inserito in un ciclo, e, pensando alle caratteristiche necessarie per la protezione nei confronti della secrezione gastrica, si è pensato di sostituire l'anello imidazolico caratteristico dell'istamina, pensando che il meccanismo fosse mediato dai recettori H₂. Si è inserita l'imidazolina (nei processi di relazione struttura-attività si è passati attraverso l'anello imidazolico, per poi ottenere l'imidazolina); all'anello imidazolinico è stato unito il benzene, ottenendo il benzil-imidazolo.

SCOPERTA DELL'OMEPRAZOLO



Il benzil-imidazolo, scoperto nel 1973, è un potente inibitore della pompa protonica, ed era già stato brevettato come antitubercolare. Su questa molecola sono stati fatti studi metabolici per andarne a verificare in vivo la farmacocinetica, quindi come veniva trasformato; si è cercato di capire se l'azione risiedesse nella molecola

iniziale oppure in qualche metabolita. Si è visto che la molecola attiva, con azione inibitoria, era il suo metabolita ossidato: l'atomo di zolfo, in vivo, viene ossidato prima a solfossido e poi a sulfone. Il derivato solfossido fu chiamato timoprazolo, perché tossico a livello del timo e della tiroide, e non entrò mai in terapia come farmaco; il timoprazolo rappresentava la molecola LEAD su cui negli anni sono stati fatti molti studi di relazione struttura- attività, per ottimizzare l'attività ed eliminarne la tossicità. Si osservò che andando a sostituire sull'anello piridinico dei gruppi elettron-repulsori si otteneva una diminuzione dell'attività tossica nei confronti di timo e tiroide.

Sono stati effettuati molti studi sul picoprazolo, progettato intorno agli anni 80; da ulteriori relazioni struttura- attività, si è andato ad aumentare il numero di gruppi elettron-donatori a livello della piridina e si sono inseriti gruppi elettron-donatori a livello del benzo-imidazolo.

Intorno agli anni 80 si arrivò alla scoperta e alla commercializzazione dell'omeprazolo, primo inibitore della pompa protonica a essere utilizzato in terapia.

L'omeprazolo è una molecola con caratteristiche basiche, che fanno sì che la molecola si concentri maggiormente a livello delle cellule parietali (devono essere somministrati in capsule gastroresistenti, perché

devono arrivare intatti a livello delle cellule parietali); ciò che aumenta la basicità, quindi la reattività, delle molecole è la presenza di opportuni gruppi elettron-repulsori a livello dell'anello piridinico; questo perché la presenza di questi gruppi favorisce la formazione della specie attivata dell'omeprazolo.

Si ha una prima fase, in cui si ha la protonazione dell'omeprazolo; successivamente si ha una prima ciclizzazione, seguita dall'apertura dell'anello formato, per dare gli intermedi acido sulfenico e sulfenamide in equilibrio tra loro.

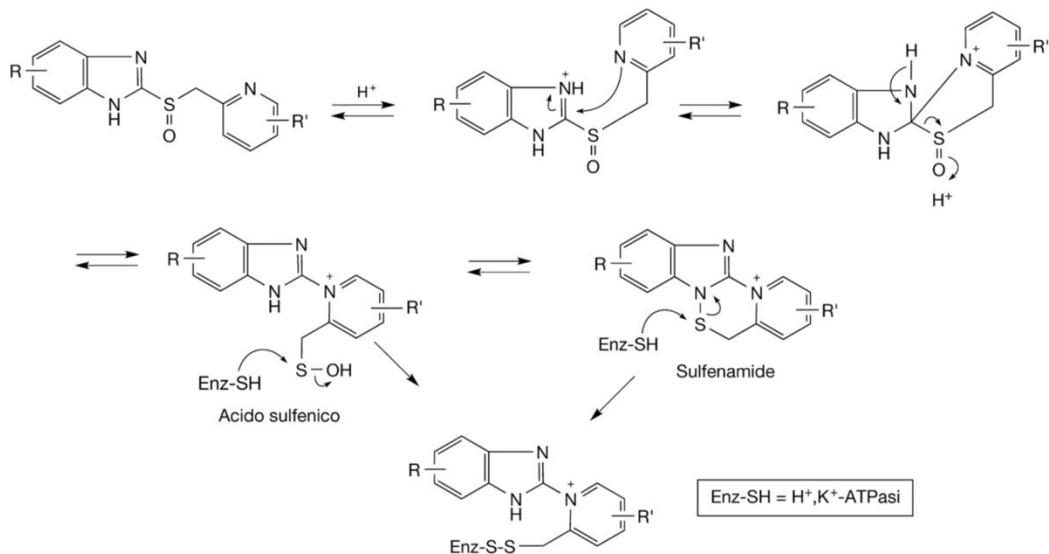
La sulfenamide o l'acido sulfenico subiscono l'attacco da parte del tiolo di una cisteina della pompa protonica, che è la Cys813.

In ambiente acido si verifica la protonazione, con l'aumento della reattività della molecola: il carbonio vicino al gruppo solfossido e vicino all'azoto carico positivamente è un carbonio attivato δ^+ per subire l'attacco da parte del doppietto elettronico dell'azoto della piridina. La piridina è resa maggiormente basica dalla presenza di gruppi elettron-donatori sull'anello. Grazie a ciò si ha la prima reazione di ciclizzazione, in cui l'azoto piridinico attacca il carbonio presente tra i 2 atomi di azoto del benzo-imidazolo.

Per riarrangiamento (spostamento protonico), successivamente, si ha l'apertura del ciclo precedentemente

formato, a livello del gruppo solfossido: l'ossigeno del gruppo solfossido si protona, per formare l'intermedio rappresentato dall'acido sulfenico.

L'acido sulfenico, avendo nelle vicinanze un -NH, può ciclizzare dando origine alla sulfenamide.



Acido sulfenico e sulfenamide sono in equilibrio tra di loro. Affinché avvenga la reazione tra un tiolo e un altro zolfo per formare un ponte disolfuro, si deve avere una forma ridotta dello zolfo (tiolo) che reagisce con la forma ossidata; in quel caso era un SS, e l'SH dava l'attacco sull'SS, si formava un nuovo SS, e usciva il tiolo dall'altra parte. In questo caso, sia l'acido sulfenico che la sulfenamide rappresentano la forma ossidata dello zolfo, quindi subiscono l'attacco del gruppo tilico, dando origine alla formazione del ponte disolfuro. La reazione avviene sia sulla sulfenamide che sull'acido sulfenico (in equilibrio tra loro); il risultato finale è sempre la formazione di un ponte disolfuro con la pompa protonica.

La pompa protonica rimane covalentemente inibita; si forma un legame covalente, quindi finché non si sintetizza nuovamente la pompa protonica, la funzionalità rimane inibita; anche dopo la sospensione della terapia si ha un periodo di latenza, in cui la funzionalità è inibita, perché si deve risintetizzare nuova pompa protonica.

Un legame disolfuro non è un legame facilmente idrolizzabile, quindi si ha il blocca irreversibile della pompa.

OMEPRAZOLO

L'omeprazolo è entrato in terapia negli anni 80. È caratterizzato dai punti d'interesse che sono stati successivamente modificati per ottenere i nuovi inibitori della pompa protonica.

L'omeprazolo è una base debole: i gruppi sostituenti aumentano la basicità della molecola che è inattiva a pH 7; per avere l'attivazione della molecola bisogna trovarsi a pH acido (nella reazione di attivazione si ha bisogno di ioni H⁺). L'attivazione non deve essere direttamente a livello gastrico, ma si deve attivare a

livello dei canalicoli secretori delle cellule ossintiche.

Quindi, deve essere somministrato in soluzione tamponata, normalmente viene somministrato in capsule

rивestite, in maniera tale da passare inalterato a livello gastrico: la capsula si apre a livello duodenale

(intestinale), dove viene assorbito e attraverso il circolo ematico arriva a livello dei canalicoli secretori, dove il pH acido (2-3) lo trasforma nella forma attiva (acido sulfenico e sulfenamide) che può dare la reazione di inibizione irreversibile della pompa protonica. Una dose giornaliera produce un effetto anti-secretorio che dura nei giorni (fino ad una settimana dopo l'interruzione del trattamento), perché finché non si riproduce nuova pompa l'attività è inibita.

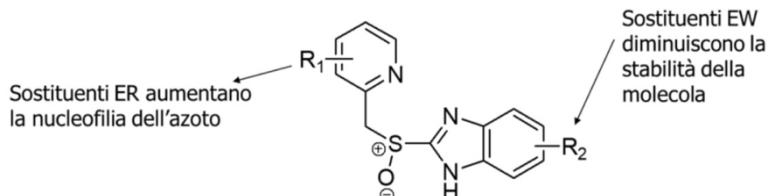
RELAZIONI STRUTTURA-ATTIVITÀ

Le relazioni struttura-attività sono state studiate per vari aspetti, per migliorare l'assorbimento della molecola ma soprattutto per bilanciare gli aspetti di lipofilia e idrofilia della molecola.

Sono state migliorate le caratteristiche di basicità, ai fini della reazione di attivazione; gli studi sono stati rivolti al miglioramento della sua stabilità chimica.

I sostituenti elettron-repulsori aumentano la reattività dell'azoto della piridina, quindi la sua nucleofilia per dare l'attacco a livello dell'imidazolo legato al solfossido; gruppi elettron-atrattori nel benzo-imidazolo ne diminuiscono la stabilità. Quindi, anche sull'anello benzo-imidazolico non si hanno gruppi elettron-atrattori, perché diminuiscono la stabilità della molecola.

Normalmente, si hanno gruppi elettron-donatori sull'anello piridinico; sull'anello benzo-imidazolico si hanno gruppi fluorurati, che aumentano lipofilia e stabilità della molecola. Si può sostituire l'anello benzenico con bioisosteri, ma si ritrova il benzene o il tiofene che mantiene l'attività; la maggior parte dei composti dei composti presenta un anello benzo-imidazolico. Inoltre,



la salificazione in forma di sali di sodio e di magnesio ne aumenta la stabilità chimica.

L'omeprazolo è una molecola chirale e presenta 2 enantiomeri: R-omeprazolo ed S-omeprazolo (=esomeprazolo) in quanto si hanno due enantiomeri per lo zolfo del gruppo solfossido, poiché il quarto gruppo è il doppietto elettronico: non si ha libera interconversione tra le due forme, quindi si hanno i due enantiomeri.

In farmacodinamica non si ha differenziazione nell'interazione tra i due enantiomeri e la pompa protonica, tuttavia in terapia si preferisce utilizzare l'esomeprazolo (enantiomero S). Il motivo per un si utilizza quest'ultimo enantiomero non è legato alla farmacodinamica bensì è un motivo farmacocinetico: l'esomeprazolo ha un'emivita superiore all'omeprazolo perché viene metabolizzato più lentamente.

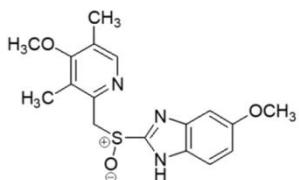
Tali molecole presentando il gruppo solfossido, esso può andare incontro ad ossidazione metabolica (gruppo solfone) oppure a riduzione metabolica (gruppo sulfuro): questa metabolizzazione avviene maggiormente sul solfossido dell'omeprazolo in configurazione R; l'enantiomero R è più facilmente metabolizzabile, mentre l'enantiomero S è più resistente alla metabolizzazione, per questo motivo si preferisce somministrare l'enantiomero puro, ovvero l'esomeprazolo.

Un altro processo metabolico che può subire l'omeprazolo, riguarda l'ossidrilazione dei CH₃ che poi vengono escreti in forma di solfati → la fluorurazione dei gruppi legati aumenta l'emivita dei farmaci perché ne diminuisce il metabolismo di ossidrilazione alchilica.

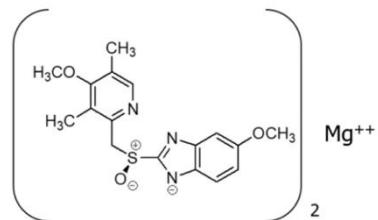
Il brevetto dell'omeprazolo è scaduto nel 2002, mentre le altre molecole derivate presentano un'immissione in commercio relativamente recente.

PRODOTTI IN TERAPIA

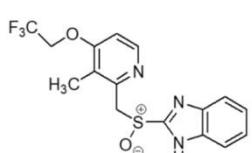
Prodotti in terapia



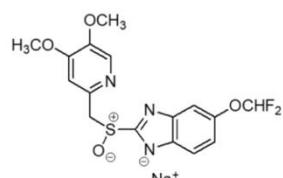
Omeprazolo (*Losec*, 1988)
Brevetto scaduto nel 2002



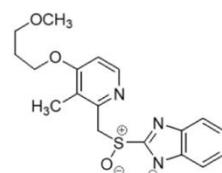
Esomeprazolo [sale di magnesio]
(*Esopral, Nexium*, 2000)



Lansoprazolo
(*Ogast*, 1991)



Pantoprazolo
sale di sodio
(*Pantozol*, 1994)



Rabeprazolo
sale di sodio
(*Rabigen*, 1997)

Il fluoro è un centro in cui si possono avere delle interazioni come accettore di legami a idrogeno: l'aumento di stabilità dipende dal contesto in cui viene studiato e dal target con cui deve interagire, però spesso si inserisce in punti chiave, dove si vuole evitare l'ossidrilazione metabolica, quindi migliora ed aumenta sia l'emivita che la stabilità metabolica.

Alcune molecole sono presenti in forma salificata (sali di sodio o di magnesio); tutte le molecole presentano gruppi elettron-repulsori sui vari anelli.

Un aspetto importante è che, così come l'omeprazolo, anche i suoi derivati sono molecole chirali.

I farmaci più usati dal punto di vista terapeutico sono il pantoprazolo e il lansoprazolo.

Il pantoprazolo viene somministrato in forma di sale sodico: presenta 2 gruppi elettron-repulsori sull'anello piridinico e un gruppo di-fluoro-metossi che aumenta la stabilità a livello del benzo-imidazolo.

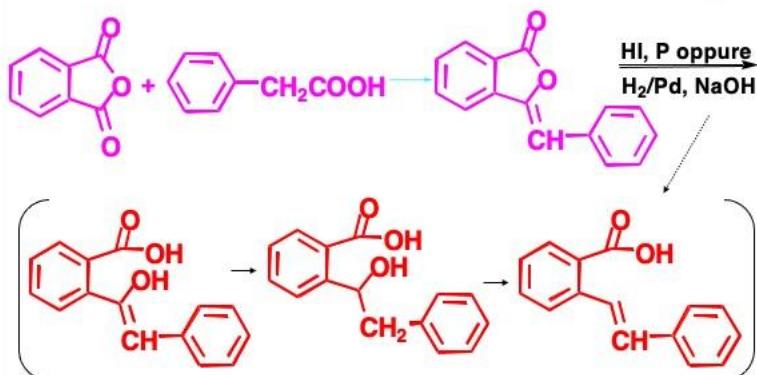
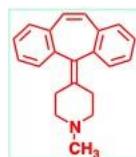
Il lansoprazolo e il rabeprazolo (più recente) sono caratterizzati da sostituenti elettron-repulsori a livello dell'azoto piridinico.

L'esomeprazolo ha configurazione S e viene commercializzato per la sua migliore stabilità in forma di sali di magnesio.

Il derivato fluorurato aumenta la stabilità perché è di piccole dimensioni, quindi simile all'idrogeno, e a livello metabolico protegge dall'ossidrilazione metabolica (anche nei fluoro-chinoloni, il fluoro ha il compito di evitare l'ossidrilazione metabolica che faciliterebbe l'eliminazione della molecola).

Sintesi della ciproeftadina

Antagonisti H₁ Istaminergici (sintesi: ciproeftadina)



La sintesi della ciproeftadina prevede la formazione di un triciclo, un dibenzocicloepotenone che va condensato con N-metilpiperidina. Si parte dall'anidride ftalica, la reazione si fa in ambiente basico, la base è l'acetato di sodio, avviene l'attacco del CH benzilico sul carbonile attivato dell'anidride.

Le anidridi sono le forme più attivate degli acidi carbossilici insieme ai cloruri acilici.

Dall'attacco si ha la formazione di un intermedio prima alcolico, essendo un alcol benzilico per la maggiore stabilità della coniugazione con i due anelli aromatici disidrata e porta alla formazione di un lattone con un gruppo benzilidenico, cioè un doppio legame coniugato.

Il lattone va aperto e le possibilità per questa reazione sono due:

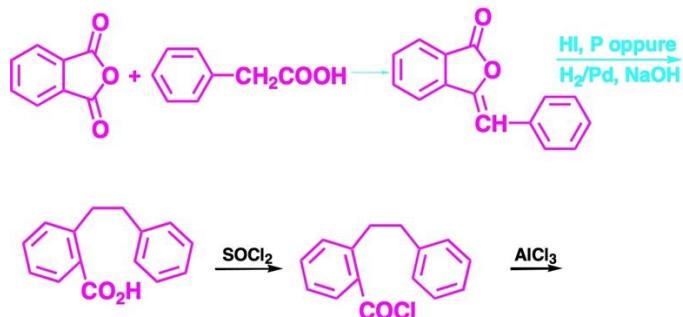
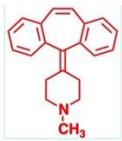
- Ambiente acido, prevede l'uso dell'acido iodidrico
- Ambiente basico, prevede l'uso dell'idrossido di sodio

Oltre ad avere l'ambiente acido, la reazione va svolta in ambiente acido o basico riducente, quando si usa l'ambiente basico si utilizza idrogeno su palladio con l'ambiente acido si usa fosforo rosso.

La reazione è pubblicata con acido iodidrico e fosforo rosso, ora si ha l'idrolisi del lattone, che viene aperto e dal lattone si forma il corrispondente acido carbossilico e alcol.

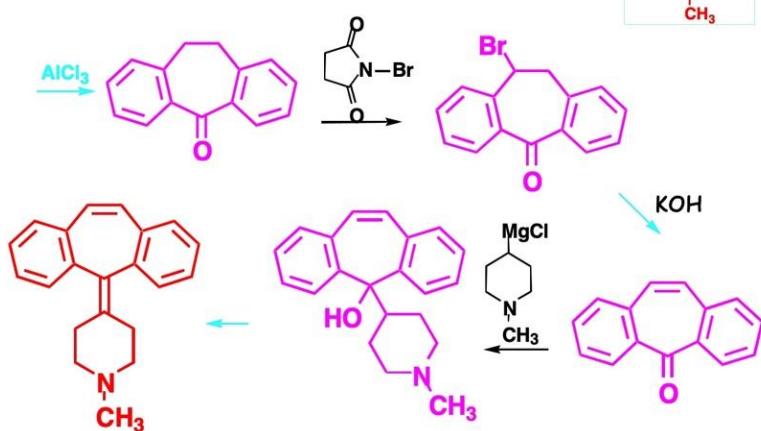
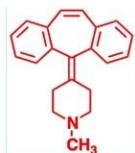
Essendo in ambiente riducente si riduce il doppio legame, quindi si ha sia un gruppo acido, che è un acido carbossilico, sia un alcol benzilico che spontaneamente disidrata, e visto che si è in ambiente riducente alla fine della reazione ho la riduzione anche del doppio legame coniugato con i due anelli e si riduce ottenendo il derivato che è il 2-carbossifenetilbenzene.

**Antagonisti H₁ Istaminergici
(sintesi: ciprozeptadina)**



Adesso si ha la porzione della molecola pronta, il gruppo carbossilico si può attivare come cloruro con il cloruro di tionile, il cloruro acilico con AlCl₃ potrebbe dare Friedel-Crafts, avviene l'attivazione del carbonile e si ottiene lo ione acilonio, che subisce l'attacco dall'anello aromatico, è un acilazione intramolecolare, dalla chiusura dell'anello si ottiene il dibenzosuberone.

**Antagonisti H₁ Istaminergici
(sintesi: ciprozeptadina)**

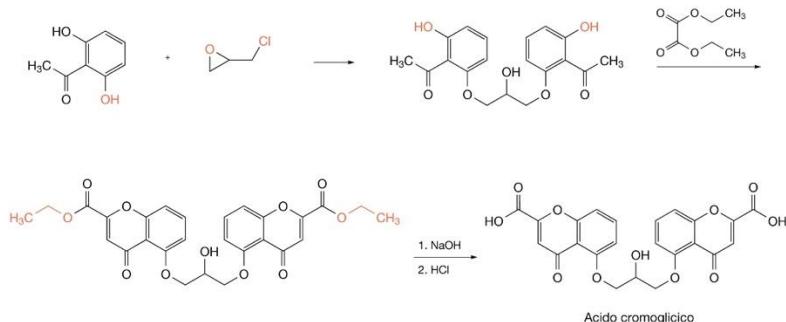


Il dibenzosuberone va deidrogenato ma la deidrogenazione passa per un'altra reazione, in quanto nella molecola c'è un dibenzoepetene poi va legato il gruppo metilpiperidinico.

Per preparare l'anello si fa una bromurazione dell'anello centrale ma non si usa HBr perché c'è il rischio di reazioni collaterali, la miglior bromurazione di un carbonio benzilico si fa con N-bromosuccinimide che mi ferma la bromurazione solo a una delle due posizioni, poi in ambiente basico per KOH, si fa una deidrobromurazione, che porta alla formazione del doppio legame per avere il ciclo dibenzoepetenonico dal dibenzosuberone.

Infine, si ha una reazione di Grignard con N-metilpiperidina magnesio cloruro, ottengo l'intermedio alcolico, il quale è un alcol benzilico terziario che disidrata per dare la forma più stabile a doppi legami coniugati, questa reazione si può spingere un po' in ambiente acido se non va a completezza.

Sintesi dell'acido cromoglicico



BOX 23.3 Sintesi dell'acido cromoglicico (cromolin)

La reazione parte 2,6-diiodosiacetofenone che reagisce con un composto difunzionalizzato, l'epicloridina . La molecola di sodio cromoglicato è simmetrica, contiene due funzioni legate dal ponte etereo con un OH centrale. Quindi per far sì che la reazione avvenga e dare un composto simmetrico si deve avere una disostituzione e questa avviene per attacco sull' alogenuro alchilico.

Avviene un'eterificazione sull' alogenuro alchilico e l'ossigeno può attaccare il carbonio adiacente all'anello epoxidico, quello meno sostituito, da questo doppio attacco si ha la formazione di due gruppi eterei e dall'apertura dell'anello epoxidico si ha la formazione dell'alcol secondario. Si usa 2:1 dal punto di vista della stechiometria perché si deve avere il doppio attacco.

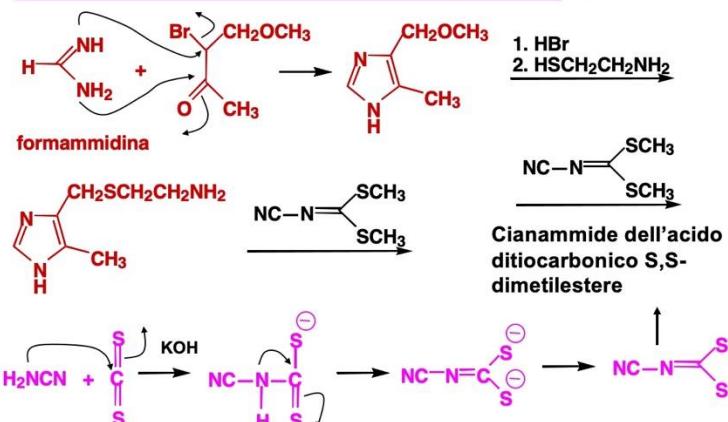
A questo punto si chiude l'anello e si forma l'anello del cromone, la chiusura che avviene in ambiente basico si usa l'estere etilico dell'acido ossalico,cioè il dietilossalato, composto difunzionalizzato.

La reazione si fa in ambiente basico perché si deve strappare l'H del CH₃ adiacente al carbonile, si usa sodio in polvere, che strappa il protone, e si ha l'attacco su uno dei due carbonili e la formazione di un primo intermedio, questo gruppo che è un acetoacetato di etile in ambiente acido chiude formando un primo intermedio che per stabilizzazione disidrata in ambiente acido per formare il doppio legame.

Dopo aver fatto la chiusura dell'anello e aver composto l'anello cromonico rimane la funzione di acido carbossilico esterificato, il farmaco è il sale sodico dell'acido cromoglicico; quindi, il gruppo carbossilico è salificato e con NaOH si idrolizza l'estere e da origine al sale sodico, la reazione avviene da entrambi i lati.

Sintesi cimetidina

Antagonisti H₂ Istaminergici (sintesi: cimetidina)



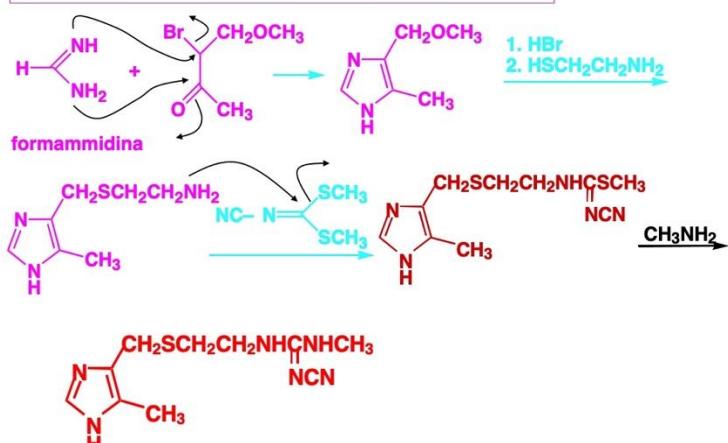
Si parte costruendo l'anello metilimidazolico, per costruirlo con già la catena laterale pronta si parte dalla formammidina e il 3-bromo-4-metossibutanone, si ha un doppio attacco per formare l'imidazolo già sostituito con un CH₃ e il metossimetile.

Dal doppio attacco poi si deve inserire la catena con la cisteamina, cioè inserire l'atomo di zolfo, prima di questo si deve attivare la catena laterale, l'attivazione non si poteva fare prima perché altrimenti ci sarebbe stata competizione con il bromo del 3-bromo-4-metossibutanone.

Quindi con acido bromidrico si ha la demetilazione del metossile e la sostituzione dell'OH con il bromo e si forma l'alogenuro alchilico CH₂Br. Si deve legare la catena e si usa la cisteamina, un composto bifunzionalizzato, se ora devo fare una sostituzione nucleofila devo lavorare a concentrazioni stecchiometriche adeguate e la reazione avviene favorevolmente a carico del tiolo e non del gruppo amminico perché lo zolfo è un miglior nucleofilo rispetto all'N, per cui si forma prevalentemente il derivato amminoetilmetsolfuro.

Si deve legare la catena laterale che è un gruppo metilcianoguanidinico, si prepara il reattivo con la cianoammide, il solfuro di carbonio in ambiente basico per KOH, la quale serve per strappare i protoni legati al gruppo elettronattrattore CN dalla cianoammide, una prima reazione prevede l'attacco dell'N sul C del solfuro, si strappa il secondo protone per ottenere l'intermedio che viene metilato per dare origine a due gruppi uscenti, cioè due tiometili. La metilazione si può fare sia con dimetilsolfato sia con ioduro di metile.

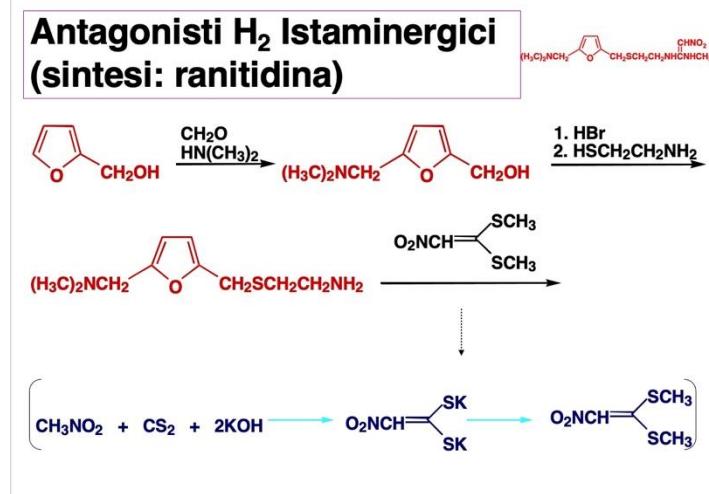
Antagonisti H₂ Istaminergici (sintesi: cimetidina)



Questo reattivo serve per inserire la cianimmina, quindi si devono avere legati a questa due buoni gruppi uscenti che possono reagire con il doppietto dell'N, quindi si ha una prima reazione di attacco del gruppo amminico sul carbonio reso reattivo, si ha un primo attacco con fuoriuscita de gruppo tiometile, si ottiene un

primo intermedio e dovrà reagire con la metilammina, il gruppo amminico della metilammina attacca il C reso reattivo, l'ammina attacca il C esce tiometile e ottengo il gruppo metilamminocianoguanidinico.

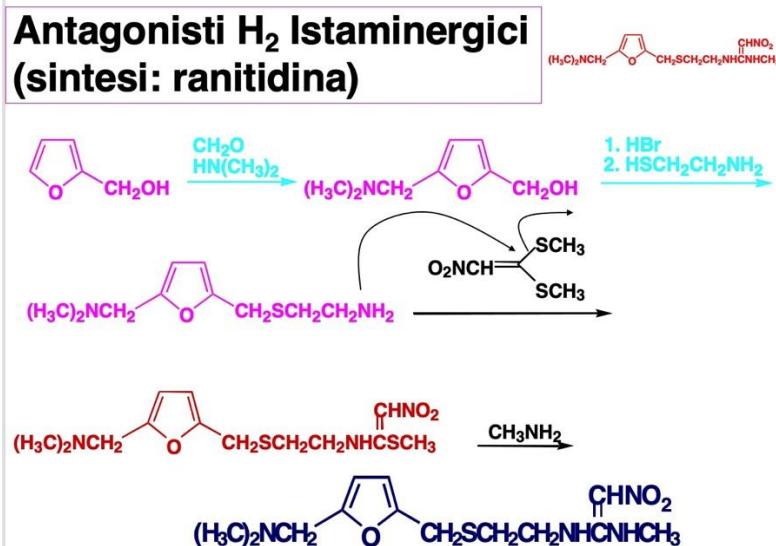
Sintesi della Ranitidina



Si parte dal furano sostituito in posizione 2 da un idrossimetile, cioè con la funzione già pronta per essere attivata per inserire la catena laterale. La prima reazione è una sostituzione elettrolita aromatica che serve per inserire il gruppo dimetilamminometilico in 5, che rappresenta la posizione più attivata perché è adiacente all'ossigeno, in realtà è contemporaneamente una sostituzione elettrofila aromatica e una amminometilazione, ecco perché si fa con aldeide formica e dimetilammina.

L'aldeide formica con la dimetilammina forma lo ione dimetilimminio, che subisce l'attacco dalla posizione 5 dell'anello furanico.

Così si è inserita la porzione dimetilamminometilica, ora si deve attivare l'OH con HBr e si fa legare la catena cisteammina, la reazione prevalente è sul zolfo perché lo zolfo è più nucleofilo dell'N e di conseguenza viene legata la catena amminoetilmetyltiliolica.



Ora va preparato il reattivo caratteristico che è ditiometilnitroetene, c'è un carbonio che deve essere attaccato dal gruppo amminico con due gruppi uscenti ma il reattivo di partenza è il nitrometano. Si fa una reazione con il sulfuro di carbonio in ambiente basico, il quale serve per strappare gli H del nitrometano che sono resi acidi dal gruppo nitro e si ottiene l'intermedio che, è sotto forma di sale, e si deve metilare con ioduro di metile o dimetilsolfato. Il carbonio è reattivo per la presenza del gruppo nitro e dei due tiometili si ha un primo attacco

e fuoriesce tiometile, l'ultima reazione è con metilammina esce il tiometile e si forma la porzione terminale della ranitidina.

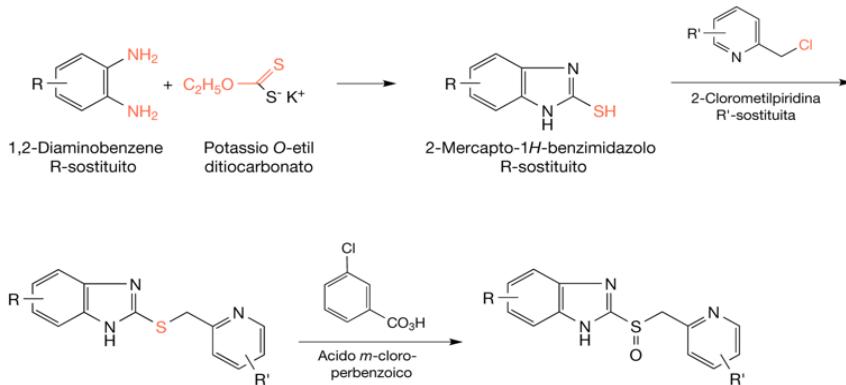
Lezione #20 di Chimica farmaceutica II del 20/11/2023

Docente: Anna Minarini

Sbordinatore: Beniamino Cattuti

Revisore: Francesco Damiano

Sintesi degli inibitori della H⁺/K⁺-ATPasi



Per la preparazione della 2-clorometilpiridina R'-sostituita:



BOX 31.1 Sintesi degli inibitori della H⁺/K⁺-ATPasi

Si tratta di una sintesi generale di omeprazolo e derivati, infatti i gruppi R e R' possono essere modificati in base al derivato che si vuole ottenere. L'omeprazolo è costituito da un anello benzoimidazolico legato attraverso un ponte metilsolfossido ad una piridina sostituita. Si parte dall'1,2-diamminobenzene con l'opportuno sostituente R in base all'inibitore che si sta sintetizzando, è importante a questo punto introdurre la funzione tiolica utile per fare sia la tioeterificazione di Williamson con la corrispondente clorometilpiridina, sia per avere lo zolfo da ossidare a solfossido; perciò uso come secondo reagente il potassio O-etyl ditiocarbonato, ovvero un estere dell'acido ditiocarbonico che ha come gruppi uscenti un etilato e l'acido solfridrico che si libera dalla reazione spostando a destra l'equilibrio; ho quindi il doppio attacco dei due gruppi anilinici del diamminobenzene sul carbonio che porta i due gruppi uscenti del ditiocarbonato in questo modo si ha la chiusura del ciclo 2-mercaptopbenzimidazolico. Si procede con l'eterificazione di Williamson che in questo caso è una tioeterificazione poiché ho un gruppo SH al posto di un OH; si utilizza una 2-clorometilpiridina opportunamente sostituita in base al derivato che si vuole ottenere, la tioeterificazione viene fatta in ambiente basico poiché favorisce la formazione del tiolato. A questo punto bisogna ossidare lo zolfo, ma fermandomi al solfossido, infatti se l'ossidazione proseguisse fino al solfone otterrei un composto inattivo, perciò come agente ossidante si usa l'acido m-cloro-perbenzoico; si ottiene così il prodotto desiderato.

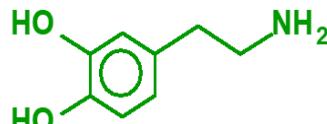
Preparazione della 2-clorometil piridina

La clorometilpiridina va sintetizzata perché non esistono clorometilpiridine sostituite per lo specifico inibitore che voglio ottenere. Per la sintesi si parte da una 2-metilpiridina opportunamente sostituita che ossido sull'azoto con acqua ossigenata ottenendo così la corrispondente piridina N-ossido, si prosegue poi con la trasposizione di Polonovski in cui si utilizza l'anidride acetica per acetilare l'ossigeno della piridina N-ossido,

il gruppo acetossilico poi traspone sul metile esociclico adiacente portando alla formazione del gruppo: $\text{CH}_2\text{OCOCH}_3$, questo perché l'acetossile non sta favorevolmente sull'azoto carico positivamente; il prodotto della trasposizione è quindi una piridina con il gruppo acetossilico sul metile in 2, procedo in ambiente basico per idrolizzare l'estere e formando una 2-idrossimetilpiridina, a questo punto attivo il gruppo OH con SOCl_2 a dare la 2-clorometilpiridina sostituita. Questo tipo di reazione è usata anche nella sintesi dell'oxazepam.

SISTEMA DOPAMINERGICO

La dopamina è la 3,4-didrossifenilmetilammina e rispetto alla noradrenalina non presenta il gruppo ossidrilico in catena laterale. La sintesi della dopamina è stata fatta per la prima volta in laboratorio nel 1910, ma solo negli anni '50 si è capito il suo ruolo di neurotrasmettore e non solo di intermedio della biosintesi della noradrenalina, nel 1979 si è poi arrivati alla classificazione dei recettori dopaminergici sopra riportata. Per i suoi studi sulla dopamina come neurotrasmettore Arvid Carlsson vinse il premio Nobel nel 2000.



Dopamina (DA)
(3,4-didrossifeniletilammina)

Funzioni della dopamina

Le funzioni principali della dopamina si hanno a livello del sistema nervoso centrale, nonostante abbia anche dei ruoli periferici, meno importanti però da un punto di vista farmacologico. La dopamina è un neurotrasmettore, ma anche un neuromormone per il suo ruolo di controllo negativo sul rilascio di prolattina a livello dell'asse ipotalamo-ipofisario, va quindi a diminuire la produzione di prolattina da parte del lobo anteriore dell'ipofisi. A livello del SNC la dopamina è coinvolta nella patologia di Parkinson, infatti uno dei ruoli principali della dopamina è il controllo del movimento, insieme all'acetilcolina; inoltre la dopamina è coinvolta nell'apprendimento, negli stati emozionali, nell'effetto di rinforzo positivo delle droghe che porta all'assuefazione e all'abuso ed è coinvolta anche nell'assunzione di cibo. Dal punto di vista farmacologico si hanno quindi gli agonisti dopaminergici utilizzati nel morbo di Parkinson e nell'iperprolattinemia, mentre gli antagonisti dopaminergici sono utilizzati nel controllo della schizofrenia, si tratta quindi di farmaci antipsicotici che si differenziano strutturalmente dagli antidepressivi visti in precedenza e sono detti neurolettici.

Recettori dopaminergici

Il sistema dopaminergico è caratterizzato da 5 sottotipi recettoriali D1-D5, suddivisi in due gruppi:

-D1-like: D1, D5

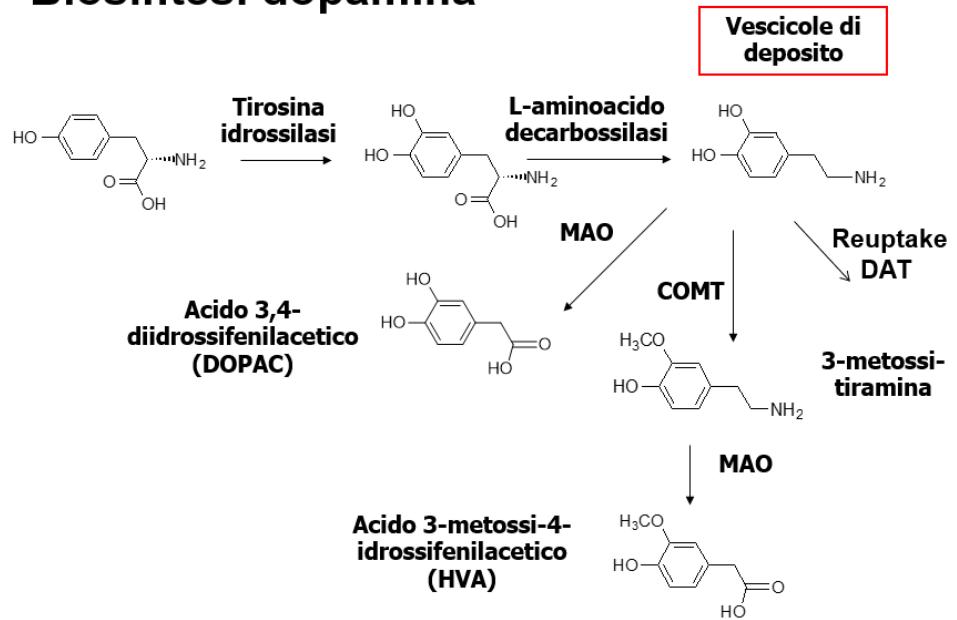
-D2-like: D2, D3, D4

Tutti e 5 i sottotipi sono accoppiati a proteine G, però i D1-like sono prevalentemente accoppiati a proteine Gs che portano ad un aumento del cAMP e a proteine Gq che portano ad un aumento dell'idrolisi del PIP₂, alla mobilitazione del calcio e attivazione della PKC; i recettori D2-like sono invece accoppiati a proteine Gi che causano una diminuzione del cAMP, aumento delle correnti del potassio e diminuzione della mobilitazione del calcio intracellulare. Sia i recettori D1 che i D2 si trovano a livello dello striato e ciò è importante perché i farmaci utilizzati nella terapia del Parkinson che agiscono a livello delle fibre nigro-striatali non sono caratterizzati da selettività nei confronti di questi recettori essendo entrambi presenti.

Biosintesi della dopamina

La sintesi della dopamina è uguale a quella della noradrenalina, ma senza l'ossidrilazione in β della catena laterale. Si parte dalla tirosina che è substrato di una tirosina idrossilasi per formare la levodopa che a sua volta è substrato di una L-dopa decarbossilasi che forma la dopamina, immagazzinata poi nelle vescicole di deposito grazie a specifici trasportatori. Il metabolismo è simile a quello della noradrenalina, infatti la dopamina è degradata dalle MAO a livello del gruppo amminico terminale prima ad aldeide poi ad acido carbossilico in questo caso acido 3,4-diidrossifenilacetico, non si ha selettività della MAO-A o della MAO-B nei confronti della dopamina, però la MAO-B è maggiormente presente a livello delle fibre nigro-striatali quindi metabolizza maggiormente la dopamina, perciò, si parla di più di inibitori di MAO-B. La COMT può metabolizzare la dopamina, in particolare trasforma l'ossidrile in metà a metossile inattivandola, l'intermedio che si forma può essere ulteriormente metabolizzato dalle MAO portando all'acido 3-metossi-4-idrossifenilacetico. Infine, la terminazione dell'azione avviene tramite il reuptake da parte del trasportatore della dopamina (DAT).

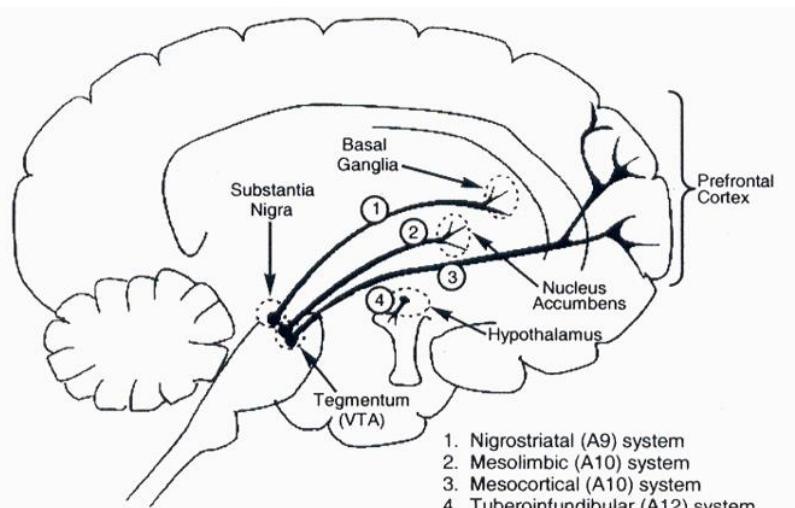
Biosintesi dopamine



Principali vie dopaminergiche centrali

Ci sono molteplici vie a livello del SNC sotto il controllo dopaminergico ed è per questo che la dopamina ha importanti effetti a diversi livelli: per ciò che riguarda stati emotivi e umorali, per il movimento, nella dipendenza da droghe e sul controllo della prolattina. Si hanno 4 principali vie:

1. **Via nigro-striatale:** controlla principalmente il movimento e va dalla substantia nigra ai gangli della base.
2. **Via mesolimbica:** è coinvolta negli stati umorali, infatti ha un ruolo importante nella schizofrenia poiché ne media gli stati positivi, ovvero gli stati di sovraeccitazione, inoltre questa via è coinvolta anche nella assuefazione da droghe d'abuso, va dall'area tegmentale ventrale al nucleus accumbens.
3. **Via mesocorticale:** collega area tegmentale ventrale e corteccia prefrontale, media gli stati negativi della schizofrenia, ovvero stati di apatia e ottundimento.
4. **Via tuberoinfundibolare:** è l'asse ipotalamo-ipofisario, sono quindi fibre dopaminergiche ipotalamiche che controllano il rilascio di dopamina da parte dell'ipofisi.



I recettori D1, D2, D3 sono coinvolti nelle attività motorie e sono quindi i più colpiti nel morbo di Parkinson; I recettori D1 e D2 sono coinvolti negli effetti di farmaci psicostimolanti e quindi nell'assuefazione e nella dipendenza di farmaci d'abuso; nella schizofrenia sono coinvolti principalmente i D2-like, in particolare i D2 e i D4, però se somministro un antagonista D4 selettivo non ottengo l'effetto voluto, non è utile quindi una selettività d'azione, ma è più funzionale un effetto generico sui D2 like, gli antipsicotici di più recente generazione poi coinvolgono il controllo sia del sistema dopaminergico con gli antagonisti D2, sia il sistema serotoninergico con i recettori 5HT2a serotoninergici; per quanto riguarda l'ipofisi sono coinvolti i recettori D2 che se stimolati dalla dopamina portano ad una diminuzione della liberazione di prolattina.

I principali farmaci di questo sistema sono gli agonisti dopaminergici usati nel controllo della patologia di Parkinson, il controllo della via nigro-striatale con agonisti dopaminergici richiede però con il procedere della terapia l'intervento di altre classi di farmaci e quindi oltre agli agonisti diretti sono molto usati anche gli agonisti indiretti come inibitori delle MAO e inibitori delle COMT, sono necessari degli agonisti indiretti poiché sebbene si possa somministrare la levodopa ai malati di Parkinson col tempo è necessario un dosaggio sempre maggiore e la levodopa ha come effetto collaterale allucinazioni, perciò va limitato il dosaggio e quindi agli agonisti dopaminergici diretti vanno associati agonisti dopaminergici indiretti.

Breve digressione in cui fa un ripasso di ciò che ha spiegato nella lezione precedente:

La volta precedente abbiamo visto gli agonisti dopaminergici e le azioni a livello del SNC. La dopamina svolge effetti anche a livello periferico anche se vedremo che sono effetti non sempre di grande importanza ai fini dell'azione dopaminergica.

La dopamina insieme all'acetilcolina sono neurotrasmettitori deputati al controllo delle attività motorie. Nella patologia del Parkinson dove abbiamo un deficit della trasmissione dopaminergica quello che si vede è l'azione eccitatoria dell'acetilcolina che scavalca l'azione inibitoria non più presente che è mediata dalla dopamina. Tutto questo avviene a livello delle vie nigrostriatali che vanno dalla sostanza nigra ai gangli della base.

Un deficit dopaminerico con una neurodegenerazione di queste fibre si manifesta nella malattia di Parkinson e si hanno questi effetti quando si utilizzano i farmaci antipsicotici poiché appartengono alla classe degli antidopaminergici. I tremori caratteristici del Parkinson sono anche gli effetti collaterali che si osservano con l'utilizzo degli antipsicotici che agiscono come antidopaminerici.

Differenza del trattamento del Parkinson quando è:

- **Idiomatico** → qui l'utilizzo di agonisti dopaminergici è quello consigliato rispetto a quello degli anticolinergici, posso intervenire anche sull'altro sistema di controllo di motoneurone
- **Causato dagli effetti collaterali degli antipsicotici** → in questo caso si usano gli anticolinergici (nel primo caso la patologia non è reversibile, nel secondo caso è reversibile con la sospensione della terapia).

I sintomi parkinson simili con l'uso di antipsicotici vengono definiti effetti antipiramidali degli antidopaminerici.

Oltre alla via nigrostriatale abbiamo visto altri due tratti importanti:

- tratto mesolimpico
- tratto mesocorticale

Questi sono correlati ai sintomi positivi e sintomi negativi.

Sintomi negativi

I sintomi negativi riguardano una riduzione della trasmissione dopaminergica a livello delle fibre mesocorticali

Sintomi positivi

I sintomi positivi sono da attribuirsi ad una sovrastimolazione a livello del tratto mesolimpico

Cosa si intende per sintomi negativi e positivi?

- I sintomi negativi portano ad una depressione dell'emotività del paziente quindi perdita di energia, difetti nel linguaggio, mancanza di iniziativa, linguaggio disorganizzato, perdita delle emozioni e socievolezza, tutti sintomi che vanno ad appiattire l'umore del malato.
- I sintomi positivi derivano da un'iperstimolazione del tratto mesolimpico e sono quelli più pericolosi che noi dobbiamo tenere sottocontrollo perché hanno una ricaduta sociale e questa ricaduta va controllata in quanto sono i sintomi alla base dell'aggressività del paziente schizofrenico. Allucinazioni, manie, psicosi, paranoie, linguaggi e comportamenti disorganizzati e aggressività che può sfociare in istinti omicidi.

Queste sintomatologie richiederebbero l'utilizzo di farmaci con azioni diverse:

- I sintomi positivi richiedono un antidopaminerico che da una riduzione dell'iperattività dopaminergica del tratto mesolimpico
- I sintomi negativi sono rappresentati da una riduzione della trasmissione dopaminergica, quindi quando io somministro un antipsicotico, quindi un'antagonista della dopamina ottengo un peggioramento dei sintomi negativi. La ricerca è verso l'ottenimento di molecole con un'azione agonista parziale nei confronti dei recettori che sono localizzati nelle aree della corteccia pre frontale.

→ A livello del SNC (sistema nervoso centrale) la dopamina essendo prodotta a livello dell'ipotalamo va ad interagire con il lobo anteriore dell'ipofisi dando origine ad una diminuzione del rilascio di dopamina
 → A livello del sistema nervoso periferico (SNP) la dopamina pur avendo un centesimo dell'azione dopaminergica, ad elevate concentrazioni può dare origine ad effetti sul sistema cardiocircolatorio.

Dove sono localizzati i recettori dopaminergici a livello periferico?

I recettori dopaminergici a livello periferico sono localizzati:

- nei vasi sanguigni → danno vasodilatazione e modulano il rilascio di NA (noradrenalina)
- a livello delle surrenali → inibiscono la secrezione di aldosterone e modulano quella di adrenalina
- a livello renale → inibiscono il riassorbimento di Na, stimolano la secrezione di renina
- a livello del cuore → sono presenti tutti i recettori (eccetto il D3) le cui funzioni sono per ora sconosciute

Molecola della dopamina +

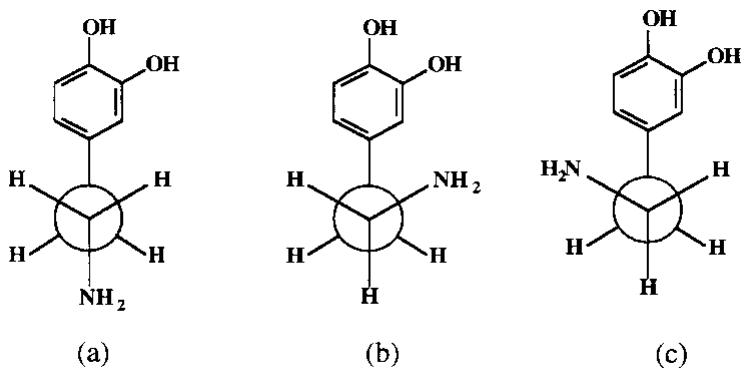
Proprietà

La molecola della dopamina ha l'anello catecolico, questo fa sì che le molecole:

- sono ossidabili ad andrachinoni, quest'ossidazione porta ad una degradazione e inattività della molecola
- sono sensibili alla luce
- hanno un'elevata flessibilità molecolare

Queste caratteristiche in parte sono

dei fattori negativi che servono per avere un buon farmaco. Queste modifiche sono state effettuate per modificare la struttura della dopamina in modo tale da avere molecole con una migliore attività e stabilità dal punto di vista metabolico.



Caratteristiche strutturale

La dopamina si può trovare nella forma trans o gauche. Grazie ad analoghi rigidi presenti in natura si è dedotto che anello aromatico e catena laterale stanno tra di loro in modo coplanare e in conformazione trans, questa conformazione in cui anello aromatico e catena laterale stanno in trans macroplanari viene definita trans beta. Nella conformazione trans beta possiamo trovare due conformeri diversi, due rotameri diversi, nel senso che posso avere due OH del catecolo più vicini nella catena laterale e questo si chiama trans beta rotamero alfa oppure posso avere una situazione in cui i due OH stanno più lontani, quando questi stanno più lontani questo viene detto trans beta rotamero beta

Ci sono analoghi indizi che ci dicono che pur essendo i due rotameri attivi c'è una preferenza del recettore nel rotamero alfa dove i due OH puntano dalla stessa parte nella catena laterale.

Nella forma attiva a livello recettoriale la dopamina interagisce come trans beta rotamero alfa o trans beta rotamero beta? Ci sono numerosi indizi che ci permettono di capire che c'è una preferenza per quello che è il rotamero alfa dove i due OH puntano dalla stessa parte nella catena laterale.

Quali sono i farmaci che agiscono sul sistema dopaminergico?

Oltre agli agonisti e antagonisti studieremo un'ampia classe di molecole che agiscono in maniera indiretta:
 -gli agonisti indiretti sono quelli che stimolano il rilascio di dopamina e inibiscono gli enzimi che la catalizzano



Agonisti

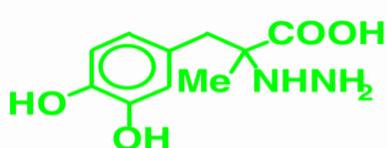
Gli agonisti sono strettamente connessi alla struttura della dopamina o ai suoi bioisosteri. La levodopa è un cofarmaco in quanto deve essere decarbossilata per poter dare il farmaco attivo che è la dopamina.

Perché la posso usare come farmaco e la dopamina no?

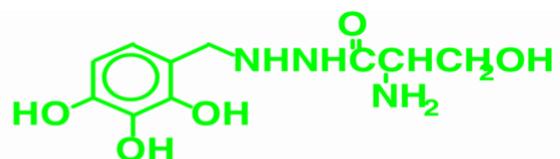
Perché la dopamina non attraversa la barriera ematocefalica, mentre la levodopa si (un AA che si trova in forma Zwitterionica) perché c'è un trasportatore degli L-AA che trasporta gli AA a livello centrale.

La levodopa la devo usare in associazione a molecole come:

-inibitore della dopa decarbossilasi e cioè carbidopa o benzerazide



Carbidopa



Benserazide

Queste due molecole sono idrofile, non attraversano la barriera ematocefalica ma agiscono solo perifericamente. Perché devo somministrare la levo dopa assieme a questo inibitore della dopa decarbossilasi?

1. Primo obiettivo è quello di evitare che la levo dopa venga metabolizzata a dopamina a livello periferico e quindi inibiscono la dopa decarbossilasi solo perifericamente, questo per evitare effetti collaterali. (La dopamina ad alti livelli causa vomito= usati per provocare vomito in caso di intossicazione). I farmaci antidopaminergici hanno un'azione anti emetica.

Prendiamo la molecola della levo dopa non metabolizzata per evitare effetti periferici e impedendo questo metabolismo faccio sì che aumenti la concentrazione a livello centrale. Ha un doppio scopo quest'associazione con carbidopa o benserazide.

Antagonisti

L'altra classe di molecole sono gli antagonisti che vengono usati come antipsicotici e gli antagonisti dopaminergici vengono chiamati anche antipsicotici litici in cui il prototipo è la famosa clorpromazina.

Inibitori delle vie del metabolismo della dopami

Posso agire andando a inibire gli enzimi catecol o metiltrasferasi o gli enzimi mao. La concentrazione maggiore a livello della sostanza nera è quella della MAO b e quindi si cercano inibitori MAO B in modo tale che non abbiano effetti collaterali degli inibitori MAO A. Posso andare anche a modulare la liberazione di dopamina e questo lo posso fare con stimolatori del rilascio di dopamina → uno dei quali è l'amantadina (farmaco antivirale che è anche un'antagonista non competitivo dell'N metil diaspartato. Infatti è analogo alla memantina che abbiamo già visto nei farmaci per il Parkinson).

Devo provocare il Parkinson nell'animale che sperimento. Quali sono le molecole che provocano quest'effetto? Sono varie:

-rotenone ,di solito però si usa la 6-idrossi dopamina

-MPTP (metilfenil tetraidropiridin) → questa molecola possiede un anello tetraidropiridinico, è un agente molto tossico che produce il Parkinson anche nell'uomo.

[è stato scoperto negli anni 60-70' a causa di attività illecite svolte da uno studente di chimica, questo studente a partire dalla MPPP voleva ottenere per acetilazione di questo OH un agente oppiaceo, lo voleva

acetilare, questa somiglia alla molecola che è un derivato della morfina. Nel processo di acetilazione di questo OH lo studente di chimica sapeva che avveniva molto più facilmente usando un ambiente acido poiché si attiva il carbonile per avere l'esterificazione. Succede però che in ambiente acido oltre a formare l'MPTP che è quello che lui voleva ottenere , in ambiente acido da origine a disidratazione e si forma un sottoprodotto chiamato MPP+. Questo da un effetto tossico che causa il Parkinston, il ragazzo morì in poco tempo e nel giro di breve tempo ci furono una ventina di morti che morirono a causa dell'insorgenza di questa malattia (Parkinson) irreversibile]

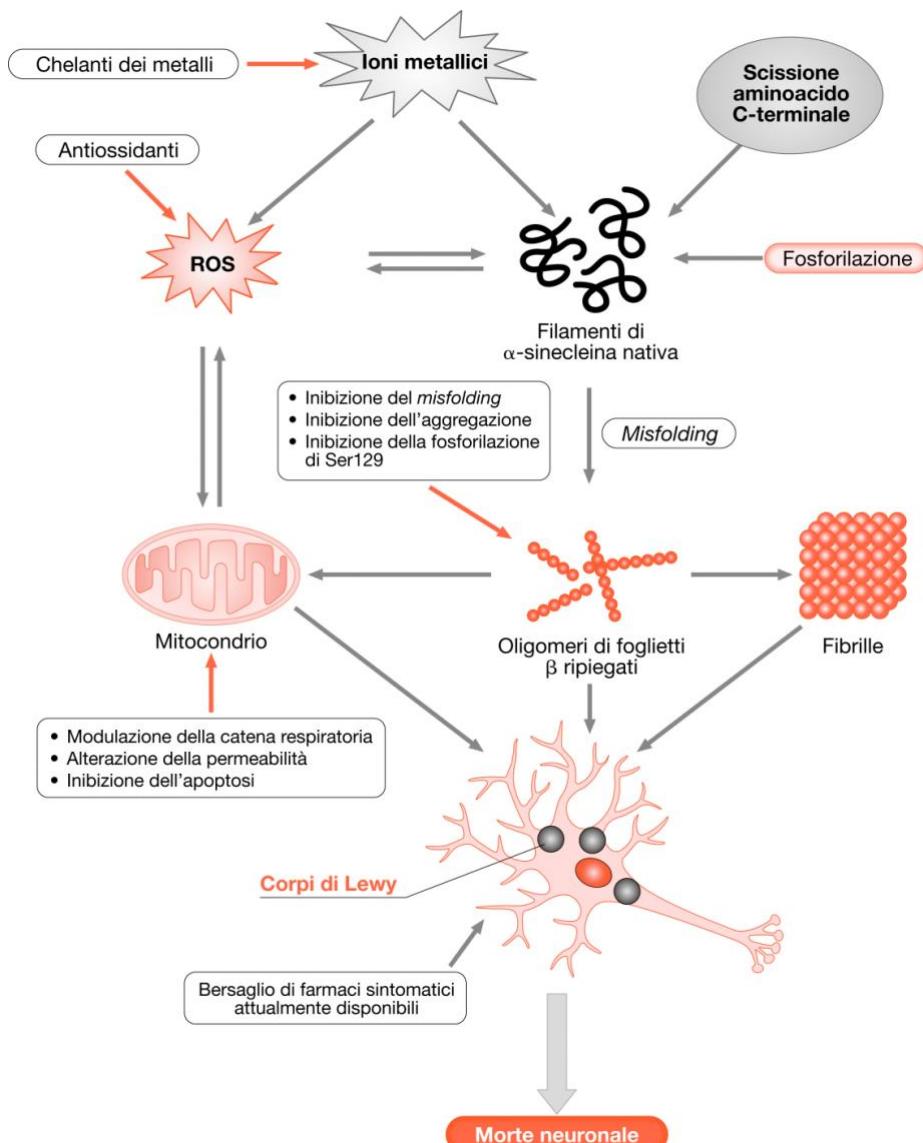
Con le MAO b si ha un'ossidazione dell'anello e la vera sostanza tossica è l'MPP+, questo non attraversa la barriera ematocefalica, ma a livello centrale la MAO b lo trasforma in MPP+. Così è stata scoperta. Questo MPP+ è una delle molecole che si Isa per ridurre il Parkinson.

IL MORBO DI PARKINSON (PARALIS AGITANS, 1817)

La malattia del morbo di Parkinson è una malattia neurodegenerativa cronica che si manifesta in genere dopo i 50 anni. È caratterizzata da tremore degli arti a riposo, bradicinesia e rigidità muscolare. Tale patologia è da imputare alla degenerazione dei neuroni dopaminergici della sostanza nera *pars compacta* (SNpc) dello striato, con conseguente riduzione del livello di dopamina in detta area cerebrale. Il sistema dopaminergico nigrostriatale fa parte del sistema extrapiramidale ed è preposto al controllo muscolare e alla coordinazione motoria.

Un sintomo caratteristico della malattia di Parkinson è l'embulazione, che si manifesta con dei piccoli passettini

Poiché il sistema dopaminergico mesostriatale è parte del sistema extrapiramidale, gli effetti causati dagli antagonisti dopaminergici sono definiti come "effetti extrapiramidali". Quando si manifestano, si parla di "Parkinson da antagonisti", o "Parkinson iatrogeno".



In questa immagine viene illustrata gli eventi patologici che caratterizzano la malattia di Parkinson. Si può notare un accumulo di placche di una proteina chiamata beta-amiloide. La neurodegenerazione è

prevalentemente dovuta all'aggregazione dei corpi di Lewy, formati da un'altra proteina, l'alfa-sinucleina. (Nel lucido, questo è errato).

Come nell'Alzheimer, c'è un'alterazione dovuta all'iperfosforilazione della proteina tau. In questo processo intervengono delle chinasi che fosforilano questa proteina. Questo, insieme ad altri elementi, accelera il processo di oligomerizzazione dell'alfa-sinucleina, che si deposita formando i corpi di Lewy.

Alla base della patologia si osserva un evento di misfolding proteico, accompagnato da una produzione eccessiva di ROS, un'elevata concentrazione di ioni metallici (come osservato nell'Alzheimer) e una disfunzione a livello mitocondriale.

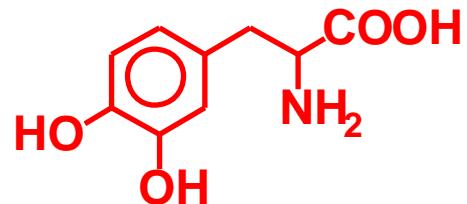
I sintomi si manifestano quando già l'80-90% dei neuroni dopaminergici sono degenerati; quindi, l'apparizione dei sintomi è tardiva rispetto alla degenerazione delle fibre dopaminergiche. La malattia di Parkinson, come altre malattie degenerative, non è reversibile. Tuttavia, in questo caso, si può rallentare la progressione della patologia. La progressione della malattia non porta necessariamente alla demenza, può rimanere una patologia che influisce solo sulle funzioni motorie. Con l'avanzare della patologia, il paziente può arrivare a uno stato in cui può avere problemi di respirazione e deglutizione.

Quando si parla del sistema colinergico, uno degli interventi possibili è quello di diminuire la trasmissione colinergica, in particolare con l'uso di farmaci anticolinergici. Questi sono in grado di attraversare la barriera emato-encefalica, soprattutto grazie alle loro caratteristiche lipofile. Tuttavia, questi non sono più i farmaci utilizzati nel Parkinson idiopatico, ma solo in quello iatrogeno.

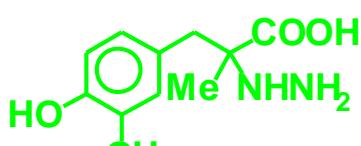
AGONISTI DOPAMINERGICI

Si parlerà adesso di farmaci che agiscono nel Parkinson idiopatico.

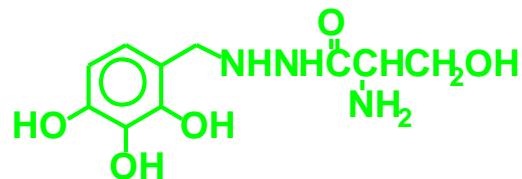
Si è parlato del profarmaco L-DOPA che è un trasportatore dedicato degli L-amminoacidi che permette il passaggio di molecole non lipofili a livello del sistema nervoso centrale



Si è riscontrata l'importanza dell'associazione con carbidopa e benserazide, che permette di portare al cervello una concentrazione adeguata di queste sostanze, evitando così la produzione periferica di dopamina.

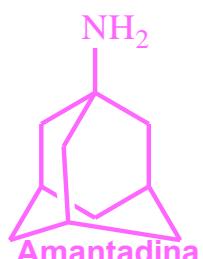


Carbidopa



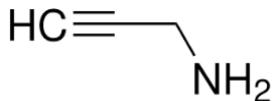
Benserazide

Si è vista inoltre anche come antagonista indiretto che la amantadina che è un facilitatore di rilascio di dopamina, che ha effetti anche sul glutammato.



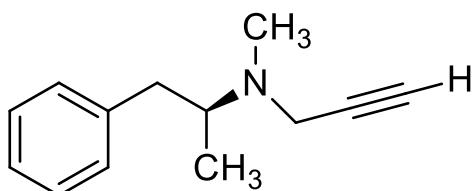
INIBITORI DEL CATABOLISMO (MAO DELLA DA)

Sono i derivati della propargil ammina, sono tutti inibitori irreversibili caratterizzate dal gruppo propargilamminico.



Gli studi di struttura in relazione alla attività hanno condotto che il gruppo propargilamminico sia coinvolto nell'inibizione delle MAO-B, l'isoforma MAO maggiormente presente nel muscolo striato.

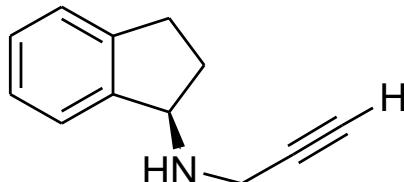
La Selegilina o Deprenil (isomero R) è un inibitore selettivo e irreversibile delle MAO-B, responsabile della degradazione catabolica della DA. E' usato nel Parkinsonismo grave idiopatico (non nei sintomi extrapiramidali indotti da farmaci). Non inibisce il catabolismo periferico delle catecolammine. Normalmente usato in associazione con L-DOPA.



Selegilina

La selegilina è stata modificata per formare un analogo rigido, inserendo il gruppo metilico in catena laterale all'interno di un ciclo a cinque termini. Questo ha portato alla sintesi della rasagilina. Si mantiene sempre la catena propargilamminica, responsabile dell'inibizione irreversibile dell'enzima MAO. Inoltre, c'è sempre la presenza di un centro chirale sia nella molecola aperta che nel ciclo a cinque termini presente nella rasagilina. L'enantiomero attivo è quello R.

La Rasagilina è un altro inibitore irreversibile selettivo delle MAO-B; l'enantiomero R (mesilato) è entrato da poco in terapia con il nome di Azilect. Può essere usato non in associazione.



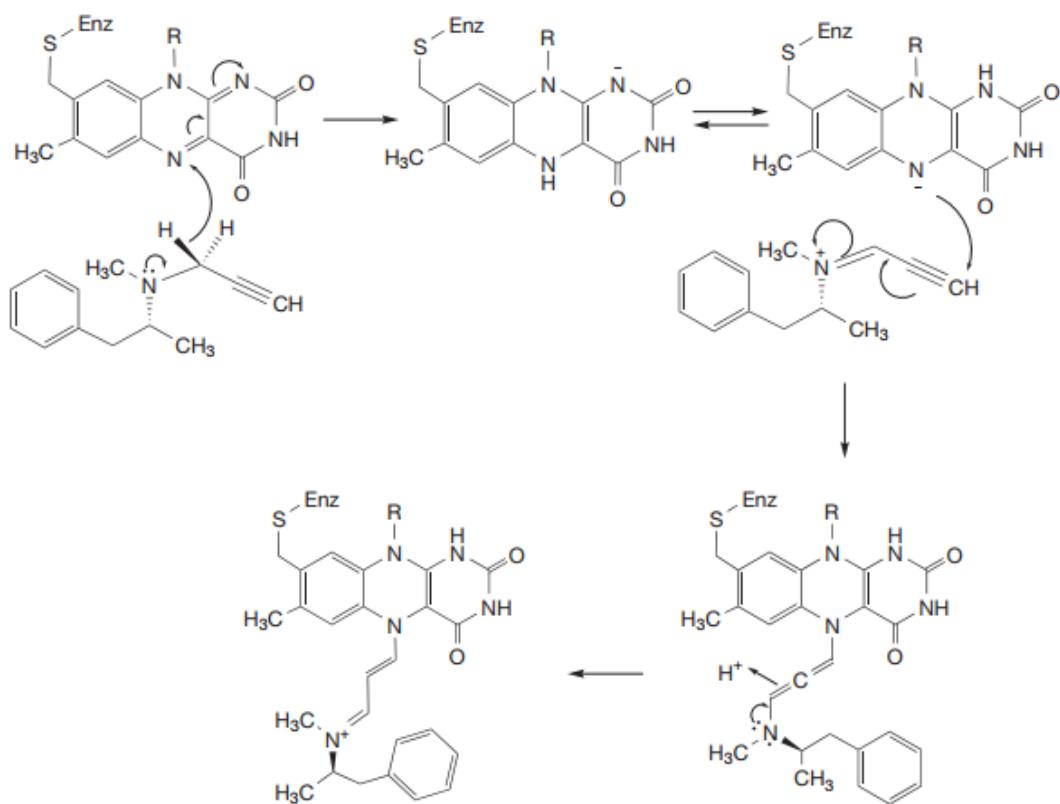
Rosagilina

La struttura propargilamminica è tipica degli inibitori irreversibili delle MAO; tramite questa parte la molecola si lega a uno degli atomi di azoto del FAD stabilendo legami covalenti.

La selegilina viene utilizzata in combinazione con la levodopa e la benserazide, mentre la rasagilina può essere utilizzata anche come monoterapia. La levodopa è il farmaco più efficace, tuttavia si cerca di evitarne l'uso fin dall'inizio del trattamento. Questo perché la levodopa può causare effetti collaterali molto rapidamente, che a volte richiedono l'interruzione della terapia, come le allucinazioni e i movimenti incontrollati osservati nei pazienti.

FUNZIONAMENTO BIOLOGICO

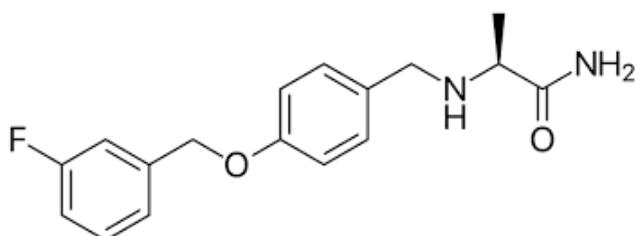
La MAO è un enzima ossidoriduttivo che degrada in maniera ossidativa il terminale amminico di queste ammine biogene, un processo coordinato dal cofattore FAD. Il FAD è coinvolto nell'inibizione irreversibile della MAO. Questa inibizione avviene attraverso la formazione di un addotto covalente, risultato dell'attacco dell'azoto dell'anello centrale del FAD. Il FAD è legato alla restante molecola attraverso un legame con lo zolfo. L'attacco sul triplo legame sul carbonio terminale porta alla formazione dell'addotto con due legami coniugati. Questo addotto irreversibile blocca l'azione dei cofattori che normalmente svolgono la reazione di ossidoriduzione.



Oltre agli inibitori del catabolismo irreversibili, esistono anche inibitori reversibili.

INIBITORI REVERSIBILI DEL CATABOLISMO (MAO DELLE DA)

La molecola della safinamide è un inibitore reversibile selettivo nei confronti della MAO-B.



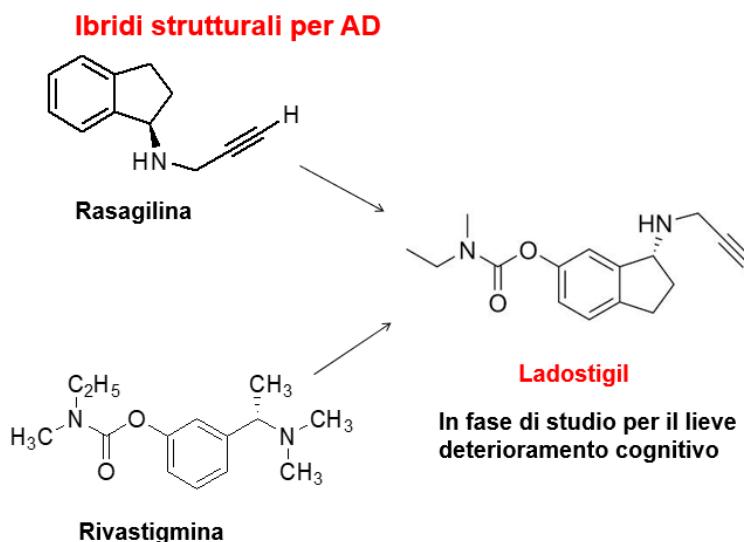
Inizialmente, questo farmaco è stato commercializzato solo in alcuni paesi dell'Unione Europea, ma oggi viene utilizzato anche in Italia. La porzione terminale della molecola è un'ammina, non ha una struttura analoga ai derivati propargilamminici.

Questa molecola non ha solo un'azione inibitoria nei confronti della MAO, ma agisce anche sul glutammato. Questo sembra avere un ruolo importante, in quanto riduce la neurotoxicità glutammatergica, che è principalmente regolata dall'ingresso degli ioni calcio attraverso il canale NMDA. Funziona anche sui canali del sodio dipendenti dal voltaggio.

Come descritto nel foglietto illustrativo, allevia non solo i disturbi motori, ma anche quelli associati alla patologia. Risulta utile quando si presentano problemi umorali e sembra anche controllare questi problemi, oltre a quelli motori.

Nel periodo attuale, un ricercatore australiano di nome New Zen sta conducendo un'innovativa ibridazione strutturale. Questo processo coinvolge la rasagilina e una molecola della rivastigmina, un inibitore dell'acetilcolinesterasi. In sostanza, il gruppo di ricerca ha preservato la parte fondamentale della rivastigmina e l'ha combinata con la porzione formacil ammidica della rasagilina.

Questa ibridazione ha portato alla creazione del ladostigil, che ha dimostrato un notevole potenziamento cognitivo e una riduzione della neurodegenerazione sia nei pazienti affetti da Alzheimer che in quelli affetti da Parkinson.

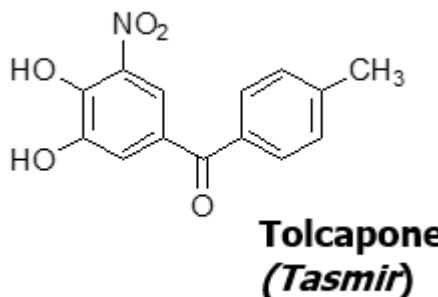


INIBITORI DEL CATABOLISMO (COMT) DELLA DA

Quando si discute di inibitori del metabolismo della dopamina, si fa riferimento anche all'enzima catecol-O-metiltransferasi (COMT). Le molecole che presentano un gruppo catecolico sostituito, in questo caso con un gruppo nitro attrattore di elettroni, sono farmacofori presenti in molecole che esercitano un'azione inibitoria sulle catecolmetiltransferasi. Questa molecola diventa il substrato dell'enzima al posto della dopamina.

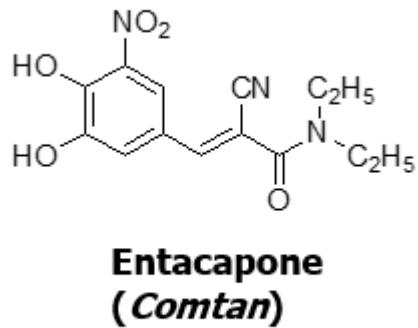
Le due molecole che sono entrambi in terapia:

1. Il Tolcapone è un inibitore reversibile della COMT anche a livello centrale. È stato prima sospeso per gli effetti hepatotossici e ora il suo uso è subordinato a un rigoroso monitoraggio della funzionalità epatica



2. Entacapone è un inibitore reversibile da poco introdotto in associazione a L-DOPA + benserazide o L-DOPA + carbidopa.

Questa è una struttura molto rigida in particolare questa molecola ha minori effetti collaterali della prima a livello epatico.



AGONISTI DIRETTI

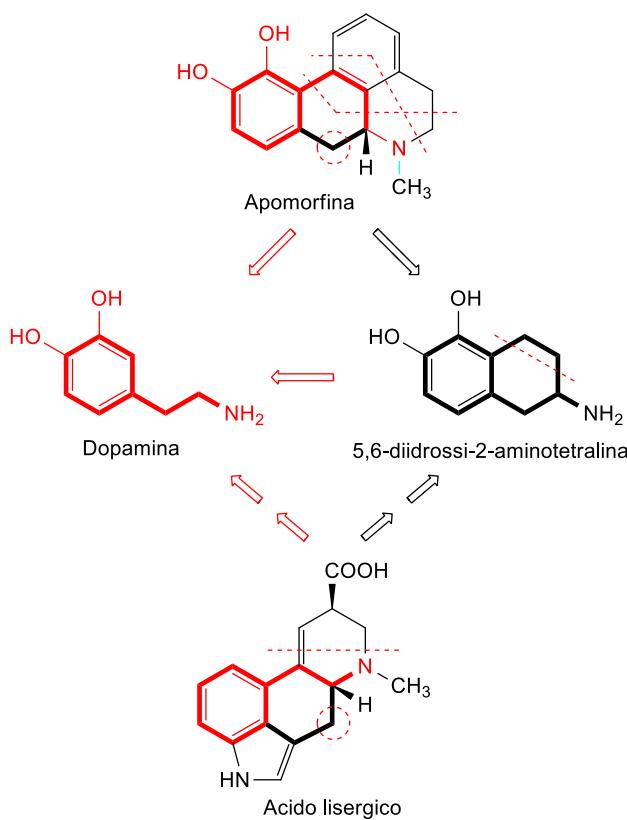
Sono strettamente correlate alla struttura della dopamina, rappresentate da molte classi tutte interconnesse tra loro. Queste, l'una rispetto all'altra, rappresentano o l'analogico semplificato o l'analogico rigido. Ad esempio, le aporfine (il cui prototipo è la morfina) rappresentano l'analogico rigido delle amminotetraline, che a loro volta sono gli analoghi rigidi della dopamina. Le fenetilammime sono molecole semplificate rispetto alle amminotetraline e rappresentano una semplificazione molecolare delle aporfine.

Agonisti diretti



- **feniletilammime**
- **3-fenilpiperidine**
- **2-amminotetraline**
- **aporfine**
- **ottaidrobenzochinoline e ottaidrobenzoisochinoline**
- **derivati dell'ergot**

Per definire meglio le strutture che sono importanti per avere un'azione dopaminergica, è stata di grande aiuto la natura. Un esempio è l'apomorfina, una molecola naturale costituita da 4 cicli, che rappresenta l'analogico rigido delle amminotetraline.

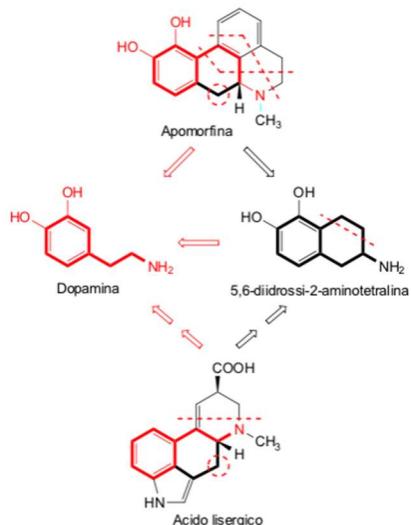


Queste molecole derivano da una semplificazione dell'apomorfina e sono un analogo rigido della dopamina. Nelle tetrammine, si ha l'anello catecolico.

La natura ha fornito un altro aspetto importante: un altro analogo strutturale che ha anche un'azione antidopaminergica è l'acido lisergico, in cui si ritrovano sia le amminotetraline che la dopamina, ma mancano gli ossidrili.

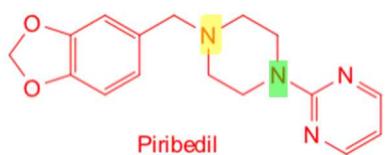
Questo ha fatto capire che non è importante l'intero anello catecolico, ma basta semplicemente un OH. L'OH importante è quello in posizione beta rispetto alla catena laterale. Un altro aspetto importante è che il fenolo residuo può essere sostituito tramite una sostituzione bioisosterica con un indolo. Questo perché l'NH dell'indolo si trova esattamente in posizione beta rispetto alla catena laterale, e quindi questo OH mima la posizione dell'OH. Questo fenomeno è noto come **"bioisosterismo indolo fenolo"**

Correlazione strutturale tra le varie classi di agonisti dopaminergici di origine naturale e sintetica



Nella lezione precedente si era iniziato a parlare delle caratteristiche strutturali dei vari derivati dopaminergici risultanti sia da complicazioni strutturali che da semplificazioni molecolari.

Tutte le strutture che verranno viste da qui in avanti sono strettamente legate alla struttura della dopamina tramite modificazioni molecolari che tendono però sempre a mantenere la catena laterale coplanare all'anello catecolico, queste strutture sono sia di origine naturale come i derivati dell'acido lisergico sia di sintesi. In questo panorama l'unica molecola che ha un'azione dopaminergica ma non solo perché è anche un antagonista alpha-adrenergico è il **PIRIBEDIL**.



Il piribedil ha un anello **benzodiossolanico**, questa struttura si trova anche nei derivati adrenergici e deriva dall'irrigidimento dei due catecoli, in cui gli OH sono stati inseriti in un ciclo.

È un **agonista dei recettori b2 e b3 dopaminergici** ed è usato anche nel controllo del Parkinson.

Ha una struttura diversa da quelle vedremo successivamente ed è caratterizzata da una **piperazina congiunta con anello pimiridinico**.

È una struttura diversa perché la distanza tra l'N in catena laterale, che normalmente è di due termini infatti si trova solitamente un etile, mentre nel piribedil c'è solo un **metilene** che separa l'anello aromatico dalla catena laterale dove però sono presenti due azoti: N alchilico che funge da azoto basico analogo a quello della dopamina, mentre l'altro N è molto meno basico in quanto ha caratteristiche di azoto anilinico essendo legato a un anello pirimidinico.

Feniletilammime

La dopamina è il prototipo delle feniletilenammine e non può essere usata come farmaco, infatti, per avere un aumento della concentrazione della dopamina bisogna ricorrere alla levodopa che ha un trasportatore che la porta a livello del SNC, mentre le ammine biogene non hanno un trasportatore e quindi non sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica.

È instabile perché si ha sia l'anello catecolico soggetto a metilazione a carico delle COMPT e in più è facilmente ossidabile, sia perché presenta la catena laterale amminica che è degradata tramite le MAO.

Inoltre per quanto riguarda la sua flessibilità molecolare la catena laterale può assumere varie conformazioni di cui nella trans beta rotamero alpha e beta sono quelle in cui risiede l'attività biologica, l'irrigidimento della catena laterale che porta a una sola conformazione è favorevole per avere azione dopaminergica.

Alcune caratteristiche, visibili nelle SAR, non sono sovrapponibili a quelle della noradrenalina perché devono agire su due sistemi recettoriali diversi.

SAR Feniletilammime

Agonisti dopaminergici (feniletilammime: SAR)

Il catecolo non è essenziale per l'attività: l'ossidrile in 4 può essere rimosso

La sostituzione di H con alchili è positiva, in particolare con gruppi n-propilici. Può essere sostituito con un gruppo solfonio $\text{S}+(\text{CH}_3)_2$. Senza perdita di attività.

L'introduzione di sostituenti è negativa per l'affinità



Ropinirol

o

La cosa più importante è che **non è indispensabile l'anello catecolico** ma è fondamentale che rimanga almeno uno dei due **OH** e in particolare è fondamentale che rimanga quello **in meta'**.

Si può trasformare il catecolo in **anello fenolico** per eliminazione dell'OH in para. Il fenolo a sua volta può essere sostituito, attraverso una sostituzione bioisosterica con un **indolo**, per cui si parla di bioisosterismo indolo fenolo.

Per quanto riguarda la catena laterale il gruppo amminico va sostituito, è favorevole sia la **monosostituzione** che la **disostituzione** e si possono inserire gruppi alchilici e il gruppo in cui risiede la migliore attività dopaminergica è il **gruppo normal- propile** (da non confondere con l'isopropile che abbiamo visto nel sistema adrenergico). Si può inserire un normal-propile o ancora più favorevolmente si può sostituire con due quindi, spesso in questi derivati dopaminergici si trova l'azoto terziario con una disostituzione con normal-propile.

Il gruppo amminico è il centro di protonazione della molecola quindi in quella posizione si deve avere la possibilità di avere una carica positiva è importante chiedersi se è rilevante avere una carica positiva permanente, ovviamente sono stati fatti studi su questo e hanno condotto al fatto che non è importante avere una carica positiva permanente perché queste molecole devono attraversare la barriera ematoencefalica quindi una carica positiva permanente sarebbe un ostacolo.

Sono stati svolti degli studi di quaternarizzazione dell'atomo di azoto e si è visto che quando si va a quaternizzare l'atomo di azoto l'attività sui recettori dopaminergici diminuisce. C'è anche da dire che quando viene quaternizzato un azoto non solo inserisco una carica ma si inserisce anche un ingombro sterico su N, perché ci sono quattro gruppi alchilici legati, quindi per vedere se la diminuzione dell'attività è dovuta alla presenza della carica positiva o all'aumento del volume della carica positiva, si usa il sale di solfonio che prevede sostituzione di N con zolfo: in questo caso si ha la carica positiva permanente con due soli sostituenti e si è visto che nel sale di solfonio l'attività rimane.

Pertanto è evidente che non è la carica positiva il problema ma è più un effetto di aumento della nube carica positivamente che si osserva nel gruppo amminico quaternario.

Per quanto riguarda la catena laterale nella porzione etilica si vede che se viene messo un gruppo anche piccolo (etile o metile) si osserva una diminuzione dell'attività (questo non succede nel sistema adrenergico- in cui l'attività veniva conservata).

Da queste prime SAR è derivato un farmaco ampiamente usato nel Parkinson, il **ROPINIROLO**, in cui sono conservate tutte le caratteristiche viste fin ora.

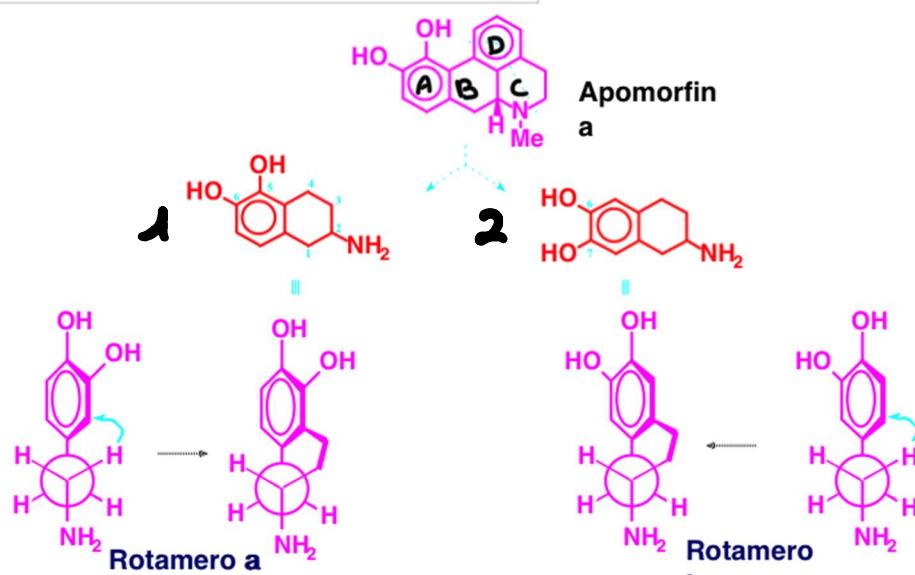
Ovvero si è sostituito all'anello catecolico un anello indolico, in realtà in questo caso si è visto che la migliore attività non risiedeva in un anello indolico, ma indolinonico, cioè il secondo anello che porta l'NH che dà il legame a H con il recettore contiene un gruppo carbonilico.

In questo modo si ottiene una molecola che è un lattame, è più stabile dal punto di vista farmacocinetico e migliora attività a livello centrale.

Inoltre la catena laterale non è sostituita e l'N terminale ha 2 normal-propili.

SAR 2-amminotetraline

Agonisti dopaminergici (2-amminotetraline: SAR)



La classe delle amminotetraline rappresenta l'anello di giunzione tra le feniletilamine e le molecole più complesse, quali le ergoline e l'apomorfina che sono molecole naturali.

Quindi si può dire che le amminotetraline siano delle complicazioni molecolari della dopamina e delle semplificazioni molecolari dell'apomorfina.

L'apomorfina ha 4 cicli, in essa si ritrova la struttura della dopamina: catena laterale etilica e anello catecolico, anche in questo caso è conservato il concetto che la catena laterale deve essere complanare all'anello catecolico.

Gli anelli vengono numerati A B C e D, se si eliminano gli anelli C e D rimangono A e B e il gruppo amminico terziario ed è quello che si è fatto per ottenere le amminotetraline.

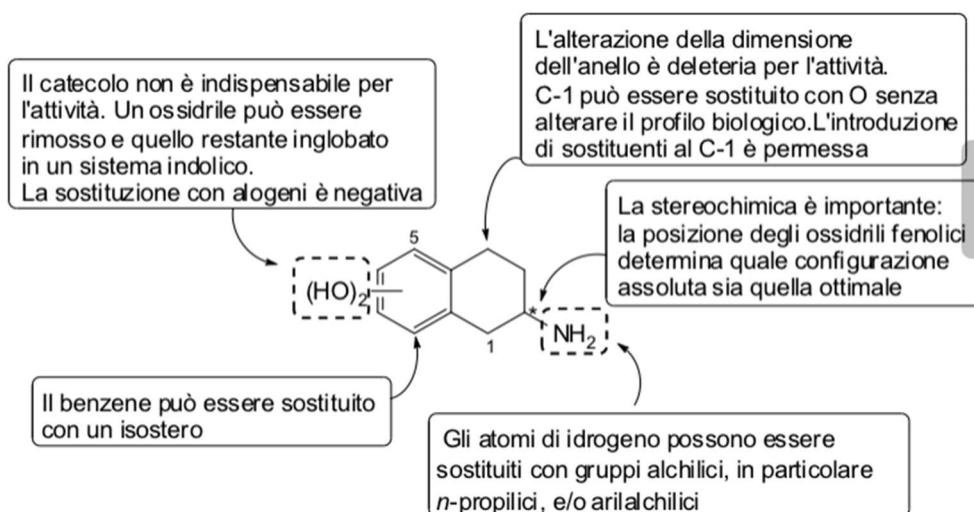
Ammino deriva dalla presenza in posizione 2 ho un gruppo amminico.

Partendo dall'apomorfina si possono ottenere due tetraline diverse : la **5-6-didrossiamminotetralina(1)** che sarebbe l'irrigidimento strutturale della configurazione trans beta rotamero alpha della dopamina dove i due gruppi OH sono più vicini alla catena laterale oppure le **6-7-didrossiamminotetraline (2)** dove i due gruppi OH puntano dalla parte opposta del gruppo amminico e in questo caso si parla di rotamero beta della configurazione trans beta della dopamina.

Quindi andando a irrigidire la struttura si presentano due entità separate cioè le 5-6-didrossiamminotetralina e le 6-7 diidrossiamminotetraline.

Facendo questo si è inserito uno stereo centro e mentre per le 5-6-didrossiamminotetraline la configurazione attiva è la S nelle 6-7-didrossiamminotetraline la configurazione è la R (successivamente ne vediamo il motivo).

SAR amminotetraline



Non è importante il catecolo ovvero, in analogia a quanto detto precedentemente, l'OH importante è solo uno ed è quello in meta e corrisponde all'OH in 5 nelle 5-6-diidrossiamminotetraline e all'OH in 7 nelle 6-7-diidrossiamminotetraline.

Quello che si può eliminare è quello in 6 che rappresenta quello in para, che non è importante neanche nella dopamina.

Quindi in scala il 5-OH funziona meglio del 7-OH che funziona meglio del 6-OH. Il fatto che il 5-OH sia migliore del 7-OH fa presupporre che nel caso specifico delle amminotetraline le 5-6-diidrossiamminotetraline sono più da attive delle 6-7-diidrossiamminotetraline, e questo fa dedurre anche, riferendoci alla dopamina, che la configurazione trans beta rotamero alfa è quella migliore per l'interazione con il recettore.

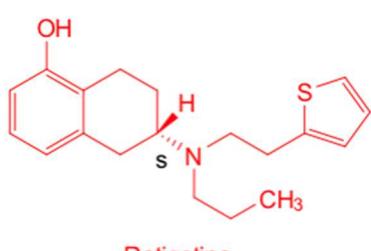
Analogamente a quanto detto in precedenza l'OH può essere inserito in un ciclo indolico quindi anche in questo caso funziona la bioisosteria indolo fenolo come visto nel propinirolo.

Anche in questo caso l'NH dell'indolo deve essere corrispondente all'OH in meta. Il fatto che possa essere sostituito con l'anello indolico fa capire che possano essere usati dei bioisosteri, l'importante è che si abbia in corrispondenza dell'OH in 5 un gruppo in grado di fare legami a H come l'anello indolico.

Analogamente a quanto visto prima il gruppo amminico può essere sostituito da 1 o 2 normal-propili e il normal-propile può terminare anche con un anello aromatico, quindi sono tollerati anche gruppi arilalchilici. Per quanto riguarda la stereochimica, il gruppo NH₂ fa sì che il C in 2 diventi un centro chirale e come già detto in precedenza la posizione dei 2 ossidrili fa sì che l'enantiomero attivo è l'S nelle 5-6-diidrossiamminotetraline e R nelle 6-7-diidrossiamminotetraline.

Poi si ha un altro anello e la modificaione delle sue dimensioni (ovvero il portare l'anello a 5 o 7 termini) è deleteria perché si distorce la distanza ottimale tra gruppo amminico e anello aromatico.

Da queste SAR si è ottenuto un farmaco chiamato **ROTIGOTINA**



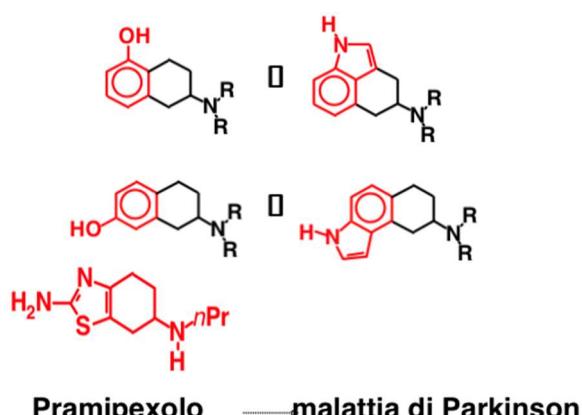
È un derivato delle 5,6-didrossiamminotetraline in particolare OH in 6 non è importante quindi è un derivato delle 5-idrossiamminotetraline.

La configurazione attiva delle 5-idrossitetraline è la S, quindi il farmaco è di conseguenza in configurazione S.

Come già detto l'N può essere sostituito da piccole catene di solito normal-propile o un altro sostituente può essere un arilalchile e infatti è un etiltiolfene. Questa molecola ha un grande vantaggio rispetto alle altre molecole usate nel Parkinson perché ha un'ottima permeabilità nel derma quindi può essere usata in cerotti che permettono l'assorbimento del farmaco per via transdermica e evitano somministrazioni quotidiane del farmaco.

Il farmaco come tale è caratterizzato da un assorbimento ottimale che può essere migliorato con sostituzione dell'etiltiolfene al propile.

Bioisosterismo indolo-fenolo



Si è detto che i migliori sono i derivati 5-didrossiamminotetralinici e che questi possono essere come nel caso della dopamina sostituiti da un anello indolico a patto che l'NH dell'indolo corrisponda nella struttura all'OH fenolico in meta' rispetto alla catena laterale.

Queste strutture sono entrambe attive nei confronti del sistema dopaminergico ma nell'analogo delle 5-didrossiamminotetraline la configurazione attiva è la S, mentre per quanto riguarda l'analogo delle 7-didrossiamminotetraline la configurazione attiva è la R.

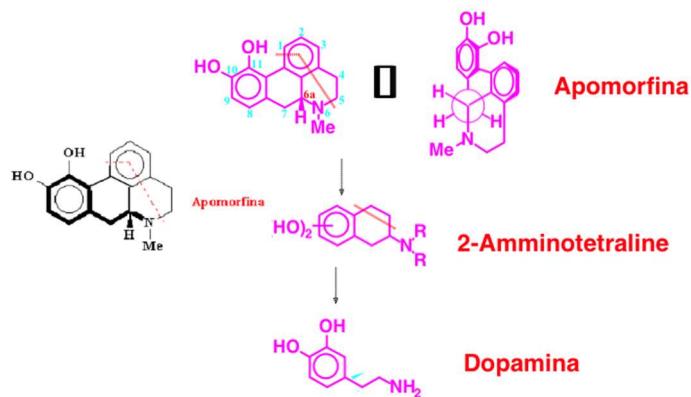
Oltre all'anello indolico sono stati studiati altri anelli bioisosterici e ciò che ne è scaturito dal bioisosterismo

indolo-fenolo è la molecola del **PRAMIPEXOLO** dove non è più presente l'anello amminotetralinico ma al fenolo dell'anello amminotetralinico è stato sostituito un bioisostero ovvero un amminotiazolo, come sempre in questa posizione si presentano dei gruppi che possono dare legami a H con il recettore e la sostituzione dell'N con uno o due normal-propile, nel caso del pramipexolo con un solo normal-propile.

Anche il pramipexolo è considerato un derivato amminotetralinico per bioisosterismo fenolo-amminotiazolo ed è usato come farmaco nel Parkinson.

Aporfine sar

Agonisti dopaminergici (aporfine: SAR)



L'apomorfina è un composto di origine naturale, ha un'azione fortemente dopamienrgica, ma non è un farmaco di prima scelta nel Parkinson, anche perché esattamente come la dopamina provoca **emesi** pertanto il dosaggio deve essere estremamente controllato.

Infatti l'apomorfina si usa, ad alte concentrazioni, in caso di intossicazioni da ingestione di sostanze tossiche per provare il vomito.

Nella molecola dell'apomorfina si trova la dopamina, la catena laterale è coplanare per la presenza dei cicli, la cui numerazione cambia, si parte dall'anello aromatico quindi i due ossidrili sono l'11 (che corrisponde al 5 delle 5-6-diidrossiamminotetraline) e il 10 (corrisponde al 6).

Anche qui ho un centro chirale in C 6a che dovrebbe essere in configurazione S ma è in R per le regole di priorità dei gruppi legati al C chirale.

SAR apomorfina

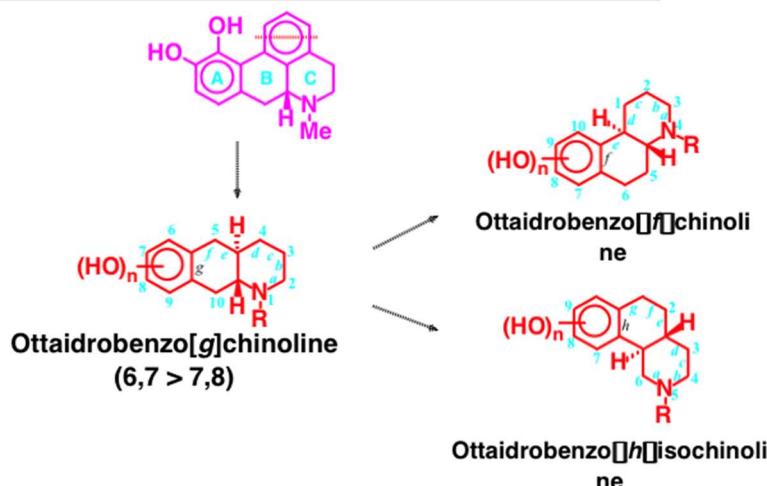
Analogamente a quanto detto finora l'apomorfina che rientra nella classe delle aporfine, ha le stesse SAR: l'OH più importante è quello in 11, quello in 10 può essere rimosso e rimane l'attività, il gruppo in 11 corrisponde a quello in 5 delle amminotetraline e a quello in metà della dopamina, sull'N è già presente un metile, analogamente agli altri derivati si può mettere un propile per migliorare l'attività.

Anche in questo caso il bioisosterismo funziona, l'anello A può essere sostituito da bioisosteri in particolare può essere sostituito con un anello del pirazolo in cui X è un N oppure con uno pirrolico. L'importante è che ci sia questo NH sull'anello A, quindi pirazolo e Pirrolo mantengono l'attività.

La configurazione del centro chirale è R per le regole di priorità.

Ottaidrobenzo(iso)chinoline

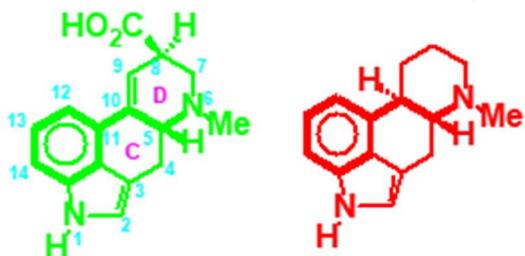
Agonisti dopaminergici (ottaidrobenzo(iso)chinoline: SAR)



Le ottaidrobenzo(iso)chinoline non sono dei farmaci, ma è evidente che partendo dalla molecola dell'apomorfina se viene eliminata solo D ottengo le ottaidrobenzo(iso)chinoline che sono attive anche in questa forma perché anche in questo caso ho la catena laterale che mima esattamente la catena laterale della dopamina, ovviamente a seconda di dove è posizionato l'N rispetto all'anello che porta gli OH cambia la posizione ottimale degli OH sostituiti perché OH deve stare sempre in beta rispetto alla catena laterale.

Derivati dell'ergot SAR

L'ultima classe di agonisti del sistema dopaminergico che viene vista ha origine naturale e presentano nella loro struttura l'**anello indolico**, per cui conservano l'attività dopaminergica essendo dei **bioisosteri indolofenolo** ed hanno il gruppo amminico alla giusta distanza dall'anello aromatico, così all'interno della loro struttura si evidenzia la molecola della dopamina.



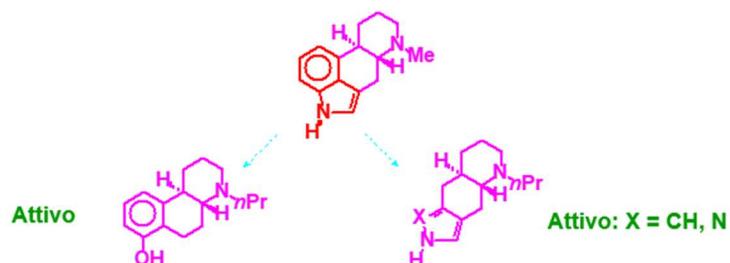
In verde troviamo la molecola dell'acido lisergico che è alla base dei derivati dell'ergot, mentre la molecola in rosso è l'ergolina. In grassetto in entrambe le strutture è evidenziata la molecola della dopamina.

In parte sono già stati visti i derivati dell'ergot in altri sistemi recettoriali, sui quali agiscono svolgendo altre funzioni, come per esempio nel sistema adrenergico e saranno visti anche nel sistema serotoninergico. I derivati dell'acido lisergico come ad esempio ergotamina, ergotripsina possiedono 4 anelli di cui uno è indolico (il gruppo amminico inserito nell'indolo svolge la stessa funzione svolta dell'ossidrile in meta rispetto alla catena laterale della dopamina, ovvero va ad interagire con il recettore dopaminergico formando un legame a idrogeno), inoltre all'interno dei cicli si individua la catena laterale esattamente analoga a quella della dopamina, e risulta (giustamente) complanare all'anello aromatico.

La numerazione dei derivati dell'ergot parte dall'azoto indolico, e quando l'acido lisergico manca del sostituente in posizione 8 la struttura di base si dice **ergolina**, la quale manca anche del doppio legame in posizione 9,10. Per questo motivo i derivati di questa struttura si dicono derivati ergolinici.

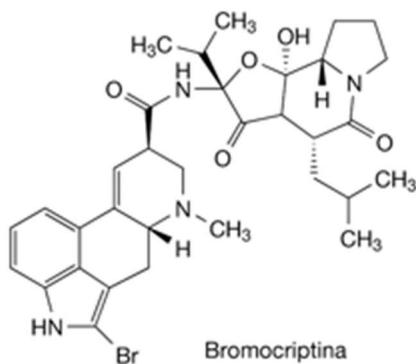
Un aspetto fondamentale della struttura dei derivati ergolini è la **giunzione degli anelli C e D**: nell'acido lisergico la giunzione dei due è complanare, grazie al doppio legame in posizione 9,10, mentre nella struttura base dell'ergolina il doppio legame è assente per cui la giunzione può essere in configurazione **trans**, quindi complanare, o in configurazione **cis**, quindi ripiegata. Tuttavia, come già detto in precedenza, per avere interazione con il recettore dopaminergico, le molecole devono avere la **catena laterale complanare** all'anello aromatico, e quindi la giunzione tra gli anelli C e D deve essere trans perché la molecola sia attiva.

La sostituzione dell'anello indolico con un anello aromatico, può avvenire a patto che presenti un gruppo ossidrilico in posizione meta rispetto all'inserzione della catena laterale, non altera l'attività dopaminergica della molecola. Ciò è dovuto alla bioisosteria indolofenolo.

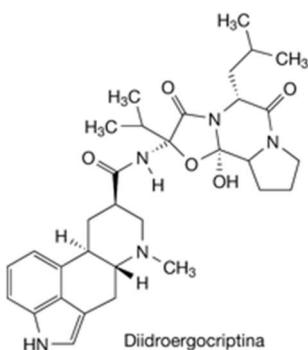


I derivati dell'ergot si usano principalmente per 2 attività deputate al sistema dopaminergico:

- Ha effetto importante sulle **fibre migrostriatali** e quindi un effetto motorio;
- Ha effetto **sull'asse ipotalamo-ipofisario** e perciò molte di queste strutture sono usate nella galattorrea, ovvero nell'over produzione di prolattina (iperprolattinemia) ed hanno funzione di inibire la produzione di prolattina.

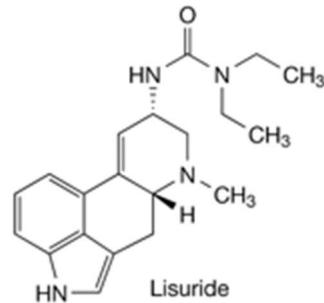


Altre molecole derivati dell'ergot:
cabergolina, lisuride, pergolide, diidroergotriptina.



Dalla **diidroergotriptina** si deduce che il doppio legame in posizione 9,10 non è indispensabile per l'attività dopaminergica, ma è sufficiente che i due anelli abbiano una giunzione di **tipo trans**.

La molecola della **lisuride** in posizione 8 ha un sostituente costituito da un'ammide invertita, la quale in realtà è un gruppo dietil-ureidico.



Nelle lezioni presenti si erano viste queste molecole nel sistema adrenergico sottolineandone la selettività stringente della stereochimica del **carbonio in posizione 8**, mentre per quanto riguarda il sistema dopaminergico la configurazione di questo carbonio è meno importante e può anche essere **epimerizzato**. **L'azoto in posizione 6 può essere sostituito con un propile**, esattamente come era stato visto nel caso dell'apomorfina, della dopamina e delle amminotetraline.

Sono anche stati effettuati degli studi sull'**anello D** per valutare la sua importanza, siccome in giunzione con l'anello C mima la catena laterale della dopamine: anello D può essere **sostituito con un anello morfolinico**, portando ai derivati chiamati 9-oxa-ergoline i quali mantengono l'attività dopaminergica.

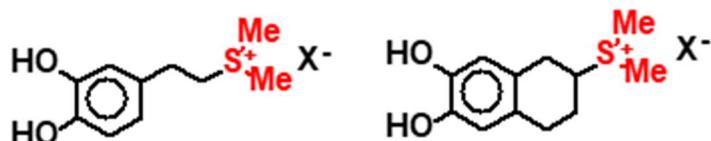
Alcuni agonisti parziali serotoninergici con struttura analoga all'acido lisergico si usano negli attacchi di emicrania.

Domanda: le molecole che abbiamo visto sono più o meno selettive per i vari sistemi?

Risposta: Pergolide, cabergolide, lisuride sono più selettive per il sistema dopaminergico ma i derivati dell'ergotamina hanno potente azione anche adrenergica (principalmente antiadrenergica, quindi non ha come effetto collaterale quello di aumentare la pressione arteriosa). Quando presentano il doppio legame possiedono un'azione vasocostrittrice diretta mediata principalmente dai recettori serotoninergici, soprattutto l'ergotamina (infatti non si usa come farmaco dopaminergico, pur avendo azione dopaminergica); mentre quando viene ridotto il doppio legame si perde gran parte dell'azione diretta sul recettore serotoninergico, ma

insorge una maggiore azione antagonista α (azione principalmente dopaminergica), ma hanno anche azione seppur più debole sul sistema serotoninergico.

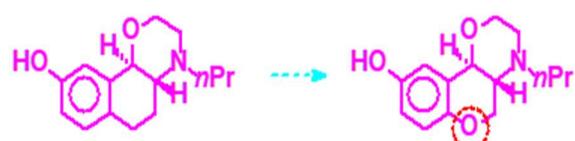
Ruolo della carica positiva sull'azoto per gli agonisti dopaminergici



Per studiare l'attività della carica positiva si sono utilizzati i Salì di solfonio della dopamina, che hanno una carica positiva con 2 sostituenti sullo zolfo, e mantengono l'attività dopaminergica. Per ottenere una carica positiva sull'azoto invece è necessaria una quaternarizzazione dello stesso e ciò provoca un eccessivo ingombro sterico, il quale va a diminuire l'attività.

Nelle **oxaergoline** l'ossigeno favorisce la protonazione dell'azoto, rendendolo più basico. Invece introducendo un altro atomo di ossigeno nell'anello adiacente all'aromatico si ottiene una minore protonazione dell'azoto basico perdendo attività dopaminergica.

In sintesi, è importante che l'azoto sia sufficientemente basico per essere quaternarizzato, e la **diminuzione dell'attività dopaminergica non è dovuta alla carica positiva, ma è dovuta all'ingombro sterico che aumenta in seguito alla quaternarizzazione** e ciò è confermato dagli studi effettuati con il sostituente solfonio, al posto dell'ammonico quaternario, dove si ha mantenimento dell'attività dopaminergica.



Aspetti stereochimici

La rotigotina, farmaco derivato delle **5-idrossi-amminotetraline** deve essere in configurazione S, per avere attività dopaminergica.



Apomorfina: (-)-6aR

R = H, OH: (-)-2S

R = H, OH: (+)-2R

L'**apomorfina si trova in configurazione R**, ma ciò è dovuto alle regole di priorità della stereochimica ed infatti ha i gruppi spazialmente disposti in modo analogo alle 5-idrossi-amminotetraline in S.

Quando invece si pone l'ossidrile delle ammino-tetraline in 7, la configurazione attiva è la R, ma questo non è dovuto alla priorità dei gruppi sostituenti.

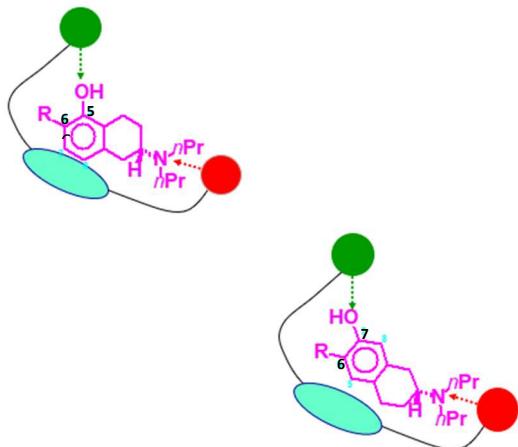
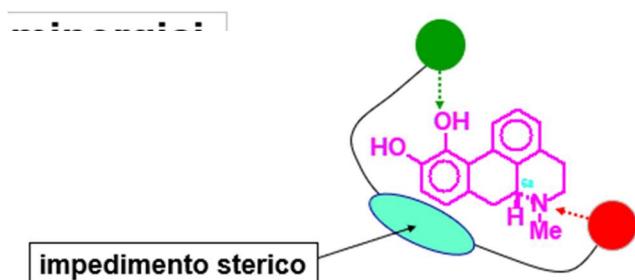
Come è stato razionalizzato questo?

Mediante gli studi di modelling si è visto che l'apomorfina interagisce con il recettore in 3 punti fondamentali:

- **OH** in posizione 11 dà legame a idrogeno con il recettore
- **Azoto** carico positivamente dà un legame ionico elettrostatico con un aspartato
- **Anello aromatico** interagisce con una superficie planare lipofila presente sul recettore.

Le 5-idrossi-amminotetraline in configurazione S danno esattamente le stesse interazioni dell'apomorfina.

La classe delle 6,7-diidrossi-amminotetraline in configurazione S manca dell'interazione svolta dall'ossidrile in posizione 5 (che si trova in 7); inoltre risultano un **impedimento sterico ed una repulsione da parte dell'OH in posizione 7 nei confronti della superficie planare lipofila presente sul recettore.**

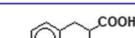
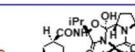
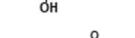
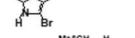
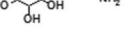
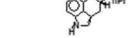
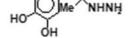
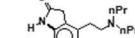


Se invece vengono studiate le interazioni della molecola **6,7-ammino-tetralina in configurazione R**, si può notare che essa interagisce come fosse ‘ribaltata’: in questo modo il gruppo ossidrilico in posizione 7 non dà repulsione con la superficie lipofila, l'**ossidrile può dare il legame ad idrogeno e l'azoto può legare l'aspartato**. In questo modo le **interazioni sono analoghe a quelle svolte dalle 5,6-diidrossi-amminotetraline**.

Farmacocinetica degli agonisti dopaminergici

I farmaci agonisti dopamericini si assumono prevalentemente per **via orale**, essendo da assumere quotidianamente. La rotigotina, che è uno dei farmaci più utilizzati, si somministra in **cerotti con assorbimento transdermico**: in questo modo la somministrazione è più gradita dal paziente (il quale solitamente non è predisposto verso l'assunzione) ed il rilascio è graduale senza dover assumere il farmaco ogni giorno. La **metabolizzazione** di questi farmaci è prevalentemente **epatica**, escluso il pramipexolo (che ha anello amminotiazolico) che viene escreto inalterato.

Farmaci usati in terapia come agonisti dopaminergici

Farmaco (Specialità medicinale [®])	Struttura	Impiego terapeutico	Farmaco (Specialità medicinale [®])	Struttura	Impiego terapeutico
Levodopa (L-DOPA) <i>Levomet[®]</i>		Malattia di Parkinson	Bromocriptina <i>Bromocriptina Dorom[®]</i> <i>Parlodol[®]</i>		Malattia di Parkinson
Levodopa + benserazide <i>Madopan[®]</i>		Malattia di Parkinson	Pergolide <i>Nopar[®]</i>		Malattia di Parkinson
Levodopa + carbidopa <i>Sinemet[®]</i>		Malattia di Parkinson	Ropirinolo HCl <i>Requid[®]</i>		Malattia di Parkinson
Amantadina <i>Mantadan[®]</i>		Malattia di Parkinson	Pramipexolo <i>Mirapexin[®]</i>		Malattia di Parkinson

Farmaco (Specialità medicinale®)	Struttura	Impiego terapeutico
Apomorfina HCl <i>Apofin®</i>		Malattia di Parkinson Emetico Disfunzione erektille
Didroergocriptina <i>Daverium®</i>		Malattia di Parkinson Galattorrea Inibizione della lattazione
Lisuride maleato acido <i>Dopergin®</i>		malattia di Parkinson Galattorrea Inibizione della lattazione
Cabergolina <i>Actualene®</i> <i>Dostines®</i>		Inibizione della lattazione Galattorrea

ANTAGONISTI DOPAMINERGICI

Sono farmaci antipsicotici utilizzati per il controllo delle malattie schizofreniche. Sono chiamati ‘neurolettici’, ‘antipsicotici’, ‘tranquillanti maggiori’.

L’etimologia della parola schizofrenia deriva da “scissione della mente”.

Circa 1% della popolazione mondiale soffre di schizofrenia.

Si riscontrano 3 categorie di sintomi provocati da questo tipo di malattie:

- **POSITIVI:** si indicano così, ma non sono realmente positivi, bensì sono proprio i sintomi da controllare maggiormente perché provocano delirio, allucinazioni, ipereccitazione (sintomi psicotici). A volte si rende necessaria l’interruzione del trattamento del Parkinson con il farmaco levodopa proprio a causa di una trasmissione eccessiva e non controllata da parte dei neuroni dopaminergici a livello mesolimbico e ciò provoca allucinazioni. I farmaci più utili curano appunto i sintomi positivi.
- **DISORGANIZZATI:** riguardano principalmente il linguaggio ed il pensiero confuso.
- **NEGATIVI:** riguardano maggiormente un deficit di trasmissione dopaminergica a livello mesocorticale. Si tratta di sintomi quali piattezza emotiva, povertà di pensiero, mancanza di piacere e di motivazione nello svolgimento delle normali attività quotidiane.

A tutta questa distinzione che viene fatta dalla società di psichiatria, ci sono anche altre sintomatologie relazionali che possono portare anche ad una ricaduta sociale importante e quindi devono essere controllati maggiormente e cioè un’espressione inadeguata dell’aggressività e della sessualità.

I tratti coinvolti nella trasmissione dopaminergica sono il mesolimbico, il mesocorticale, il migrostriatale e il tubulovesticolare, ma quelli coinvolti maggiormente nelle patologie psichiatriche sono i primi due.

C’è tuttavia un coinvolgimento opposto: nel **mesolimbico** abbiamo un’**iperattività dopaminergica** che va controllata, mentre i sintomi negativi associati a un **deficit dopaminergico a livello mesocorticale** purtroppo vengono peggiorati nel momento in cui si assume un farmaco anti-dopaminergico, tant’è che la ricerca negli ultimi anni ha sviluppato molecole utili in questo senso, cioè scoprendo molecole che abbiano prevalentemente azione di agonisti parziali così da controllare in maniera fisiologica sia l’iperattività del tratto mesolimbico rispetto all’ipoattività del tratto mesocorticale.

Abbiamo iniziato a trattare la classe degli antipsicotici e, in particolare, abbiamo visto quali sono le vie dopaminergiche maggiormente coinvolte in questa patologia. Come tutte le altre patologie di tipo neurologico e neurodegenerativo, prevede dei farmaci che non sono curativi ma che trattano la patologia; infatti, con la sospensione di questi farmaci, il problema normalmente ricompare. Per queste patologie non esiste una terapia univoca, alcuni pazienti rispondono a determinati farmaci, altri a farmaci diversi. È la classe di molecole che normalmente dà origine ai maggiori insuccessi nella scoperta di farmaci. Come nel caso delle patologie psicotiche, non si ha una certezza sulla causa di queste patologie; quello che si sa sicuramente è che i neurotrasmettitori maggiormente coinvolti nella psicosi e nella schizofrenia sono la serotonina e la dopamina. Parleremo infatti sempre di farmaci che agiscono sia sui recettori di tipo D₂ dopaminergico che di molecole che agiscono come antagonisti del sottotipo recettoriale 5HT_{2A}. Alcune delle molecole che studieremo sono maggiormente selettive per i recettori D₂ (si intende la classe dei D₂-like, quindi D₂, D₃ e D₄). La classificazione spesso non è netta, ma, solitamente, quelli maggiormente selettivi per il sottotipo recettoriale D₂ vengono chiamati antipsicotici tipici (o di prima generazione) mentre quelli che agiscono anche sul sottotipo 5HT_{2A} sono definiti antipsicotici atipici (o di seconda generazione). Non si conoscono ancora le cause molecolari associate ai vari tipi di schizofrenia, ma è stato scoperto che si ha una disregolazione dei livelli serotonergici e dopaminergici. Inoltre, sono stati osservati post mortem, in pazienti che hanno sofferto di schizofrenia, delle malformazioni in alcune aree del cervello, più precisamente allargamenti a livello dei ventricoli cerebrali. Ciononostante, queste disfunzioni anatomiche non si ritrovano in tutti i pazienti che hanno sofferto di schizofrenia, per questo l'allargamento dei ventricoli cerebrali non deve essere la sola causa dello scatenamento della patologia psichiatrica.

Quando si parla di disregolazione delle ammine biogene dopaminergiche e serotonergiche, si deve tenere in considerazione l'area cerebrale associata ai diversi sintomi nella schizofrenia: nell'area mesocorticale si osserva una diminuzione della neurotrasmissione dopaminergica, mentre nell'area mesolimbica si osserva una iperattività dopaminergica. Questo ha reso ancora più complesso la scoperta di farmaci efficaci per l'una e per l'altra manifestazione, quindi di farmaci che siano efficaci sia per i sintomi negativi che per i sintomi positivi.

L'attività dei farmaci dopaminergici è sempre accompagnata da importanti effetti collaterali. Questo è dovuto al fatto che, mentre si ha una diminuzione dell'iperattività a livello delle regioni limbiche della corteccia e quindi un effetto sedativo sul comportamento del paziente, questa diminuzione della trasmissione dopaminergica non esclude le fibre microstriatali. È stato visto che la diminuzione di trasmissione a livello delle fibre dopaminergiche è alla base della patologia del Parkinson (soprattutto dei sintomi che riguardano il movimento) e che vanno sotto il nome di "effetti extrapiramidali dei farmaci antidopaminergici". Questi effetti collaterali che sono a volte tanto importanti da dover sospendere il farmaco e sostituirlo con altri, sono associati maggiormente ai farmaci antagonisti dopaminergici D₂, mentre si osservano in misura molto minore per i farmaci atipici, che hanno azione non solo a livello del sistema dopaminergico ma anche a livello del sistema serotonergico. Questi effetti collaterali che riguardano le fibre microstriatali (sintomi di Parkinson iatrogeno), nel caso non si riesca a sospendere o a modificare la terapia, vengono tenuti sotto controllo con dosaggi opportuni di farmaci anticolinergici; perciò, nonostante questi non siano farmaci di prima scelta nel Parkinson idiopatico, lo diventano nel Parkinson iatrogeno perché vanno a controllare un sistema che controbilancia gli effetti extrapiramidali.

Oltre a questi effetti collaterali, le altre vie dopaminergiche importanti sono quelle del tratto ipotalamo-ipofisario. Qui abbiamo i recettori D₂ che controllano la produzione di prolattina (in particolare sono i recettori D₂ che, una volta stimolati, fungono da modulatori negativi nella liberazione di questa). Il problema principale che si osserva per uso cronico degli antipsicotici è, infatti, l'aumento dei livelli di prolattina. Nel maschio questo effetto collaterale dà origine a ginecomastia (ingrossamento delle ghiandole mammarie) e, in alcuni casi, a galattorrea, mentre nella donna si hanno molto frequentemente problemi con il ciclo mestruale; normalmente, con la sospensione del farmaco si ha il ripristino del normale ciclo. Tutti questi effetti collaterali sono infatti reversibili e retrocedono con la sospensione della terapia: il Parkinson iatrogeno, ad esempio, non deriva da una degenerazione delle fibre microstriatali (che rimangono integre) ma semplicemente da una diminuzione di trasmissione dopaminergica e, nel momento in cui si sospende il farmaco, le fibre dopaminergiche ricominciano a funzionare correttamente.

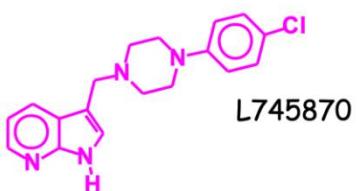
I sottotipi della classe dei D₂-like coinvolti sono il D₂, il D₃ e il D₄. Per capire quale sottotipo tra D₂ D₃ e D₄ avesse una maggiore azione, sono stati effettuati degli studi di binding sui principali farmaci antipsicotici in terapia.

	<i>K_i (nM)</i>		
	D ₂	D ₃	D ₄
Clorpromazina	0,55	1,2	9,7
Clozapina	35	83	22
Aloperidolo	0,53	2,7	2,3
Olanzapina	7,5	49	15
Quetiapina	105	340	2000
Raclopride	1	1,8	2400
Remoxipride	54	969	2800
Risperidone	1,3	6,7	7,5
Sertindolo	0,38	1,6	10,1
(-)-Sulpiride	2,5	8	1000
Tioridazina	1,2	2,3	10

risperidone) sono i cosiddetti farmaci atipici o di seconda generazione e sono i farmaci più nuovi. Hanno un andamento molto variegato; in particolare la clozapina e l'olanzapina non manifestano una grossa differenza nei confronti dei 3 sottotipi recettoriali, mentre la quetiapina ha una scarsa affinità nei confronti sia dei D₂ che dei D₃, e, più di tutti, dei D₄.

Da questa tabella sembrerebbe che il maggiore coinvolgimento sia a carico dei recettori D₂; un dato importante

si è avuto quando è stata scoperta questa molecola molto selettiva per il recettore D₄. È un 7-azaindolo, è una delle molecole più conosciute e viene utilizzata anche come tools farmacologico per lo studio dei recettori dopaminergici. È molto selettiva per il sottotipo recettoriale D₄ ed è completamente inattiva come antipsicotico; questo conferma ulteriormente che i sottotipi maggiormente coinvolti sono il D₂ e D₃ mentre il D₄ lo è molto meno.



Inattivo come antipsicotico
 K_i (nM): D₂ = 960, D₃ = 2300, D₄ = 0,43

Classificazione antipsicotici

Come è stato detto, i farmaci antipsicotici possono essere suddivisi in due grandi categorie:

- Farmaci antipsicotici tipici o di prima generazione. Questi farmaci agiscono prevalentemente sui recettori dopaminergici come antagonisti D₂, che questo fa sì che questa prima classe di farmaci antipsicotici sia caratterizzata dai maggiori effetti collaterali extrapiramidali e da maggiori effetti di iperprolattinemia.
- Farmaci antipsicotici atipici o di seconda generazione. Questa classe conserva una elevata affinità per il recettore D₂ dopaminergico ma ad essa è anche associata l'attività antagonista 5HT_{2A}; per questa ragione manifestano minori effetti collaterali extrapiramidali ma ne danno molti altri su altri sistemi recettoriali.

Nella tabella sono rappresentati gli antagonisti dopaminergici (soprattutto atipici) ed è possibile vedere che, rispetto ai recettori della classe D₂, questi farmaci (soprattutto la clozapina) hanno una maggiore affinità nei confronti del recettore 5HT_{2A} rispetto al D₂ dopaminergico. Per quanto riguarda invece l'olanzapina, il risperidone e la quetiapina, l'attività sui due sottotipi recettoriali è abbastanza bilanciata (sono attivi alla stessa concentrazione).

	Clozapina	Risperidone	Olanzapina	Quetiapina
D ₁	53	21	10	390
D ₂	190	0,44	2,1	69
D ₃	280	14	49	340
D ₄	40	16	28	1600
5-HT _{1A}	710	21	7100	830
5-HT _{2A}	4	0,39	1,9	82
5-HT _{2C}	5	6,4	2,8	1500
α ₁	3,7	0,69	7,3	4,5
α ₂	51	1,8	140	1100
M ₁	0,98	>5000	2,1	56
H ₁	17	88	5,6	21

Farmaci antipsicotici tipici

Sono stati scoperti negli anni '60 e sono tutt'ora utilizzati; alcuni pazienti rispondono meglio ai farmaci antipsicotici tipici rispetto a quelli atipici, che entrano invece in gioco quando i primi non hanno più effetto o quando il paziente inizia a manifestare degli importanti effetti collaterali.

La classe degli antagonisti dopaminergici tipici prevede quattro strutture principali:

- **Fenotiazine e composti correlati**, il cui prototipo è la clorpromazina.
- **Butirrofenoni e composti**, il cui prototipo è l'aloepentolo.
- **Benzammidi**, la classe di mezzo che unisce i tipici e gli atipici. Ha infatti azione anche nei confronti dei sottotipi 5HT_{2A}, ma meno spiccata rispetto agli atipici puri. Il prototipo è la sulpiride.
- **Tioxanteni** il cui prototipo è la clorprotixene. Sono strettamente collegati alle fenotiazine, ma l'anello, invece che essere fenotiazinico, è tioxantenico.

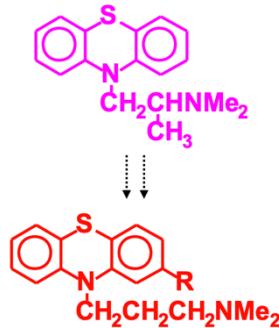
La classificazione riguarda la struttura chimica.

Fenotiazine

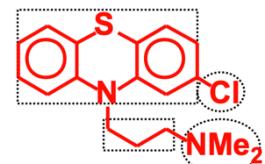
Sono state affrontate durante il capitolo riguardante il sistema istaminergico, dove abbiamo parlato della prometazina. Questa, rispetto alle fenotiazine ad azione antipsicotica, è un isomero strutturale; infatti, il CH_3 che nella prometazina è in catena laterale è qui inserito nella catena lineare e, mentre nella prima la distanza tra gli atomi di azoto esociclico ed endociclico è di 2 metileni, nella classe delle fenotiazine ad azione antipsicotica è invece di 3 metileni. Questa distanza non può subire variazioni, così come non può subire variazioni la sostituzione sull'atomo di azoto terminale, che negli antipsicotici deve essere terziario. I migliori sostituenti su questo N sono due metili, come nel caso della promazina; questa molecola è stata scoperta intorno agli anni '50 ed è successivamente stata sostituita su uno dei due anelli con un atomo di cloro o con un trifluorometile, dando origine rispettivamente alla clorpromazina e alla trifluopromazina, commercializzate intorno agli anni '60.

L'attività antipsicotica è qualitativamente e quantitativamente correlata alla distanza dei due N esociclico ed endociclico, ai sostituenti sull'atomo di azoto terminale, ai sostituenti sul ciclo aromatico e all'anello triciclico (uno degli altri elementi che spinge l'attività verso l'azione antidopaminergica).

Prometazina
(antagonista H_1 istaminergico)



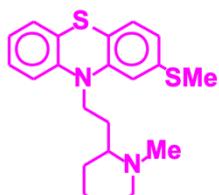
Promazina: R = H (1950)
Clorpromazina: R = Cl
Trifluopromazina: R = CF_3



- La **catena laterale** propilica può essere ramificata.



(R)- Levomepromazina



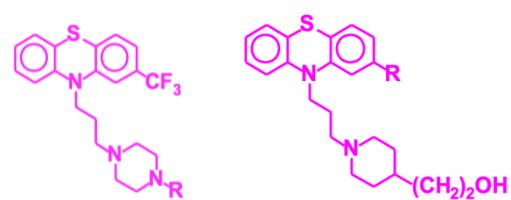
Tioridazina

Può essere sostituita con un metile, come nel caso della levomepromazina (levo perché, mettendo un metile in catena laterale in β rispetto all'azoto, si viene a formare un centro chirale. La molecola più attiva è quella levogira che ha conformazione R).

La catena laterale può inoltre essere inserita in un ciclo purché sia mantenuta la distanza di 3 metileni tra l'N esociclico e quello endociclico. Nel caso della tioridazina, è stata inserita in un ciclo metilpiperidinico.

- Nella **funzione amminica** l'ammina deve essere terziaria, a differenza di quanto visto per gli antidepressivi che sono sempre dei derivati triciclici ma in cui l'ammina terminale può anche essere secondaria. In questo caso, a differenza degli antidepressivi, il metabolita ottenuto in seguito alla demetilazione dell'azoto è un composto molto meno attivo.

Un aspetto visto anche nei TCA con l'opipramolo è la possibilità di sostituzione a livello della porzione terminale amminica con una idrossietilpiperazina. Uno degli antipsicotici più utilizzati è infatti la flufenazina, che presenta questa funzione idrossietilpiperazinica. Questo è importante perché, come per l'opipramolo, è possibile derivatizzare il gruppo OH in forma di estere (solitamente decanoato o enantato) così da fare un preparato deposito: la molecola può essere somministrata con una iniezione settimanale e il farmaco attivo verrà rilasciato in seguito dalle esterasi ematiche. Il paziente schizofrenico, infatti, ha una certa ritrosia verso l'assunzione del farmaco, perché questo non dà sensazioni piacevoli; tale approccio facilita un regime terapeutico costante così da avere la sicurezza



Trifluoperazina: R = Me
Flufenazina: R = $(\text{CH}_2)_2\text{OH}$

che la terapia sia effettivamente seguita da un paziente che, per os, potrebbe invece saltare l'assunzione.

Sia nel caso della flufenazina che nel caso della trifluoperazina, la presenza di un altro atomo di azoto non modifica l'attività della molecola; l'importante è che sia presente una catena propilica che termina con un gruppo amminico basico. L'azoto importante è quello legato alla catena propilica.

- **Sostituenti aromatici.** La situazione è sovrapponibile a quella vista per gli antidepressivi triciclici.



2 > 3 > 4 > 1

Per la posizione 2:

$\text{OH} < \text{H}, \text{OMe} < \text{CN} < \text{iPr} < \text{Me} < \text{tBu}, \text{CO}_2\text{Me}, \text{nPrCO}, \text{EtCO} < \text{MeCO}, \text{SO}_2\text{Me} < \text{Cl}, \text{SMe}, \text{SOMe}, \text{Br}, \text{SCF}_3 < \text{SO}_2\text{NMe} < \text{SO}_2\text{CF}_3, \text{CF}_3$

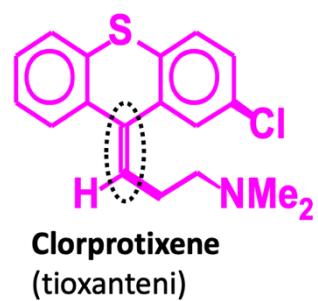
L'anello tiazinico può essere sostituito in varie posizioni: come negli antidepressivi il sostituente non può essere messo in 1 o, per ragioni di ingombro sterico, la catena laterale si disporrebbe dalla parte opposta rispetto al sostituente. La posizione migliore, come negli antidepressivi triciclici, è la 2, seguita dalla 3 e dalla 4 (secondo la scala $2 > 3 > 4 > 1$). I sostituenti delle molecole che vedremo sono sempre in posizione 2.

I sostituenti maggiormente usati sono il trifluorometile, il bromo e il cloro, che aumenta la lipofilia globale della molecola e la sua potenza; ciò avviene perché la catena laterale, quando uno dei due anelli della fenotiazina è sostituito, si colloca dalla stessa parte dell'anello sostituito, quindi in posizione cisoide (isomero attivo). Questo è stato confermato dal clorprotixene, un derivato dei tioxanteni (classe strettamente collegata a quella delle fenotiazine). Questa analogia la avevamo fatta anche negli antidepressivi mettendo a confronto l'amitriptilina con l'imipramina. Nei tioxanteni l'anello triciclico non è più fenotiazinico ma tioxantenico, quindi al legame N-CH₂ è stato sostituito un alchene che dà origine ad una isomeria Z/E. Questa isomeria si viene a creare solo quando si ha un sostituente su uno dei due anelli, poiché in caso contrario la molecola presenterebbe un piano di simmetria. Avendo un sostituente, quindi, è possibile avere o l'isomero Z, dove la catena laterale e l'anello sostituito si trovano dalla stessa parte, o l'isomero E, dove la catena si trova invece dalla parte opposta rispetto all'anello sostituito. In questo caso, la catena non è flessibile ed è possibile separare l'E dal Z; in questo modo è stato scoperto che l'isomero attivo è quello Z. Per questo motivo nelle fenotiazine il sostituente non può essere messo in 1 o la catena si collocherebbe dalla parte opposta rispetto all'anello sostituito dando origine così al conformero non attivo.

Quando c'è libertà conformazionale, per chiarire quale è la conformazione attiva è possibile fare un analogo rigido; in questo caso il tioxantene è l'analogo rigido delle fenotiazine, in cui è stato possibile congelare il legame che nella fenotiazina risultava flessibile.

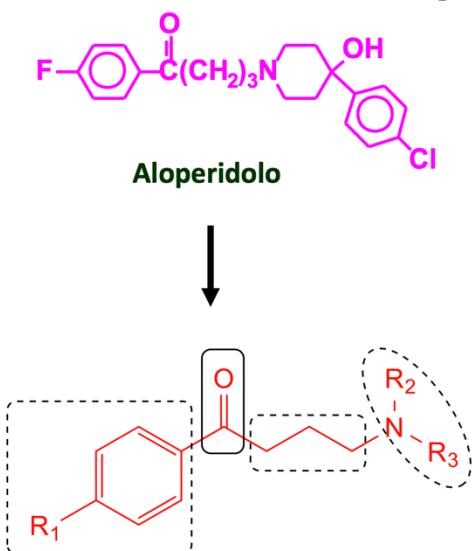
L'anello fenotiazinico può quindi essere sostituito con un anello tioxantenico, ma non è possibile fare altre sostituzioni: quando vado ad inserire dei sostituenti (ad esempio dei bioisosteri come la piridina) sui due anelli laterali, normalmente ho una diminuzione dell'attività.

- Disposizione dell'**anello triciclico**: i tioxanteni e le fenotiazine sono anelli 6,6,6 e questo comporta che il triciclo assuma una struttura più vicina alla planarità: il ripiegamento dei due benzeni laterali rispetto a quello centrale forma un angolo di circa 160° (vicino ai 180°). Negli antidepressivi, invece, il sistema è sempre 6,7,6 e la struttura del triciclo è molto più ripiegata con angoli tra i 120° e i 140°.



Butirrofenoni

Tra gli antipsicotici sono i peggiori per quanto riguarda gli effetti collaterali e, per questo motivo, non sono farmaci di prima scelta nelle patologie psichiatriche. Hanno effetti collaterali soprattutto a livello cardiaco e provocano la sindrome del QT lungo (come gli antistaminici di seconda generazione, fra cui la terfenadina, non più utilizzata come farmaco proprio perché aveva lo stesso problema. È stata progettata dall'alooperidolo e da un'altra molecola; negli studi di relazione struttura-attività è stato visto che, facendo alcune modifiche, si ottiene un'azione antistaminica e non più antipsicotica).

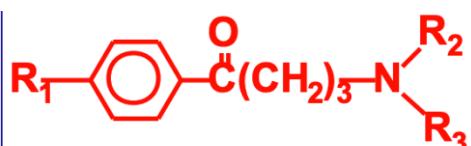


L'alooperidolo è in uso dal 1958 e viene usato nelle forme resistenti di eccitamento psicomotorio, psicosi acute deliranti e/o allucinatorie, e psicosi croniche. È una molecola che è stata ampiamente modificata; dalla classe dei butirrofenoni, per modificazioni della catena laterale, si è arrivati alla classe delle diarilbutilammime.

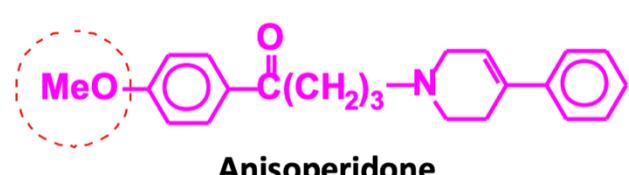
Queste molecole hanno una struttura butirrofenonica: sono dei chetoni con una catena butirrica $\text{CO}(\text{CH}_2)_3$ che presentano un anello aromatico normalmente sostituito in posizione para. La sostituzione con il fluoro (come nel caso dei fluorochinoloni), è importante perché funge da protezione verso il metabolismo ossidativo. (Il F ha le stesse dimensioni dell' H, diminuisce l'ossidrيلazione in para dell'anello aromatico che porterebbe a una emivita molto più breve per glucuronoconiugazione del derivato ossidrilato.) Nel caso specifico dell'alooperidolo l'ossidrيلazione in para porta ad avere un composto molto meno attivo.

L'alooperidolo, oltre alla catena butirrofenonica, ha un anello 4-idrossipiperidinico sostituito in 4 con un paraclorobenzene. L'OH in 4 non è importante e, anche a livello metabolico, disidrata facilmente per dare origine ad un doppio legame.

Scomponendo la molecola dell'alooperidolo è possibile vedere come è stata modificata e quali sono stati i migliori risultati in termini di molecole che sono in terapia. Le 4 porzioni importanti della molecola sono l'anello aromatico sostituito, il carbonile della catena butirrofenonica, la catena che separa il carbonile dall'atomo di azoto basico e l'N terziario.



- **Gruppo arilico.** Un derivato del butirrofenone che somma le relazioni struttura attività accennate è l'anisoperidone, derivato dell'anisolo; infatti, presenta un metossile in para che ha la funzione di protezione dal metabolismo ossidativo. Inoltre, non si ha più l'OH in 4 dell'anello piperidinico ma si ha il doppio legame: ho una tetraidropiperina invece della piperidina.

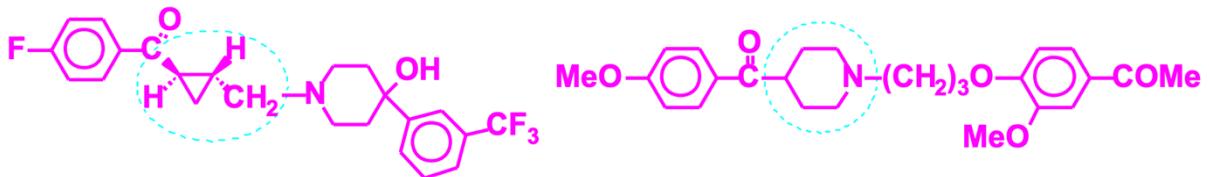


- **Gruppo carbonilico.** In queste molecole, prima di andare a modificare il carbonile, è necessario capire se questa funzione risulti importante in quanto accettore di legami ad idrogeno. Per verificarlo si può andare a ridurre il CO trasformandolo in gruppo OH e, se l'attività rimane, vuol dire che in quella posizione è importante avere un gruppo in grado di dare legami a idrogeno. Facendo questa modifica nei butirrofenoni si va a perdere molta attività antipsicotica ma, sostituendo un gruppo aromatico al posto del carbonile (ad esempio con un fenile nel caso della pimozide), l'attività non solo viene mantenuta, ma migliora. Nella pimozide è stata mantenuta la catena butilica ma il gruppo carbonilico è stato sostituito con un parafluorobenzene e, nel terminale, si ha una piperidina sostituita con un gruppo benzoimidazolonomico (benzoimidazolo con un carbonile). È stato inserito un anello aromatico uguale a quello già presente (sempre parafluo sostituito per protezione verso il metabolismo ossidativo): questa è la conferma che il carbonile non è importante in quanto accettore di legami a idrogeno ma è importante per la sua densità elettronica. Andando a fare questa sostituzione la molecola non è più un butirrofenone ma appartiene alla classe delle diarilbutilammime.

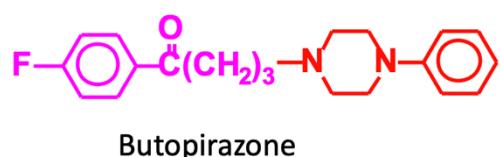
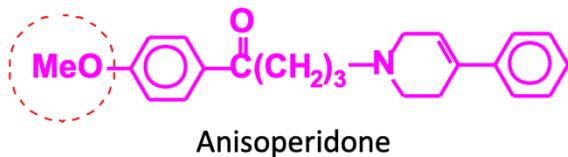


Sono state fatte anche altre modificazioni a livello del carbonile andando a formare, ad esempio, altri derivati bioisosterici con la sostituzione di un gruppo etero, di uno zolfo, di un solfone o di un solfossido; in tutti i casi si ha comunque una diminuzione dell'attività, perché questi gruppi aumentano la possibilità di dare legami a idrogeno che, come è stato detto, non sono importanti in questa posizione. La pimozina è molto più sicura e priva degli effetti collaterali a livello cardiaco.

- La **catena propilica** legata al carbonile può essere inserita, ad esempio, in un anello ciclopropilico. L'irrigidimento strutturale della catena laterale mantiene comunque l'attività antipsicotica, purché la stereochimica di questo ciclopropile sia trans (la catena laterale e il carbonile devono essere da parti opposte). La catena propilica che rimane legata al carbonile può anche essere inserita in un ciclo piperidinico e l'attività viene comunque mantenuta.



- **Funzione amminica.** Dà attività ottimale quando è inserita in un ciclo sostituito in posizione 4. Oltre all'anisoperidone, analogo dell'alooperidolo a cui è stato aggiunto un metossile, un'altra molecola analoga è il butopirizone, dove si è sostituito ad un anello tetraidropiridinico dell'anisoperidone un anello piperazinico; l'importante, quindi, è che ci sia un anello aromatico terminale.



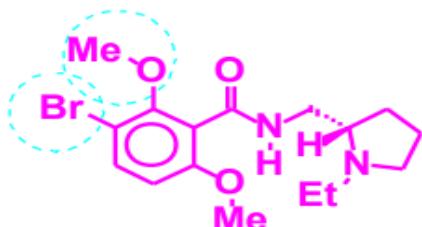
Benzammidi

Le benzammidi sono quella classe di Antipsicotici che costituisce il punto di congiunzione tra gli antipsicotici tipici e gli atipici. Metoclopramide è il capostipite di questa classe, anche se non ha attività antipsicotica a causa della presenza di un sostituente polare sull'anello aromatico. Viene quindi usata come antiemetico per la sua azione antiserotoninergica e antidopaminergica. Il sostituente metossi dell'anello aromatico si trova in orto rispetto alla catena laterale dove è presente l'N-H ammidico. L'ossigeno in questa situazione può fungere da accettore di legami H e l'azoto da donatore. Si forma quindi un legame ad idrogeno intramolecolare che stabilizza la molecola in conformazione coplanare della catena laterale rispetto all'anello aromatico.

A partire da metaclopramide sono stati sviluppati altri derivati: come Sulpiride, che presenta un sostituente sull'anello detto solfonammidico, l'enantiomero S risulta più attivo dell'R ed è altamente selettiva nei confronti di D2 dopaminergici a livello Mesolimbico piuttosto che a livello dello striato (questo potrebbe spiegare i minori effetti collaterali extrapiramidali).

Sultopride invece presenta un sostituente etilsolfonio sull'anello aromatico.

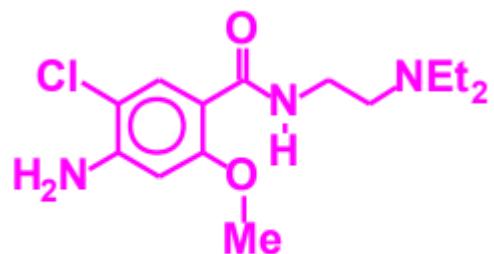
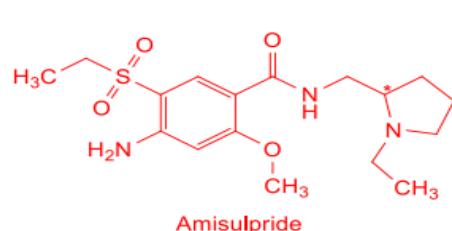
SAR Benzammidi



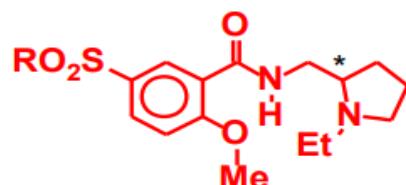
Remoxipride (50x sulpiride)
(S > R) è stata ritirata dal commercio per casi di anemia aplastica

La potente azione dopaminergica di questa molecola è data dall'inserimento in orto alla catena laterale di sostituenti metossilici. Questi creano ingombro sterico obbligando la catena laterale a stare in posizione perpendicolare rispetto all'anello, indicando chiaramente che nella conformazione attiva dei derivati benzamidici l'anello aromatico non può stare sullo stesso piano del legame amidico. Quindi non è importante la formazione di legami idrogeno tra gruppo metossilico in orto e gruppo ammidico ai fini di stabilizzare la catena laterale in conformazione coplanare, con lo scopo di potenziare l'attività dopaminergica. Come vedremo infatti la formazione del legame ad idrogeno è fondamentale per l'attività serotoninergica (recettore 5-HT4).

Usate in terapia



Metoclopramide



Sulpiride: R = NH₂ (50x clorpromazina)
(-)S > (+)R
Sultopride: R = Et

Antipsicotici atipici

I farmaci antipsicotici atipici modulano diversi sistemi recettoriali, in particolare i recettori 5-HT_{2A} serotoninergici. Il ruolo della 5-HT nell'azione neurolettica è stato suggerito a partire dalla scoperta dell'antipsicotico atipico clozapina. In generale gli antipsicotici atipici hanno effetti collaterali principalmente dovuti proprio a questa loro azione su altri sistemi recettoriali (sebbene con minor potenza).

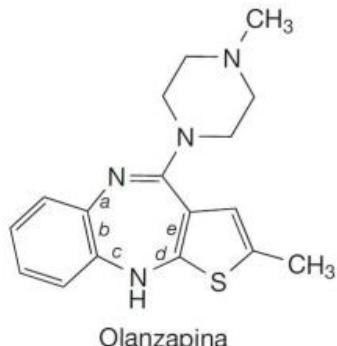
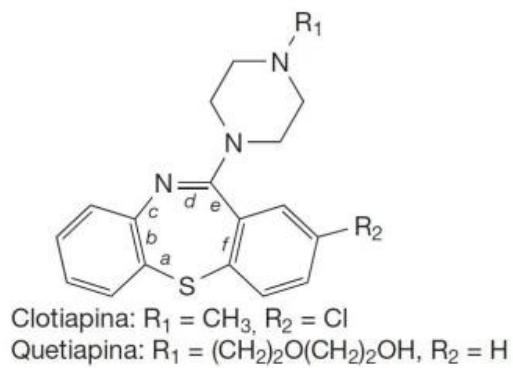
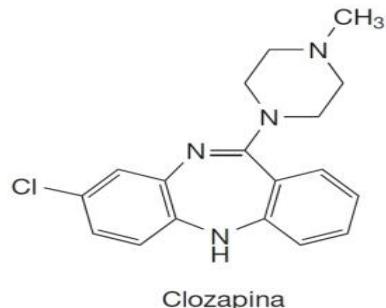
I farmaci antipsicotici atipici possono essere suddivisi, a seconda della loro struttura, in:

- Derivati azepinici e composti correlati;
- Derivati benzisossazolici e composti correlati;
- Derivati a struttura arilpiperazinica.

Derivati Azepinici

La clozapina è stata introdotta in terapia in Europa nel 1971. Fu ritirata per casi di agranulocitosi. Nel 1989, dopo che alcuni studi avevano dimostrato la sua maggiore efficacia rispetto ad altri antipsicotici nella schizofrenia, fu reintrodotta in terapia per il trattamento delle forme di schizofrenia resistenti.

La clozapina antagonizza con elevata potenza i recettori D₄-dopaminergici e 5-HT₂-serotoninergici, ma anche i recettori α₁-adrenergici, muscarinici e H₁-istaminergici, mentre ha mostrato solo una debole attività antagonista verso i recettori D₂, D₃ e D₅ dopaminergici.



Olanzapina



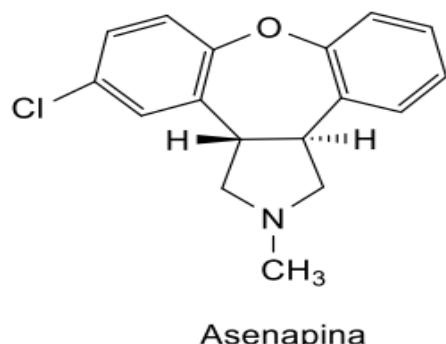
Loxapina

- In questi farmaci la catena laterale basica ha una notevole importanza.
- L'apertura dell'anello piperazinico o la sua sostituzione con una piperidina conduce a composti inattivi.
- Anche l'alterazione della basicità dell'azoto piperazinico più lontano dal sistema triciclico determina la perdita dell'attività neurolettica.

- Rimpiazzando uno degli anelli aromatici del sistema triciclico, con un anello piridinico, si ottengono in genere derivati inattivi (il tiofene della olanzapina non fa calare l'attività).
- La catena laterale di quetiapina termina con una funzione ossidrilica che serve a creare dei derivati esterei con acidi grassi a lunga catena, i quali favoriscono un rilascio controllato del farmaco tramite interazione con le esterasi ematiche.

Asenapina è un antipsicotico di seconda generazione a struttura oxepinica che agisce come antagonista dei recettori 5HT2A-serotoninergici e D2-dopaminergici ed è utilizzata per il trattamento degli episodi maniacali da moderati a severi, associati al disturbo bipolare di tipo I negli adulti.

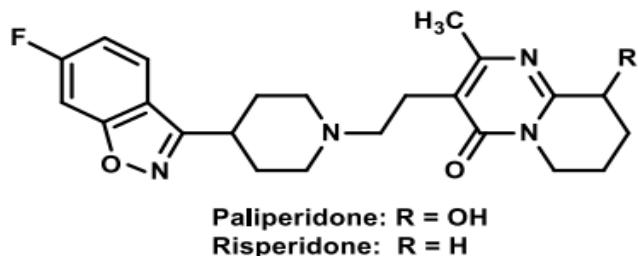
Gli effetti su altri recettori includono: agonismo parziale 5HT1A, antagonismo ai recettori 5HT: 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT5A, 5-HT6, 5-HT7 -serotoninergici, antagonismo α_1 -adrenergico e antagonismo H1-istaminergico.



Derivati Benzoisossazolinici

I prototipi dei derivati a struttura benzisossazolica sono il risperidone e il suo analogo ossidrilato paliperidone.

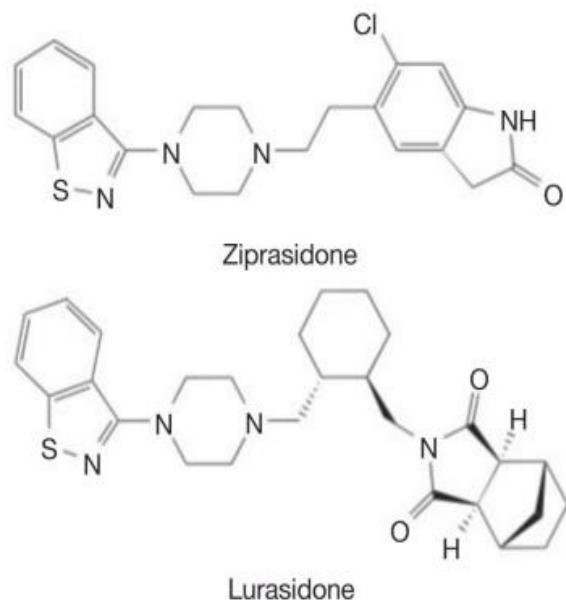
La loro progettazione è il risultato di un'ibridazione molecolare. Il risperidone ha un'elevata affinità per i recettori 5-HT2A serotoninergici e D2 dopaminergici. L'antagonismo dei recettori 5-HT2A favorirebbe la modulazione dopaminergica nello striato con significativa riduzione degli effetti extrapiramidali. Interagisce anche con i recettori α_1 -adrenergici e, con minore affinità, con i recettori H1 istaminergici e α_2 -adrenergici, mentre non ha alcuna affinità per i recettori muscarinici.



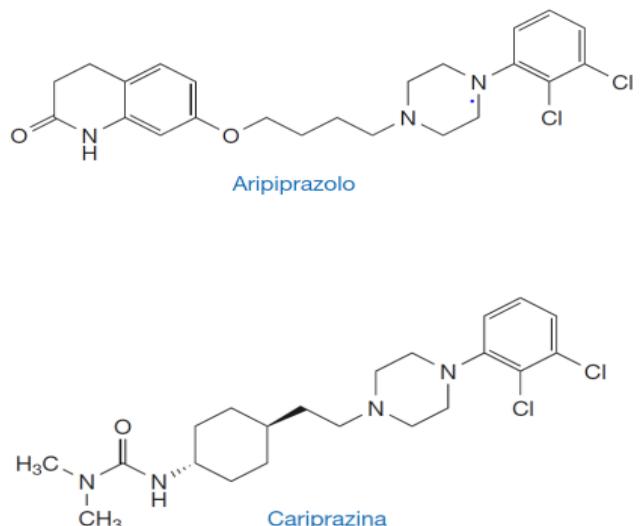
Derivati Arilpiperazinici

La sostituzione isosterica dell'anello isossazolico con un isotiazolo ha condotto ai derivati benzisotiazolici, il cui prototipo è il ziprasidone. Le sue caratteristiche farmacologiche sono simili a quelle del risperidone.

A partire da questa classe si hanno derivati con attività di agonisti parziali. Lurasidone per esempio è usato per il trattamento degli episodi depressivi maggiori associati a disturbo bipolare di tipo I in monoterapia o in associazione con litio. Oltre ad avere attività antagonista sui recettori D2-dopaminergici e 5-HT2A-serotoninergici, lurasidone ha un profilo farmacodinamico di rilievo per la sua alta affinità per i recettori 5-HT7-serotoninergici e per l'attività agonista parziale verso i recettori 5-HT1A-serotoninergici. Il trattamento a lungo termine della schizofrenia con lurasidone ha dimostrato di ridurre il rischio di ricaduta.



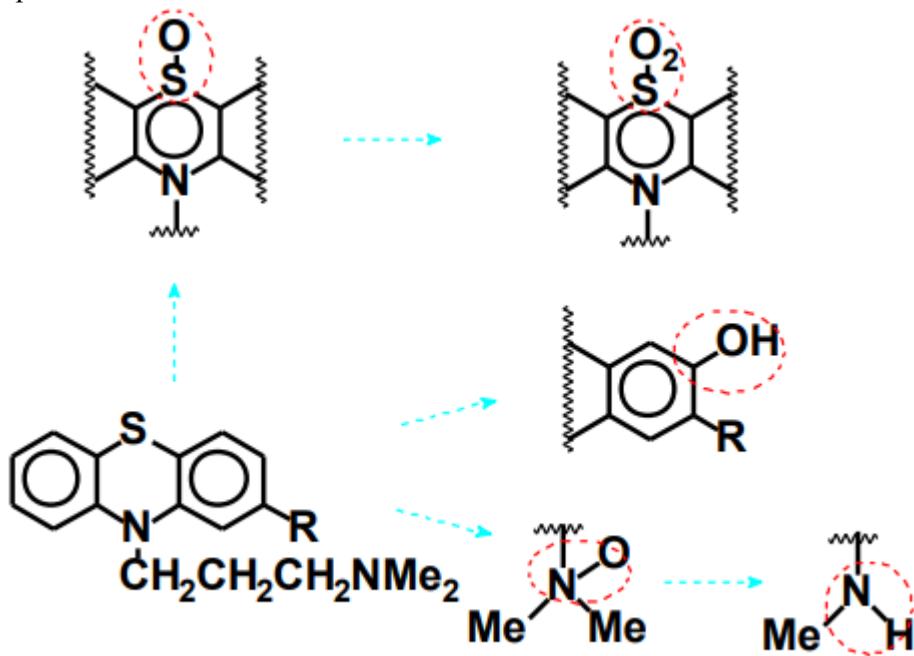
Aripiprazolo e Cariprazina sono due tra i più recenti farmaci entrati in terapia (la prof dice che sono molto importanti da ricordare). Hanno entrambi attività antagonista per i recettori 5-HT2A e agonista parziale per i recettori D2 e D3 - dopaminergici e 5HT1A. A differenza di aripiprazolo, cariprazina mostra maggiore affinità per i recettori D3 rispetto ai recettori D2, sebbene il significato clinico di questo profilo di affinità recettoriale rimanga sconosciuto. Rispetto ai farmaci precedentemente descritti, cariprazina ha il vantaggio di essere efficace sia sui sintomi positivi sia su quelli negativi della schizofrenia e di avere ridotti effetti collaterali, extrapiramidali e metabolici, oltre a uno scarso impatto sull'apparato cardiovascolare.



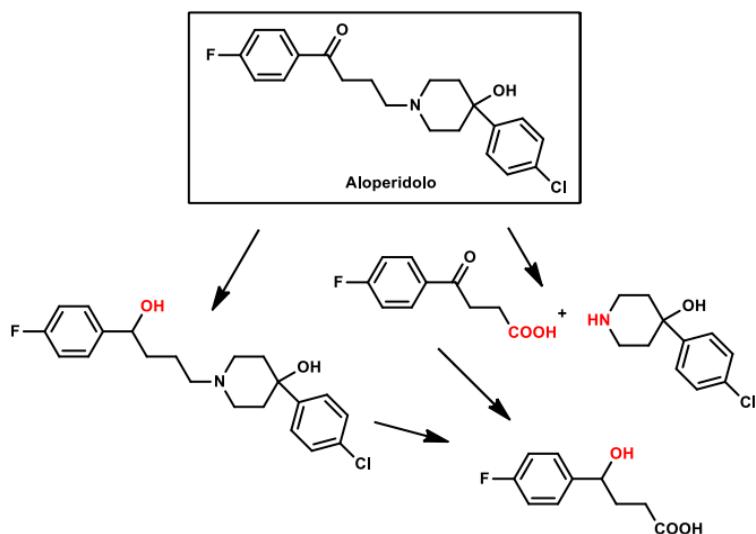
Metabolismo antagonisti dopaminergici

Nel caso della clorpromazina sono noti più di 50 metaboliti derivanti da:

- N-demetilazione ossidativa (ossidazione dell'azoto e conseguente perdita di un metile)
- Ossidrilazione anello aromatico (in 3)
- Ossidazione dello zolfo nucleare (a solfone S-O o a Solfossido S-O₂ → entrambi i composti che ne derivano perdono di attività)
- Non si ha l'apertura del sistema triciclico.

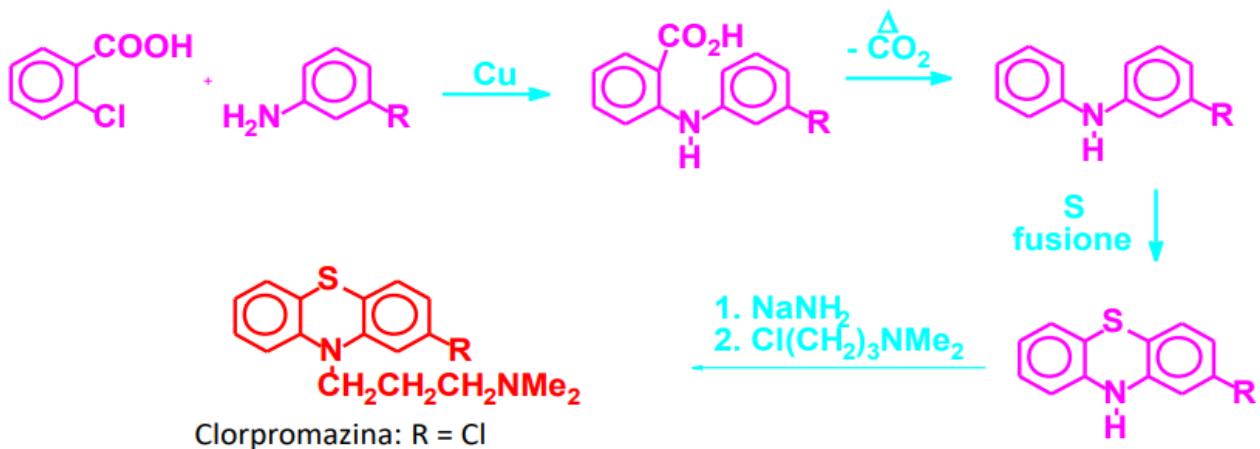


Il Metabolismo dell'Aloperidolo avviene nel fegato per N-dealchilazione ossidativa dell'N piperidinico seguita da ossidazione della catena alchilica e per riduzione del gruppo chetonico ad alcol secondario. I metaboliti vengono poi escreti tramite le urine, e attraverso la via biliare, nelle feci.



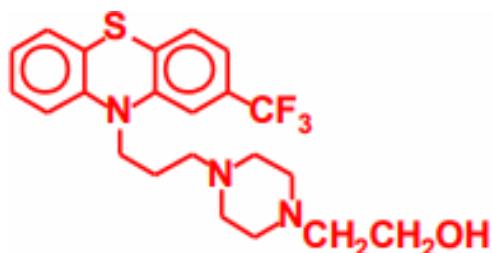
Sintesi Clorpromazina

Viene usata come antiemetico (25-50 mg) e tranquillante (75-800 mg) pro die per via orale. Gli effetti collaterali di questo farmaco sono sonnolenza, secchezza delle fauci, ipotensione, tachicardia, fotosensibilizzazione e rash cutanei.



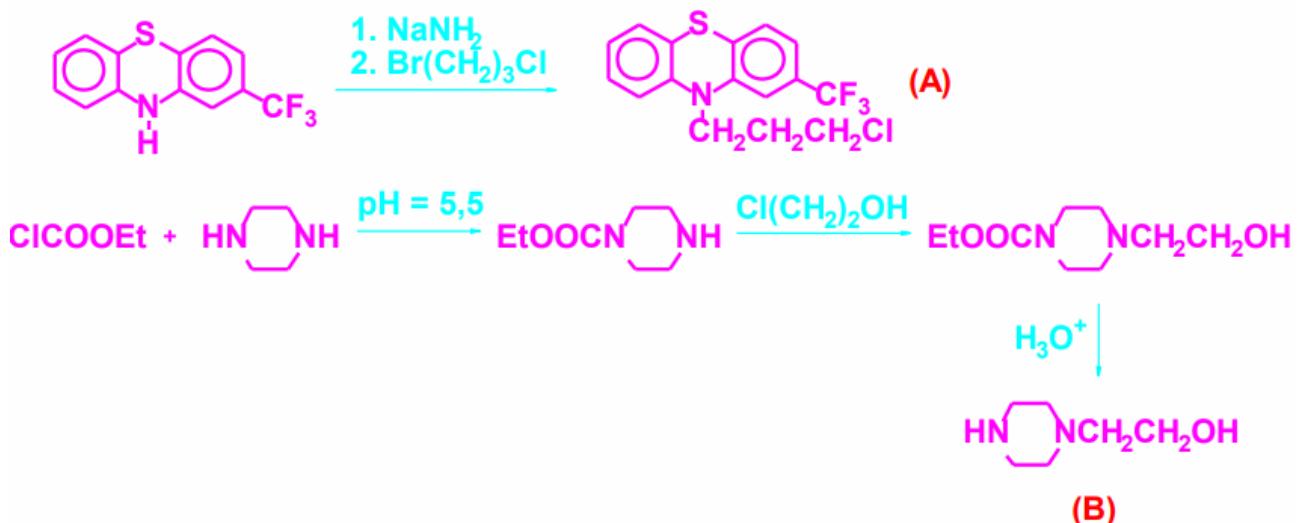
La sintesi parte da una sostituzione nucleofila aromatica con rame metallico come catalizzatore. Si usano come reagenti acido ortoclorobenzoico (il carbossile attiva la posizione orto per un attacco nucleofilo, che è anche favorito dalla presenza di cloro: un buon gruppo uscente) e anilina sostituita in meta (o da -Cl o da -OMe). Avvenuto l'attacco nucleofilo andiamo a fornire calore per far avvenire la decarbossilazione del carbossile in orto. A questo punto dobbiamo compiere la fusione dei due anelli con zolfo molecolare, questa reazione di fusione avviene a temperature molto elevate (220-230°C), raggiungibili tramite un bagno di lega metallica. Infine, per legare la catena laterale andiamo a deprotonare l'azoto con una base forte (sodio ammide), poi compiamo una sostituzione nucleofila con il derivato alchilico clorurato (buon gruppo uscente) della catena laterale. Abbiamo ottenuto Cloppromazina.

Sintesi di Flufenazina (antagonista dopaminergico)



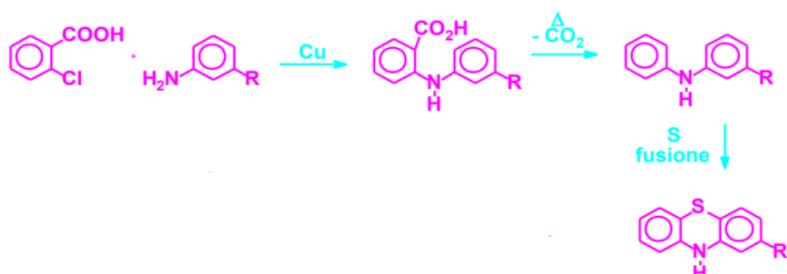
Struttura flufenazina

Passaggi della sintesi:



La flufenazina presenta un gruppo trifluorometile al posto dell'alogeno presente nella clorpromazina.

La sintesi però è la stessa perché si parte sempre dall'acido ortoclorobenzoico il cui gruppo carbossilico ha anche in questo caso la funzione di attivare l'adiacente posizione per la sostituzione nucleofila che avviene con l'anilina opportunamente sostituita secondo le caratteristiche dell'anello fenotiazinico (sintesi di Ullmann).



Una volta costruito il ciclo fenotiazinico sostituito con il trifluorometile, l'NH è abbastanza acido che il suo idrogeno può essere strappato in presenza della base forte sodioammide. Per inserire la catena laterale che termina con una piperazina protetta (perché ha un gruppo idrossietilico che serve a fare un preparato a rilascio controllato) bisogna agire con una catena bifunzionalizzata, come è già stato visto in altre reazioni. Questa catena bifunzionalizzata è un dialogeno che presenta in un'estremità un bromo, in un'altra estremità un cloro (clorobromopropano). Due alogeni differenti creano una certa selettività nell'attacco. Si deve quindi lavorare

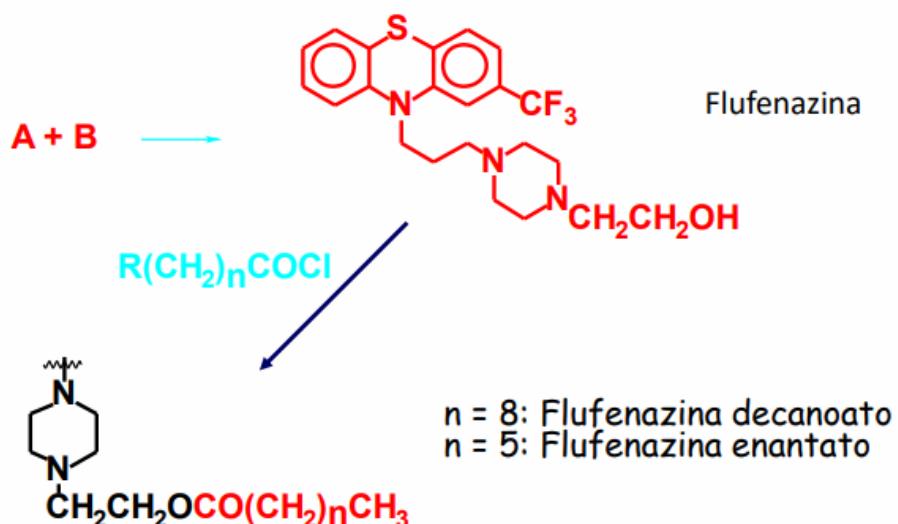
sempre in eccesso di dialogenuro per evitare la disostituzione della fenotiazina alle due estremità però si può anche agire mettendo alle estremità due alogeni diversi, nel senso che il bromo è un miglior gruppo uscente rispetto al cloro e quindi si favorisce l'attacco da una parte e si ha poi la catena già funzionalizzata per la successiva sostituzione nucleofila.

Legata la catena cloropropilica, si deve inserire la catena idrossietilpiperazinica che con il gruppo OH serve a fare degli esteri, degli acidi grassi lipofili a lunga catena e per avere un preparato deposito. Poiché la piperazina ha due gruppi basici la cosa migliore da fare è la protezione di uno dei due gruppi (approccio visto nella sintesi della Prazosina, dove è presente sempre una piperazina). Per proteggere uno dei due NH si fa la reazione con etilcloroformiato a pH controllato, ovvero 5.5. Quando si hanno due gruppi ammidici vicini (distanziati da due metileni) la protonazione di un NH sfavorisce la protonazione dell'altro; quindi, agendo a pH 5.5 si ha un gruppo ammidico libero di dare il carbammato, mentre l'altro è in forma protonata. Quindi, un pH controllato protegge solo uno dei due NH in forma di carbammato perché poi si deve pensare alla deprotezione che deve avvenire in condizioni che non creano dei sottoprodoti con la reazione successiva.

Dopo la protezione si può fare l'attacco della cloridrina etilenica con sostituzione nucleofila, legando la catena idrossietilica.

Il carbammato a questo punto va liberato per riottenere il gruppo NH utile a dare l'ultima reazione di sostituzione con la catena preparata. La deprotezione del carbammato di norma si fa in ambiente acido, evitando un acido alogenidrico (perché l'OH potrebbe dare dei sottoprodoti) ma con acido trifluoroacetico a freddo che deprotegge il carbammato in poco tempo e ripristina l'NH libero.

A questo punto si fa una sostituzione nucleofila fra l'alogenuro e la piperazina idrossietile. Si ottiene la Flufenazina.



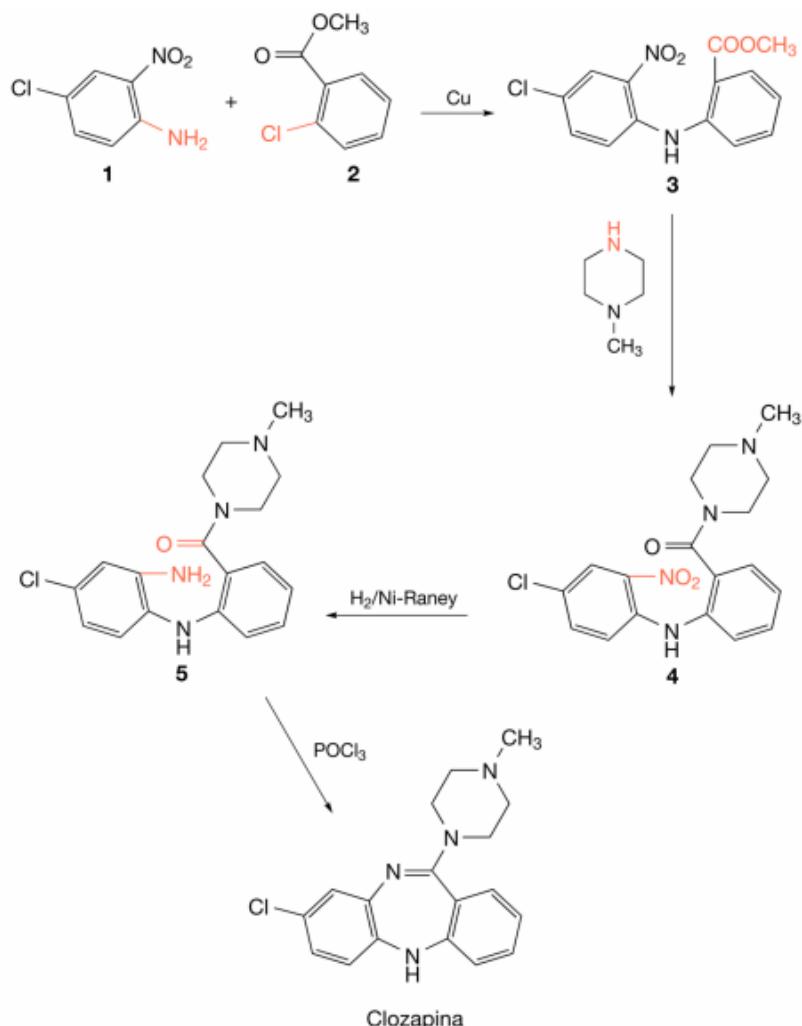
- Questi derivati della flufenazina ad azione ritardo si usano alla dose di 12,5-100 mg intramuscolo ogni 1-3 settimane

Come farmaco ha un gruppo OH che è disponibile ad essere derivatizzato in forma di etere. La derivatizzazione si fa in genere o con acido grasso a 10 (acido decanoico) o con l'acido a 7 (enantato).

In terapia esistono sia la flufenazina decanoato sia la flufenazina enantato. Si ottiene il corrispondente estere normalmente.

Sono somministrati per via intramuscolo per una durata di rilascio da una a tre settimane (utile per pazienti schizofrenici che non assumono la terapia volentieri).

Sintesi di Clozapina (antagonista atipico)

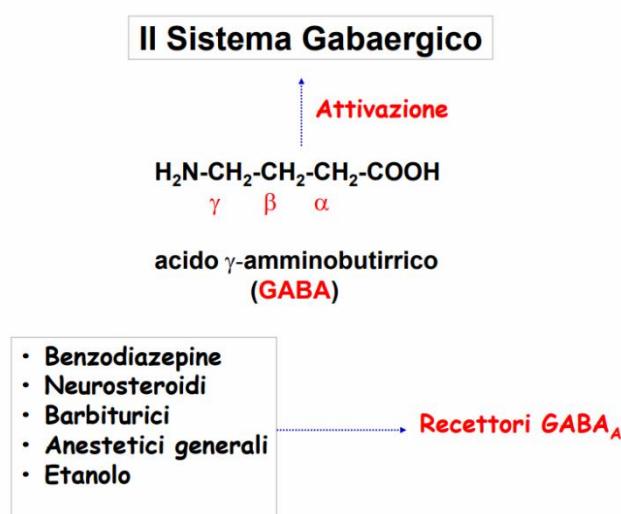


Anche nel caso della clozapina si fa la sintesi di Ullmann (che usa come catalizzatore il rame nel primo passaggio). Nella clozapina c'è un cloro sull'anello dibenzotiazepinico che va sintetizzato.

1. Si parte dalla 2-nitro-4-cloroanilina e dall'estere metilico dell'acido ortoclorobenzoico. Anche in questo caso l'estere metilico dell'acido benzoico (gruppo acetossilico) attiva la posizione adiacente (cloro-sostituita) e facilita ulteriormente la sostituzione nucleofila del gruppo amminico sull'anello;
2. La difenilammina sostituita a questo punto è sottoposta al legame con la metilpiperazina (nella clozapina la metilpiperazina non deve essere mai demetilata, altrimenti l'attività si perde). Si fa quindi una sorta di transesterificazione (acido carbossilico attivato in forma di estere) che porta all'ammide con la metilpiperazina. Non si protegge nulla perché l'altro azoto è bloccato dalla presenza del metile. Dalla reazione fra l'estere dell'acido benzoico e l'N-metilpiperazina si ottiene la corrispondente ammide;
3. Si può trasformare il gruppo nitro in amminico tramite riduzione per idrogenazione catalitica su Ni-Raney (si può anche fare su ferro in acido cloridrico) per assenza di interferenze in altri gruppi. Partendo direttamente dal gruppo amminico ci sarebbero delle interferenze nella reazione precedente;

4. Segue l'attacco del gruppo amminico (da parte del doppietto) sul carbonile (poco elettropositivo) in una reazione che viene spinta attraverso l'utilizzo dell'ossicloruro di fosforo, che serve a polarizzare l'ossigeno legato al carbonile, rendendo più elettropositivo il carbonio carbonilico che deve essere attaccato dal doppietto dell'anilina. Questo si verifica perché in un'ammide il carbonio è poco elettropositivo perché l'azoto delocalizza il doppietto e la carica positiva è più favorevolmente presente sull'N rispetto al C. Il POCl_3 ha poi anche la funzione di favorire la disidratazione immediata dell'intermedio alcolico ovvero una carbinolammina (favorita anche dal fatto che si ha la formazione di un gruppo imminico e quindi di doppi legami coniugati fra l'immina e due anelli aromatici adiacenti). È stata quindi costruita una dibenzodiazepina sostituita con la metilpiperazina.

SISTEMA GABAERGICO



Siamo sempre a livello del sistema nervoso centrale e si pone l'attenzione sul **GABA** ovvero l'**acido γ -amminobutirrico**.

È un amminoacido non classico ma con gruppo carbossilico e ammidico legati su carboni diversi. È detto gamma perché il gruppo amminico è sul metilene in γ .

Tra i vari sottotipi di recettori del GABA di nostro interesse sono i farmaci che agiscono sul recettore GABA_A ovvero le Benzodiazepine (tra le più vendute), i Neurosteroidi (ligandi endogeni di questo recettore), i Barbiturici (che erano molto usati prima dell'avvento delle Benzodiazepine), gli Anestetici generali e l'Etanolo. L'alcol, infatti

ha un effetto potenziante, per cui le Benzodiazepine non vanno mai assunte con alcolici.

Il GABA è il neurotrasmettore maggiormente presente a livello del SNC, ad alte concentrazioni in varie zone (substantia nigra, globus pallidus, ipotalamo, corpi quadrigemini, nella corteccia cerebrale, nel cervelletto, nell'ippocampo, e in quantità minore nel ponte, bulbo e sostanza bianca).

È noto come neurotrasmettore inibitorio in quanto la sua attivazione porta ad effetti di tipo inibitorio.

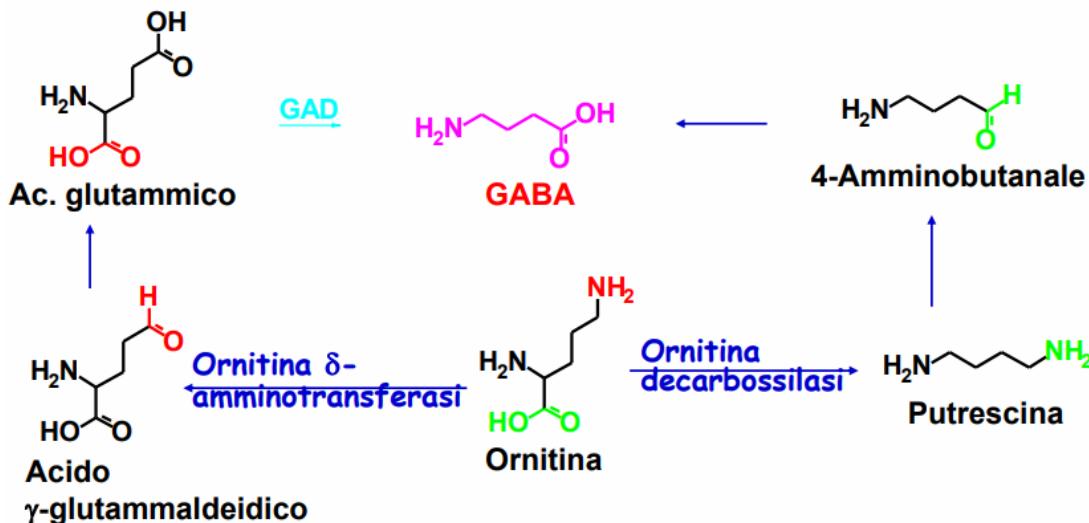
La localizzazione prevalentemente centrale non significa che i recettori GABA non siano localizzati anche a livello periferico. In particolare, sono coinvolti nella motilità intestinale (l'uso sconsigliato di benzodiazepine porta a stipsi) e nel tono della muscolatura liscia di alcuni organi, in particolare vescica e polmone e il loro effetto periferico prevalentemente è di tipo miorilassante. Però le molecole che agiscono su questo sistema recettoriale sono usate soprattutto per il loro effetto centrale.

Tra i recettori noti che sono attivati dal GABA ci sono due recettori canali (GABA_A e GABA_C) dello stesso tipo dei recettori nicotinici, ovvero sempre formati da 5 subunità ma permeabili (in seguito all'apertura del canale) allo ione cloruro che comporta un'iperpolarizzazione della membrana ed effetti inibitori (finora sono stati studiati quelli permeabili a cationi che portavano a depolarizzazione).

Il GABA_A e il GABA_C non condividono enormi somiglianze strutturali perché il GABA_C è formato da subunità diverse rispetto al GABA_A . Il recettore GABA_B invece è accoppiato alla proteina Gi. Sono stati rinvenuti tutti e tre i sottotipi principalmente a livello centrale ma a diverse concentrazioni e localizzazione sono stati rinvenuti anche a livello periferico.

Biosintesi del GABA

- Distribuzione: cervello, midollo spinale
- La biosintesi avviene nei neuroni



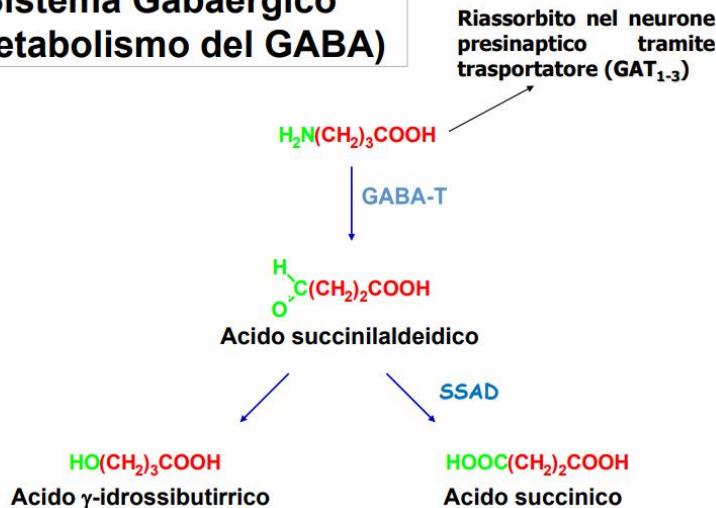
La biosintesi del GABA avviene a livello neuronale e anche in questo caso prevalentemente la concentrazione di GABA deriva da una decarbossilasi, ovvero dall'acido glutammico decarbossilasi che agisce decarbossilando il carbonio aminoacidico (carbonio che porta sia il gruppo amminico sia il gruppo carbossilico).

Un'altra via di biosintesi del GABA è attraverso la via delle ammine biogene (Putrescina, Spermina e Spermidina) in cui nel primo step di biosintesi si parte dall'Ornitina e l'Ornitina decarbossilasi che ha la funzione di decarbossilare l'Ornitina, trasformandola in Putrescina ovvero il diamminobutile. Poi dalla Putrescina si arriva alla Spermidina dove si lega un'altra catena a tre fino ad arrivare alla Spermina. La Putrescina comunque può subire degradazione ossidativa di uno dei gruppi amminici formando il 4-amminobutanale che per ossidazione del gruppo aldeidico dà origine all'acido gammaamminobutirrico.

Dall'altra parte sempre l'Ornitina può subire una deaminazione ossidativa tramite l'ornitina delta-amminotransferasi che trasforma il terminale amminico in terminale aldeidico da cui sempre per ossidazione dell'aldeide si ottiene l'acido glutammico e per decarbossilazione di questo il GABA.

Quindi, la biosintesi a livello del neurone può avvenire tramite queste due vie, strettamente interconnesse tra di loro.

Il Sistema Gabaergico (metabolismo del GABA)



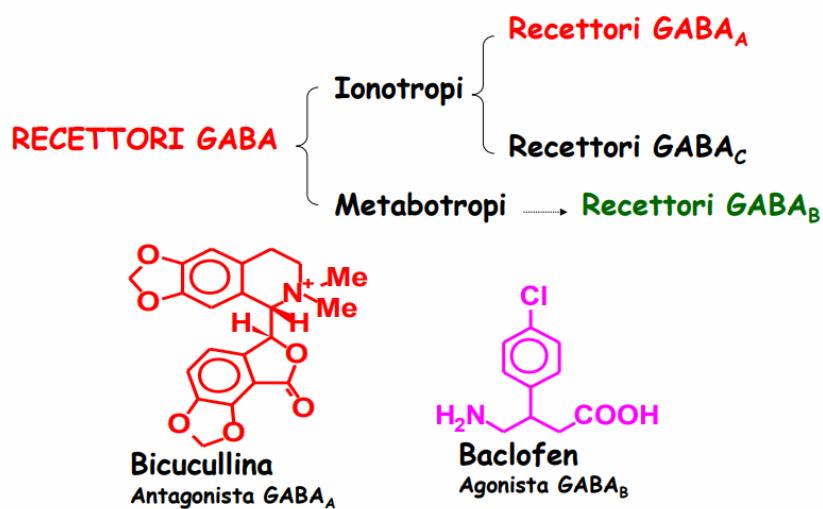
subire ossidazione a carico della deidrogenasi che forma dal gruppo aldeidico il secondo gruppo acido, trasformandolo in acido succinico. Nel caso del GABA quindi si hanno sia il reuptake sia enzimi che degradano principalmente il terminale ammidico.

Come viene terminata l'azione del GABA?

Anche il GABA ha un suo trasportatore (indicato con GAT₁₋₃) e subisce il reuptake. Lo stesso GABA poi può subire una deamminazione del terminale ammidico in aldeide a carico della GABA-T (T sta per transaminasi) che è anche il target di agonisti indiretti del GABA.

L'acido succinilaldeidico (un terminale rimane acido, l'altro è in forma di aldeide) può subire da un lato una riduzione del gruppo aldeidico e si forma l'acido γ -idrossibutirrico oppure può

Recettori GABAergici (classificazione)



La classificazione dei recettori del GABA è stata resa possibile dalla scoperta di molecole che agiscono selettivamente nei confronti un recettore rispetto ad un altro.

È stato facile trovare molecole selettive per il GABA_A rispetto al GABA_C e rispetto al GABA_B perché ci sono strutture molto diverse che agiscono su questi tre recettori.

GABA_A e GABA_C sono recettori canali ionotropi, mentre il GABA_B è l'unico che si accoppia con proteina G.

Sono state scoperte delle molecole

naturali tra cui la Bicucullina, estratta da una pianta, che è un antagonista competitivo del GABA_A ma non ha un'azione sul GABA_B né sul GABA_C. Come antagonista competitivo agisce sullo stesso sito dove agisce il GABA, mentre la maggior parte delle molecole che saranno oggetto di trattazione agiscono su siti di modulazione allosterica, cioè non agiscono sullo stesso sito dove interagisce il neurotrasmettore endogeno GABA.

Ci sono dall'altra parte anche molecole che agiscono sul GABA_B senza avere effetti sul GABA_A. Ad esempio, inserendo in posizione β del GABA il paraclorobenzene (detto per questo motivo Baclofen) viene mantenuta l'attività agonista nei confronti del GABA_B mentre non ha nessuna attività sul GABA e sul GABA_C.

(farmacologia dei recettori GABA_A e GABA_C)

Ligando ^a	Recettore GABA _A	Recettore GABA _C
Bicucullina	Antagonista	Inattiva
Baclofen	Inattivo	Inattivo
Picrotoxinin	Antagonista	Antagonista
TACA	Agonista	Agonista
CACA	Inattivo	Agonista
TAMP	Debole agonista	Agonista
CAMP	Inattivo	Agonista
Muscimol	Agonista	Agonista parziale
Isoguvacina	Agonista	Debole antagonista
THIP	Agonista	Debole antagonista
TPMPA	Inattivo	Antagonista

GABA_C. C'è una tossina ovvero la Picrotoxinina (molecola naturale) che invece ha un'azione antagonista sia sul recettore GABA_A sia sul recettore GABA_C. Per esempio, l'acido cis-4-amminocrotonico è solo agonista del GABA_C, mentre è inattivo sul GABA_A.

Quindi, ci sono sia molecole naturali sia di sintesi che sono servite come strumenti di indagine farmacologica per distinguere l'attività sui due tipi di recettori. Per esempio, il Muscimolo è un agonista sul GABA_A mentre è un agonista parziale sul GABA_C.

Riguardo l'attività di alcune molecole nei confronti di GABA_A e del GABA_C sono state trovate molecole che agiscono solo sul GABA_A o solo sul GABA_C; quindi, è stato possibile ottenere una selettività di azione di queste molecole nei confronti di questi sottotipi recettoriali.

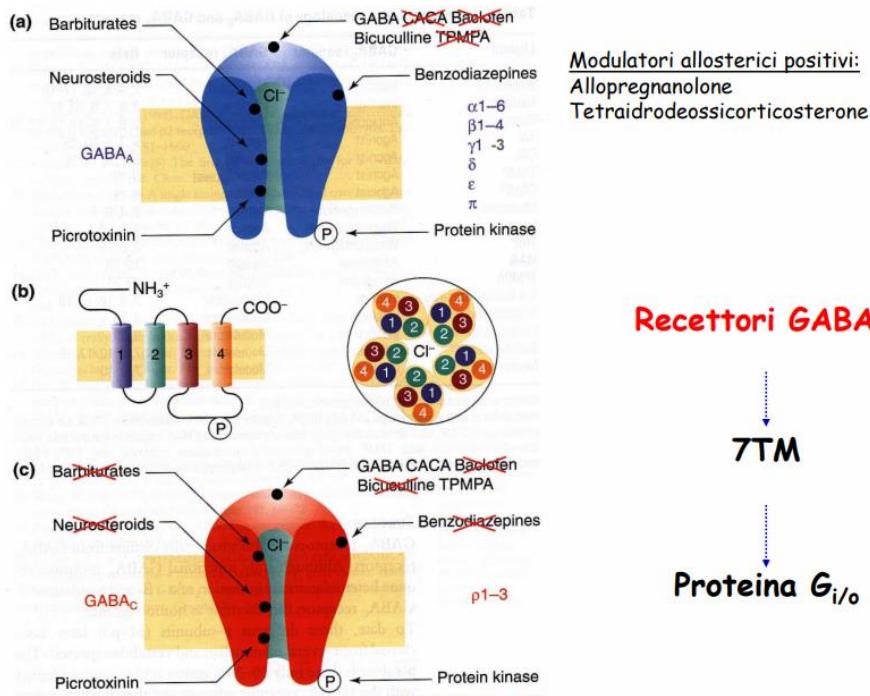
La Bicucullina è un antagonista del GABA_A ma è inattiva sul GABA_C. Il Baclofen agisce sul GABA_B risultando inattivo sia sul GABA_A sia sul

(farmacologia dei recettori GABA_A e GABA_C)

Ligando ^a	Recettore GABA _A	Recettore GABA _C
Benzodiazepine	Modulatori allosterici	Inattive
Triazolopiridazine	Modulatori allosterici	Inattive
Imidazopiridine	Modulatori allosterici	Inattive
Barbiturici	Modulatori allosterici	Inattivi
Neurosteroidi	Modulatori allosterici	Inattivi

Di nostro interesse sono i modulatori allosterici del recettore GABA, ovvero molecole che interagendo su un sito diverso dal sito ortosterico dove interagisce il GABA, danno origine ad una modulazione allosterica del recettore canale.

In particolare, benzodiazepine e barbiturici sono usate (soprattutto le benzodiazepine) come farmaci ansiolitici, ipnotici, anestetici, anticonvulsivanti (azioni inibitorie) perché danno una modulazione allosterica positiva del recettore GABA_A, cioè, interagendo con un sito diverso da quello ortosterico portano ad una modificazione conformazionale del recettore che fa aumentare l'affinità del GABA per il suo sito ortosterico (un esempio di modulazione allosterica positiva è proprio quello che riguarda le benzodiazepine sul recettore GABAergico). Anche le Triazolopiridazine, Imidazopiridine e l'etanolo sono modulatori allosterici positivi. Alla classe di neurosteroidi appartengono modulatori allosterici positivi o negativi. Tutti i modulatori allosterici hanno siti sul GABA_A ma non sul GABA_C; quindi, sono inattive sul GABA_C e sul GABA_B.



Sono rappresentati tre sottotipi recettoriali (tranne il $GABA_B$ che è un recettore a 7 eliche transmembrana accoppiato alla proteina G_i).

Il $GABA_A$ e il $GABA_C$ hanno dei siti di modulazione allosterica diversi fra loro. Il $GABA_A$ è un canale permeabile a ioni cloruro; quindi, il passaggio porta all'iperpolarizzazione di membrana e ad eventi inibitori. Tra le varie subunità che si riconoscono, quelle maggiormente rappresentate sono la alfa, la beta e la gamma. In particolare, le benzodiazepine che sono modulatori allosterici positivi non agiscono solo sulla subunità alfa dove c'è il sito per il GABA ma interagiscono maggiormente con una porzione che sta sulla subunità gamma.

Il recettore GABA oltre al sito ortostericio per il GABA (dove interagisce anche la Bicucullina perché da antagonista competitivo agisce sullo stesso sito del GABA) ha tanti altri siti tra cui quello per i barbiturici, quello per i neurosteroidi (due modulatori allosterici positivi endogeni del GABA sono l'Allopregnanolone ed il Tetraidrodeossicorticosterone) che hanno il sito di azione transmembrana perché sono molecole lipofile e possono raggiungere il luogo facilmente, quello per le benzodiazepine e quello per la Picrotoxina che è un antagonista non competitivo e quindi agisce su un sito diverso da quello ortostericio. Tutti questi siti tranne quello della Picrotoxina non sono presenti sul $GABA_C$ e non hanno nessuno effetto su questo sottotipo recettoriale. Le subunità che formano il $GABA_C$ sono di tipo γ , completamente diverse dalla alfa, beta e gamma del $GABA_A$.

I recettori canali appena visti sono del gruppo 1 (come il recettore nicotinico) e presentano ogni subunità con 4 segmenti transmembrana, una porzione amminica e carbossilica extracellulare e un poro canale delimitato dal residuo transmembrana 2 di ogni subunità. Quindi la parete del canale è tappezzata da questo residuo transmembrana.

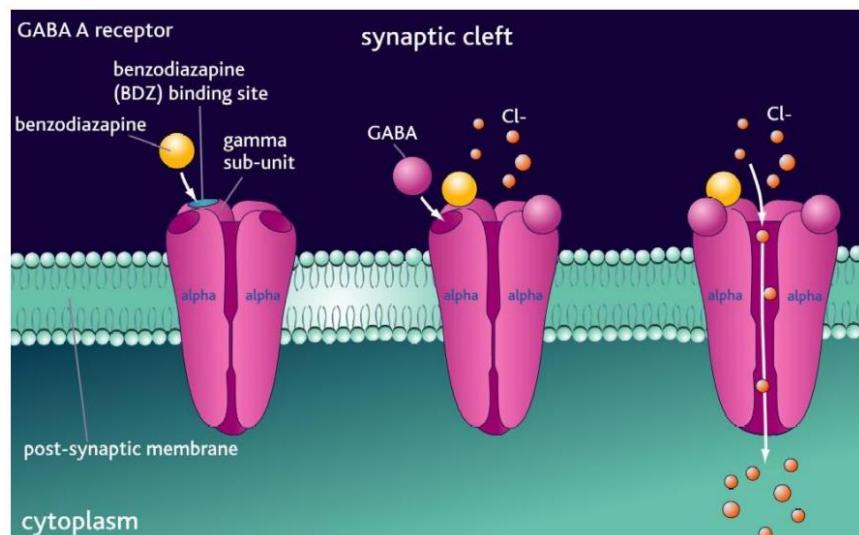
Nel caso dei recettori nicotinici, dove si aveva la permeabilità al calcio, nella parete del canale c'erano amminoacidi carichi negativamente a pH fisiologico (aspartato e glutammato). In questo caso, poiché si ha la permeabilità agli ioni cloruro, la parete del canale è tappezzata da amminoacidi che sono protonati a pH fisiologico, come lisine e arginina che pompano lo ione cloruro verso l'interno (a livello intracellulare) in seguito all'apertura del canale. Quindi, si ha l'appartenenza come il recettore nicotinico alla classe 1 per quanto riguarda la struttura ma ci sono delle differenze dovute al fatto che il recettore nicotinico è permeabile a cationi mentre il recettore $GABA$ è permeabile ad anioni.

Dato che i farmaci maggiormente usati per questo sistema recettoriale sono le benzodiazepine, ci concentreremo perlopiù su queste e faremo qualche piccolo riferimento ad altre molecole.

Meccanismo d'azione delle benzodiazepine

Innanzitutto, le benzodiazepine non agiscono sul sito ortostericoo, ma sono modulatori allosterici positivi del recettore, tant'è che spesso il sito di interazione delle benzodiazepine viene definito: **recettore GABA/BZ** (benzodiazepine). Questo perché la classificazione del loro meccanismo d'azione non è stata da subito chiara. Una volta chiarito il loro meccanismo d'azione si è capito che, mentre il GABA agisce su due siti presenti sulle **subunità α** del recettore GABA A, le benzodiazepine agiscono su un sito che è presente sulla **subunità γ** .

Quando la benzodiazepina interagisce con il sito di modulazione, l'interazione determina una modificazione conformazionale del canale tale per cui il GABA risulta avere una maggiore affinità e si lega maggiormente al sito ortostericoo sulla subunità α . L'apertura del canale porta all'ingresso degli ioni cloruro e quindi poi alla cascata di eventi che determina prevalentemente **l'azione inibitoria** da parte di queste molecole.



Classificazione

Sono state trovate diverse subunità:

- Le **subunità α** sono 6
- Le **subunità γ** vengono indicate con le lettere A B e C.
- Ci sono 6 diverse **subunità β**

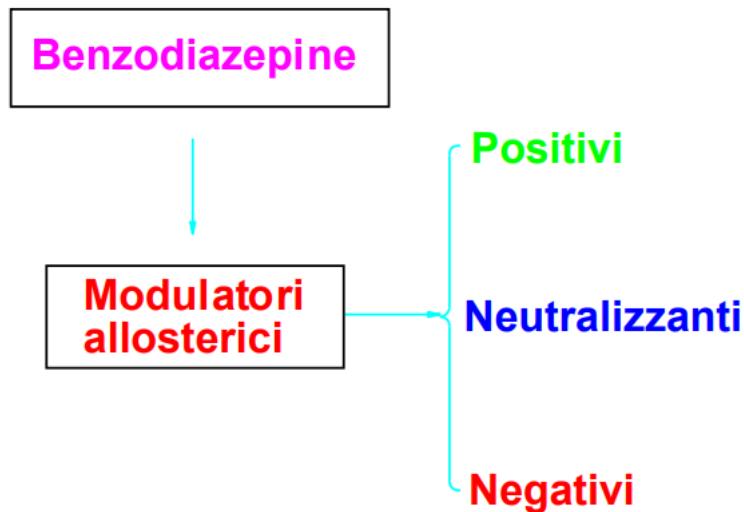
Inizialmente le benzodiazepine erano state classificate come agonisti del recettore GABA. Questa classificazione è sbagliata se si considera come recettore GABA il suo sito ortostericoo. Se invece si considera il sito di modulazione allosterica del GABA, cioè quello sulla subunità γ , allora in quel caso è corretto parlare di **agonisti** verso questo sito. Quindi è possibile trovare anche delle molecole che agiscono come **antagonisti** e

Recettori GABA_A (benzodiazepine)

Benzodiazepine

Agonisti ($\alpha > 0$)
Antagonisti ($\alpha = 0$)
Agonisti inversi ($\alpha < 0$)

anche come **agonisti inversi**. Questi ultimi, legandosi a questo sito, danno un'azione opposta a quella delle benzodiazepine.



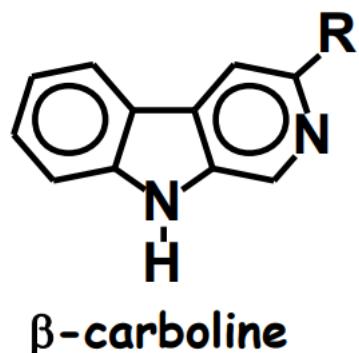
Considerando quindi solo il sito chiamato GABA/BZ, si può parlare di agonisti e antagonisti e agonisti inversi. Ma se si guarda al recettore nel complesso si parla di:

- modulazione allosterica positiva, data dagli agonisti
- modulatori cosiddetti neutralizzanti, che sono gli antagonisti per il sito delle benzodiazepine
- gli agonisti inversi che sono modulatori allosterici negativi

Per intenderci, in assenza di GABA, la benzodiazepina, interagendo con il suo sito allosterico, non dà nessun effetto. Essa agisce solo in presenza del neurotrasmettore endogeno e di suo non fa nulla, semplicemente modula in maniera positiva l'interazione del GABA per il recettore.

Il modulatore allosterico neutralizzante, cioè quello che per il recettore delle benzodiazepine è chiamato antagonista, è una molecola che agisce sul sito delle benzodiazepine senza dare né modulazione allosterica positiva né negativa. Quindi è importante nel caso di assunzione di un sovradosaggio di benzodiazepine, ad esempio nei tentati suicidi. In questo caso si usa un antagonista del sito delle benzodiazepine che di suo non farebbe nulla se somministrato in assenza di benzodiazepina, ma se c'è, la spiazz dal suo sito. Un esempio è il **flumazenil**: farmaco salvavita che serve per spiazzare le benzodiazepine dal loro sito in caso di sovradosaggio. È un modulatore allosterico neutralizzante, cioè se somministrato in assenza di Benzodiazepine non dà nessun effetto sul GABA.

Gli **agonisti inversi** sono delle molecole che, agendo come tali sul sito delle benzodiazepine, provocano una modulazione allosterica negativa. Queste molecole sono ad esempio le **β-carboline**. Avendo il GABA un'azione inibitoria, questi agonisti inversi provocano una stimolazione con azione pro-convulsivante ed ansiogena; cioè, causano gli effetti opposti a quelli del GABA. Se sono agonisti inversi per il sito delle benzodiazepine, vuol dire che se vengono somministrati in presenza di benzodiazepine e di GABA, sono in grado di spiazzare la benzodiazepina e di revertire la sua azione portando da un'azione ansiolitica ad ansiogena. Quindi è ovvio che non sono farmaci. Questa è la struttura generale, poi vedremo alcune β-carboline e come viene modificato R per avere un'azione di modulazione allosterica negativa.



Tutti gli agonisti, quali anche le benzodiazepine, sono usati in quanto hanno azione:

- sedativa
- ansiolitica
- anticonvulsivante
- inducono il sonno
- potenziato l'effetto dell'alcol, che è un altro modulatore allosterico positivo
- amnesia, cioè, diminuiscono la memorizzazione e danno perdita di memoria.

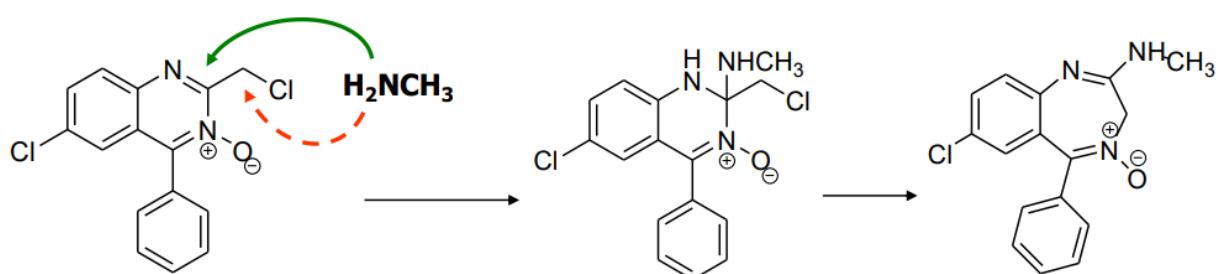
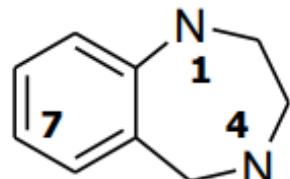
Ci concentreremo sui modulatori allosterici positivi quindi sulle benzodiazepine, in quanto sono le molecole usate in terapia.

Scoperta e caratteristiche delle benzodiazepine

Le benzodiazepine sono il tipico esempio di scoperta casuale di un farmaco, questo perché si stava cercando di sintetizzare un'altra molecola a partire da **chinazoline N-ossido**. Con la prima sintesi si capirà meglio questo meccanismo inaspettato che ha dato origine alle benzodiazepine. Esse sono tra i farmaci più abusati e vengono anche definiti **tranquillanti minori**, considerando che i neurolettici vengono definiti tranquillanti maggiori. Si tratta di dizioni un po' vecchie quelle di tranquillanti maggiori e minori, ma in alcuni testi si trovano anche scritte come tali. Le benzodiazepine sono usate soprattutto come **ansiolitici** e, dato che hanno azione di induzione del sonno, anche come **sedativi ipnotici**. Inoltre, hanno un'azione **miorilassante** e **anticonvulsivante** che è molto importante. Infine, sono usati anche come **anestetici** esattamente come i barbiturici.

Si chiamano benzodiazepine in quanto costituite dalla diazepina, che è l'anello a 7 dove gli azoti sono in posizione 1 e 4.

Il capostipite della serie è il **Clordiazepossido**, che però successivamente è stato modificato per ottenere le benzodiazepine maggiormente usate. Così chiamato perché ha anche un gruppo **cloro**, in posizione 7 dove ci sono la maggior parte dei sostituenti delle benzodiazepine. Diazepossido in quanto è un **diazo**, ma ha anche un **gruppo N-ossido** che non c'è in nessun'altra benzodiazepina. La maggior parte delle benzodiazepine in terapia, a parte il clordiazepossido, manca dell'N-ossido in quanto in vivo questo gruppo viene anche ridotto quindi non è importante.



Clordiazepossido

Il ricercatore che ha scoperto le benzodiazepine è Sternbach che nel 1955 fece questa reazione e stava cercando dei composti ansiolitici. Egli voleva inserire il **gruppo metil-amminico** sulla catena laterale della **clorometilchinazolina N-ossido**. Il suo obiettivo era quello di inserire un gruppo amminico in catena laterale sulla chinazolina N-ossido tramite una sostituzione nucleofila sull'alogenuro. Però, per la presenza della carica positiva sull'N, il C adiacente all'N-ossido è reso molto elettropositivo. Ecco perché l'attacco del doppietto della metilammina non avviene preferenzialmente sull'alogenuro, ma sul C adiacente all'N-ossido e il gruppo metilamminico si lega sull'anello e non in catena laterale. Dopodiché N attacca il C dell'alogenuro e si ha un allargamento dell'anello chinazolinico a 6 termini ad un anello a 7. In questo modo si forma una benzodiazepina N-ossido sostituita con una metilammina. Qui la reazione è stata fatta in 2 passaggi ma avviene in un unico step.

È importante vedere le SAR in quanto di benzodiazepine ne esistono molte e vengono classificate sulla base della durata di azione:

- Quelle usate come anestetici e induttori del sonno devono avere una breve durata d'azione
- Quelli ad azione ansiolitica e anticonvulsivante devono avere una durata d'azione più lunga

SAR delle benzodiazepine

Vediamo ora le caratteristiche strutturali.

La struttura generale viene dal nome del biciclo principale che è la benzodiazepina. Tutte le benzodiazepine hanno anche un fenile presente nella molecola; quindi, gli anelli in realtà sono 3, indicati con le lettere A B e C. La numerazione parte dall'anello diazepinico. L'azoto

è in 1 e in 4, in 5 c'è l'altro anello inserito. In posizione 7 normalmente c'è un sostituente. Anche l'anello C, il secondo anello aromatico, può essere sostituito e normalmente i sostituenti sono in posizione 2'. Le benzodiazepine non sono esattamente identiche al clordiazeposido, bensì lo scheletro a cui afferiscono tutte è questo. Il nome chimico è **5-fenil-1,4-benzodiazepin-2-one**, perché in 2 c'è un carbonile e poi sono tutte sostituite con un anello aromatico in 5.

Vediamo quali sono i requisiti strutturali importanti affinché ci sia interazione tra la benzodiazepina e il sito che sta sulla subunità γ , cioè il sito di modulazione allosterica dove interagisce.

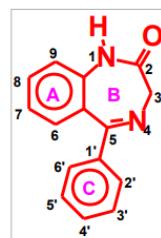
Intanto, l'anello aromatico A e l'adiacente anello diazepinico, devono giacere sullo stesso piano. Nel clordiazeposido si vede bene, data la presenza dell'anello, e dei due doppi legami sp₂, la struttura è planare. L'unica porzione che non è coplanare è quella in posizione 3. Quindi in questo caso tutta la struttura benzodiazepinica è per forza planare in quanto ci sono due doppi legami coniugati all'anello. Qui invece, considerando il gruppo ammidico si pensa che questo sia costituito da legami semplici. In realtà grazie al fenomeno della risonanza, è rappresentabile anche con la forma a doppio legame tra N e C. Quindi anche nel caso delle benzodiazepine diverse dal clordiazeposido è importante il **requisito di coplanarità** e anche quando si mettono dei sostituenti questo requisito deve essere mantenuto. Dato che l'anello aromatico e il carbonile interagiscono con il recettore, devono essere sullo stesso piano, cioè coplanari. Quindi hanno delle direzioni ben specifiche. In particolare:

- Il carbonile interagisce con un **legame ad H con un'istidina**. È importante che l'ossigeno sia sullo stesso piano dell'anello aromatico, proprio per la direzionalità di questo legame.
- L'anello aromatico dà dei **legami π/π con una fenilalanina**.

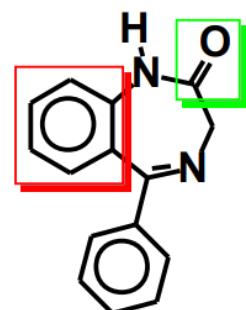
Questi sono i due residui amminoacidici più importanti nell'interazione della benzodiazepina con il sito di modulazione allosterica.

L'anello A aromatico non viene mai rimosso, al massimo si possono avere delle sostituzioni bioisosteriche, ma sono pochi i derivati con degli anelli bioisosterici. Normalmente c'è un anello aromatico sostituito in posizione 7 e i sostituenti principali sono gruppi elettronegativi quali alogeni, nitrogruppi e il trifluorometile.

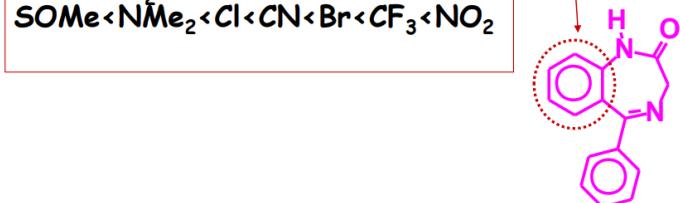
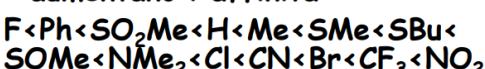
Recettori GABA_A (SAR: benzodiazepine)



Struttura generale del sistema benzodiazepinico
5-fenil-1,4-benzodiazepin-2-one



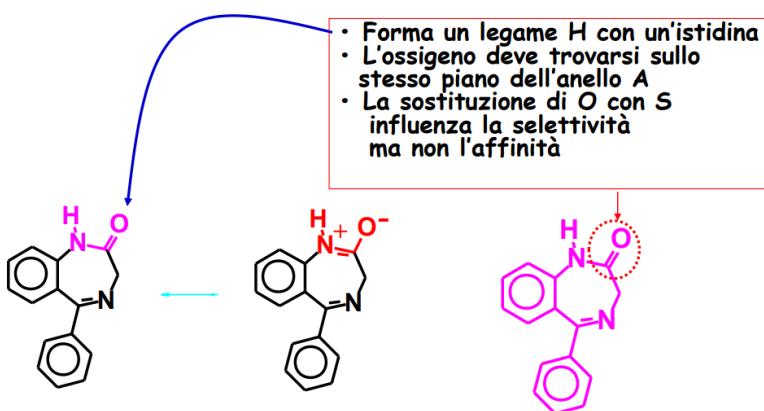
- **Interazione π/π con il recettore**
- **Effetto dei sostituenti non prevedibile**
- **Sostituenti elettronegativi in 7 aumentano l'affinità:**



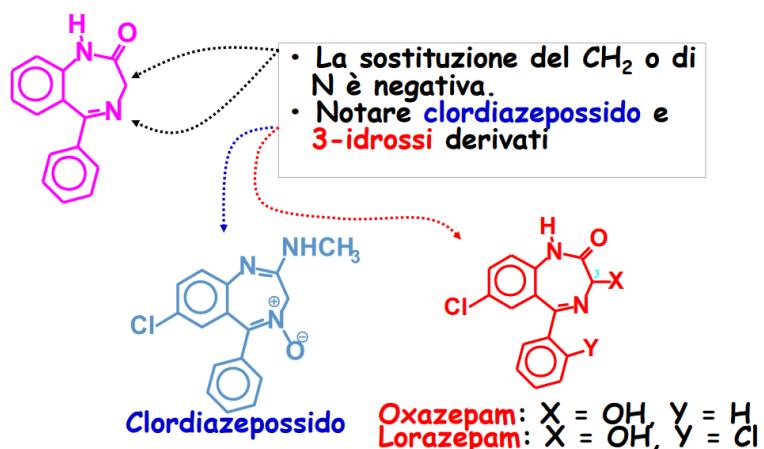
Nelle benzodiazepine non è indispensabile avere il doppio legame stabile del cloro diazepossido, in quanto tutte presentano il gruppo ammidico.

Inoltre, esso presenta un gruppo metilamminico che ha i requisiti desiderati in quanto può formare un legame a H con un'istidina, così come fa il carbonile delle benzodiazepine che è un accettore di legami a H da parte dello stesso aminoacido.

Quindi, anche quando nel clorodiazepossido c'è un gruppo metilamminico, il legame è presente. Sebbene funzionino anche le tioammidi, in quanto la molecola di zolfo è in grado di dare legami a H con il recettore, normalmente in questa posizione c'è sempre un O e difficilmente si sostituisce con lo zolfo.



La posizione 3 è l'unica a non essere coplanare, infatti la punta in 3 può andare sia verso l'alto che verso il basso. In generale le benzodiazepine non sono sostituite in posizione 3 se non con gruppi ossidrilici, come i farmaci **oxazepam** e **lorazepam**, il famoso **tavor**.



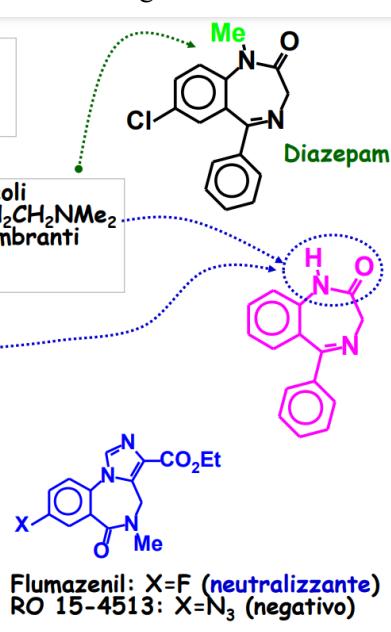
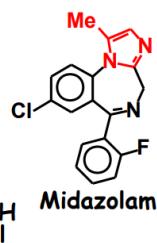
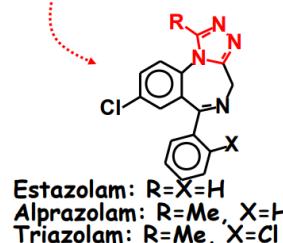
In posizione 1-2 è possibile avere gruppi diversi dall'ammide, come visto nel clorodiazepossido. Questi mantengono sia la possibilità di avere un gruppo coplanare all'anello perché deve interagire con l'istidina che la presenza del doppio legame che conferisce la coplanarità. Inoltre, è indispensabile avere il doppio legame in posizione 4-5.

In posizione 1-2 si possono inserire altri gruppi; infatti, sull'N si possono mettere gruppi alchilici ma di limitate dimensioni. Normalmente il metile è quello più presente, come ad esempio nel **Diazepam**. Quindi l'atomo di H sull'N non è fondamentale, infatti nella risonanza non c'è uno spostamento di massa ma di elettroni quindi si può rimuovere questo H e trasformarlo in metile.

Recettori GABA_A (SAR: benzodiazepine)

- L'alchilazione è permessa con piccoli sostituenti come Me, CH_2CF_3 o $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NMe}_2$
- L'alchilazione con sostituenti ingombranti (*t*-Bu) è negativa

L'anellazione con un ciclo ricco di elettroni conduce a composti attivi



In queste posizioni 1-2 si possono inserire anche degli altri gruppi, sempre dei cicli che mantengono la coplanarità, come il ciclo **metil-triazolico** nel **Triazolam** o **metil-imidazolico** come nel **Midazolam**. Quest'ultimo è il farmaco che si somministra endovenosa in caso di esami endoscopici quali, gastroscopie e colonoscopie, e il paziente non ricorda più nulla alla fine dell'esame. Normalmente questo farmaco si usa come anestetico, per cui ha una durata d'azione limitata e quindi il paziente riprende immediatamente conoscenza. Ma allo stesso tempo diminuisce la memoria, ecco perché il paziente non ricorda nulla. L'alchilazione è permessa ma non si possono mettere dei gruppi estremamente ingombranti, ad esempio se si mette un terbutile l'attività si perde. Quindi i possibili gruppi che si possono inserire sono imidazoli, triazoli, metile ed etile.

Vediamo alcune modificazioni:

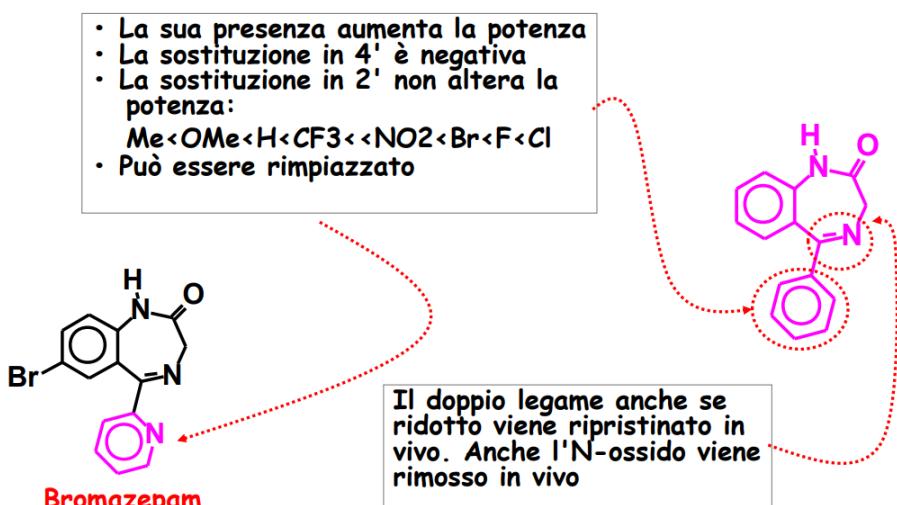
Qui sono riportati tutti agonisti del sito delle benzodiazepine, ovvero sono modulatori allosterici positivi del GABA. La struttura in blu è un po'diversa in quanto manca dell'anello C presente in tutte le benzodiazepine. In posizione 1,2 c'è un imidazolo sostituito con il carbossietile. Il gruppo in posizione 7 è un **fluoro**. Questo è il **Flumazenil**. Si tratta di un farmaco salva vita ed è un antagonista del sito delle benzodiazepine. Quindi in



caso di sovradosaggio, cioè di coma da benzodiazepine, le spiazza dal loro sito. Essendo un **antagonista** del sito delle benzodiazepine, nei confronti di tutto il recettore GABA viene definito **modulatore allosterico neutralizzante**, cioè in assenza della benzodiazepina, legandosi a quel sito, non dà né modulazione allosterica positiva né negativa del recettore GABA. Bisogna sempre vedere nel particolare cosa fa una molecola nel sito delle benzodiazepine ma anche considerare tutto il sistema recettoriale. Il percorso di studi poi è proseguito sui derivati del flumazenil andando a modificare il gruppo in 7. Questo **RO 15-4513** viene definito solo da una sigla e non è usato come farmaco. In questo caso, il gruppo in 7 è stato modificato mettendo al posto del fluoro un **gruppo azido, N3**. Si tratta di un **agonista inverso** del sito delle benzodiazepine, ovvero è un **modulatore allosterico negativo** del recettore del GABA. Quindi ha azione ansiogena e pro-convulsivante.

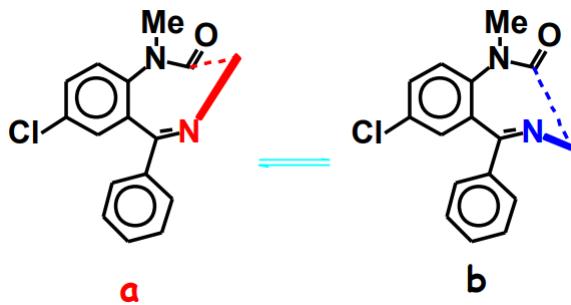
L'anello C è presente in tutte le benzodiazepine in posizione 5 e non può essere sostituito in posizione 4'. In alcune benzodiazepine non ci sono proprio i sostituenti su questo anello e dove ci sono la sostituzione avviene in 2'. Normalmente anche in questo caso i sostituenti sono degli alogenzi.

L'unico caso dove si ha un anello in C che non è un fenile ma è sostituito in 2' è il **Bromazepam**, dove, al posto di un anello aromatico, c'è una piridina, con N in 2'. In posizione 4-5 c'è sempre il doppio legame e ciò favorisce la co-planarità dell'anello A e B. Non ci sono benzodiazepine in terapia con il doppio legame 4-5 ridotto dentro l'anello B. Infatti, anche se questo viene ridotto in vivo viene ripristinato.

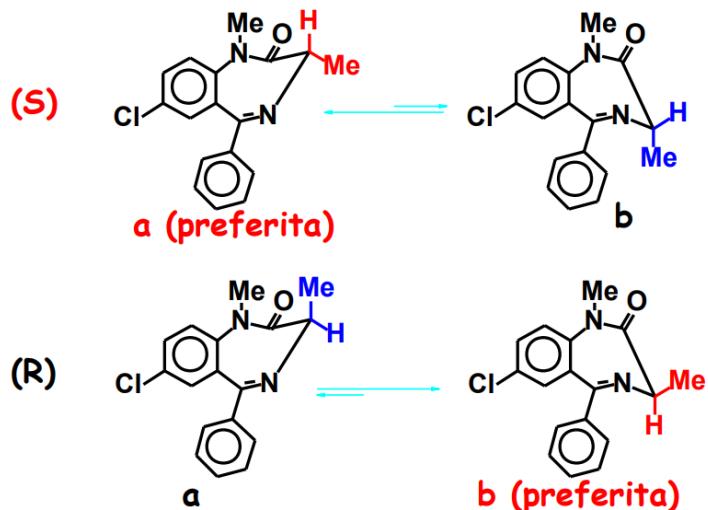


Aspetti stereochimici

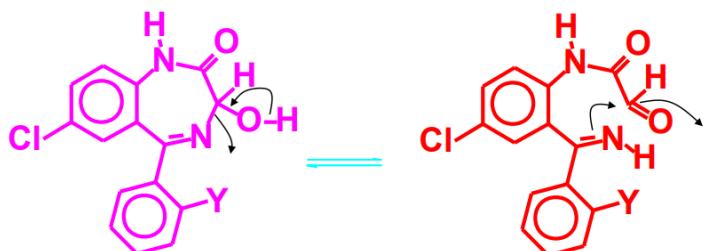
Se si considera la struttura della benzodiazepina si ha coplanarità della porzione 1-2,4-5 con l'anello A ma il C in 3 può trovarsi con la punta verso l'alto o verso il basso perché è un C sp³.



In posizione 3 l'unico sostituente che si può inserire è un gruppo OH, come nell'oxazepam. Infatti, quando si mette anche solo un piccolo sostituente tipo il metile l'attività diminuisce; ecco perché non ci sono delle benzodiazepine così sostituite. Mettendo un metile in 3 si forma un centro chirale quindi si ottengono la configurazione R e S. Dato che la punta si può mettere sia in basso che in alto, si possono avere poi due forme, cioè il metile in assiale o in equatoriale sia nell'S che nell'R. La stereochimica non è fondamentale ma la conformazione preferita è quella dove il metile è in posizione equatoriale, questo vale per entrambi gli enantiomeri.



Quando è presente un OH anche esso può assumere la posizione assiale ed equatoriale. In questo caso non è importante smistare gli enantiomeri (ad esempio nell'oxazepam) perché il C aminalico (si tratta di una **carbinolammina**) in vivo si apre e si chiude continuamente. La forma aperta è quella del gruppo amminico e dell'aldeide; quindi, quando poi si chiude (o da sotto o da sopra) è in continuo equilibrio con la forma aperta. Ecco perché non ha senso separare gli enantiomeri, in quanto in vivo racemizza.

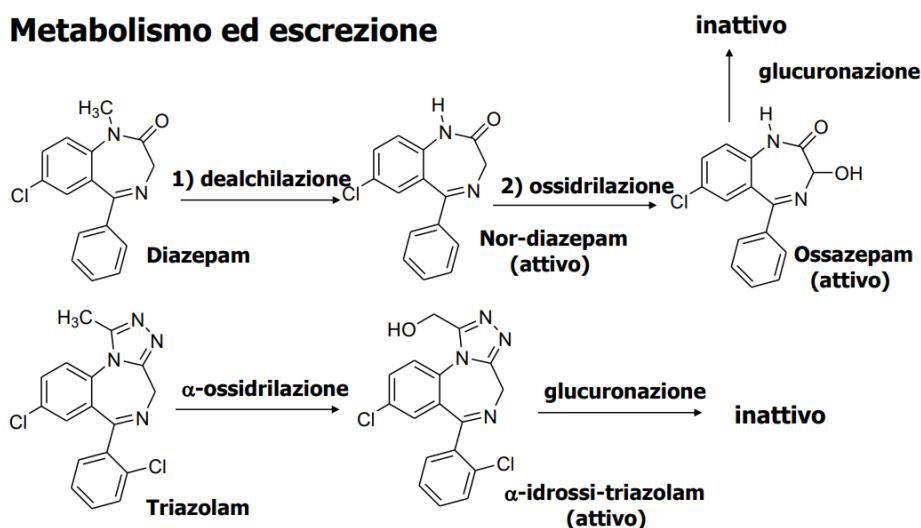


Metabolismo delle benzodiazepine

Sono presi in considerazione alcuni esempi delle benzodiazepine con vari gruppi e sostituenti per vedere come vengono metabolizzate.

DIAZEPAM

Metabolismo ed escrezione



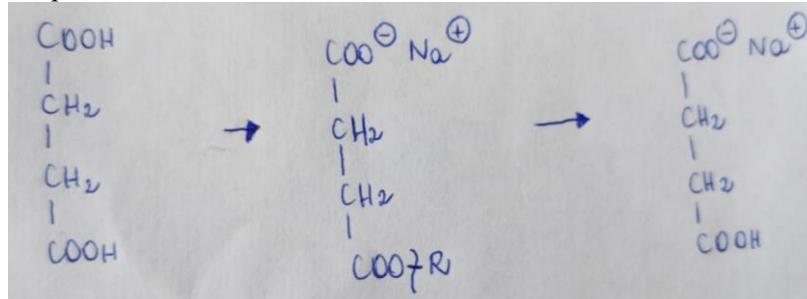
reazioni mantengono l'attività. L'OH è poi quello che subisce la **glucurono-coniugazione** in fase 2, infatti la maggior parte delle benzodiazepine vengono eliminate in forma di glucorono-coniugati.

TRIAZOLAM

Anche il triazolam, che ha l'anello metiltriazolico, dà origine ad ulteriori metaboliti. Si può avere l'**ossidrilazione** del CH₃ che mantiene l'attività della molecola. Poi questo OH è un centro di metabolismo di fase 2, cioè di **glucurononconiugazione**, quindi avviene l'inattivazione della molecola.

Talvolta in molte delle benzodiazepine c'è un gruppo nitro che viene ridotto a NH₂ durante il metabolismo

Un altro aspetto importante dei derivati con l'OH, è che questo può essere utile per derivatizzare le benzodiazepine. In alcuni casi vengono formulate in forma di **emisuccinato**. Cioè, si prende un acido bicarbossilico e una funzione acida serve per esterificare l'OH (per esempio del lorazepam o oxazepam); quindi, solamente uno dei due gruppi carbossilici viene esterificato. Mentre l'altra funzione viene salificata in forma di sale sodico. Questo permette una migliore solubilizzazione della benzodiazepina in soluzione acquosa. Ovviamente poi in vivo le esterasi ematiche liberano l'estere quindi si ripristina il gruppo alcolico e la benzodiazepina attiva. È detto emisuccinato perché solo con uno dei due gruppi carbossilici della molecola si fa l'estere, l'altro serve per la salificazione.

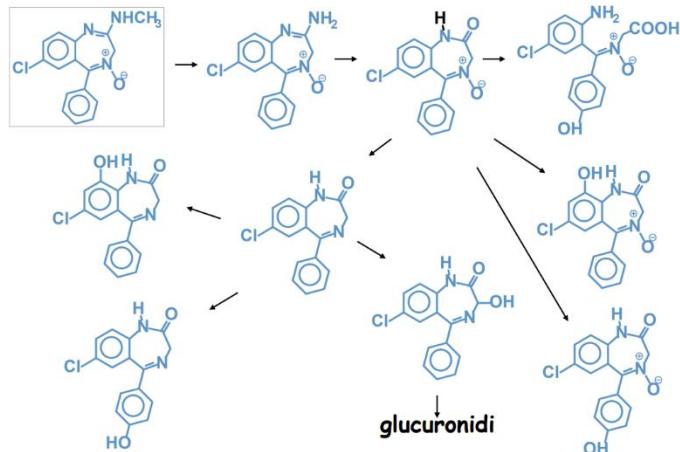


Nel caso del diazepam, quello con il metile in posizione 1, si ha la **N-dealchilazione** metabolica che porta ad un composto attivo, in quanto in posizione 1 può esserci sia il metile che l'H e l'attività viene comunque mantenuta. Poi l'anello benzodiazepinico subisce **ossidrilazione** in posizione 3. Questo dà origine all'ossazepam, che è una benzodiazepina attiva. Quindi entrambe le

Metabolismo del clorodiazeposido

Il clorodiazeposido presenta molti metaboliti:

- C'è la demetilazione del gruppo metilamminico in posizione 2.
- Anche l'anello si apre portando alla formazione del gruppo amminico e carbossilico.
- Si ha la riduzione del N-ossido e si ripristina il gruppo imminico di tutte le benzodiazepine.
- Il gruppo N-ossido viene ridotto
- Si ha l'ossidrillazione in posizione 3. Questa reazione, che dà sempre composti inattivi, può avvenire anche sul C in posizione 4'e in posizione 9 dell'anello A
- Tutti i metaboliti dove sono stati inseriti dei gruppi alcolici possono dare vita a corrispondenti glucuronidi per glucuronoconiugazione

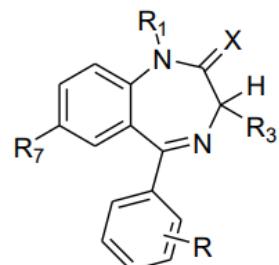


L'importante è ricordare le benzodiazepine principali: clorodiazeposido, triazolam, midazolam, ossazepam e diazepam.

Alcuni esempi

Sulla base dei vari gruppi sostituenti sulla molecola, le benzodiazepine possono avere una diversa durata di azione, indicata come intermedia, lunga o breve. La breve durata di azione coinvolge le molecole che devono essere utilizzate come induttori del sonno; infatti, non bisogna rimanere con una prolungata azione sedativa e ipnotica anche il giorno dopo. Invece le molecole che hanno azione ansiolitica, devono avere una durata di azione intermedia o più lunga.

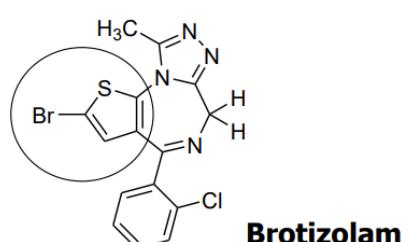
Il **Midazolan** che normalmente si usa nell'induzione del sonno, come anestetico per fare esami, ha una breve durata di azione proprio grazie ai suoi sostituenti che ne influenzano l'attività.



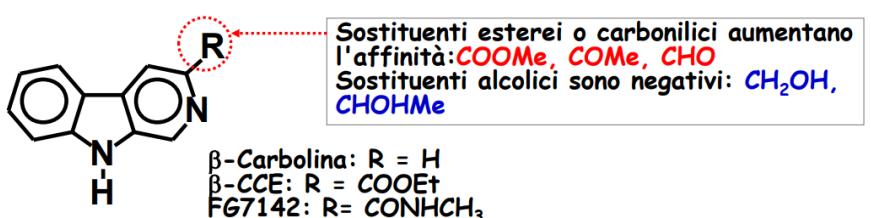
Nome	R'	X	R ₃	R ₇	R _{2'}	t _{1/2}
midazolam	CH ₃	CH	H	Cl	F	S

Nel **Flumazenil** viene eliminato l'anello aromatico in posizione 5 e si è inserito un gruppo carbossi-etilico sull'anello imidazolico.

Il **Brotizolam** è una molecola dove c'è una sostituzione bioisosterica dell'anello A con un **bromotiofene**. Le benzodiazepine dove l'anello A è sostituito in posizione 7 con sostituenti bioisosterici non sono però molte. Il nome del farmaco richiama la struttura.



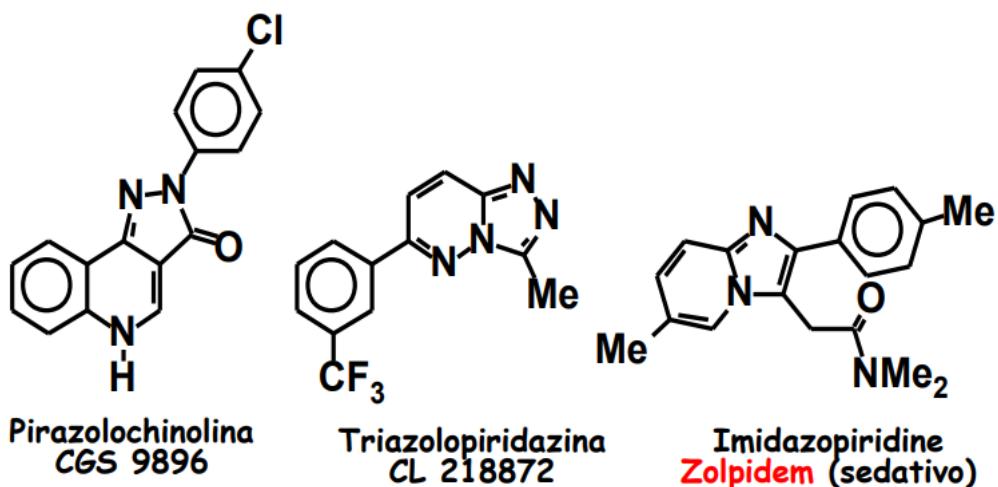
Oltre alle strutture di modulatori allosterici positivi e neutralizzanti, ci sono gli agonisti inversi del sito delle benzodiazepine che sono modulatori allosterici negativi del recettore GABA. Alla classe di questi ligandi, appartengono le **β-carboline**



che hanno una struttura diversa da quelle viste fino ad ora. Queste agiscono andando sul sito delle benzodiazepine senza però avere la loro struttura. Ciò vuol dire che questo sito può essere attivato, antagonizzato e legare agonisti inversi con strutture anche diverse dalle stesse benzodiazepine. Questi ligandi β -carbolinici si comportano da agenti convulsivanti. Normalmente, il sostituente R è o un gruppo estereo o un chetone o un'aldeide, perché è indispensabile la presenza di un gruppo carbonilico. Nel caso del **FG7142** c'è anche la presenza di un gruppo ammidico ma il carbonile deve essere sempre presente per dare l'attività. Ovviamente non sono usati come farmaci.

È importante sapere che sul sito delle benzodiazepine, agiscono anche altre strutture con azione di modulazione allosterica positiva. Si comportano come ligandi identici alle benzodiazepine seppur avendo strutture diverse. Queste tre molecole sono tutte agonisti del sito delle benzodiazepine, quindi, hanno azione sedativa e sono:

- **Triazolopiridazina**
- **Pirazolochinoline.**
- Un'altra classe importante è quella delle **imidazo-piridine**. Si chiamano così perché c'è un imidazolo fuso ad un anello piridinico. Attualmente in terapia c'è solo lo **Zolpidem**.



Sintesi di alcune benzodiazepine

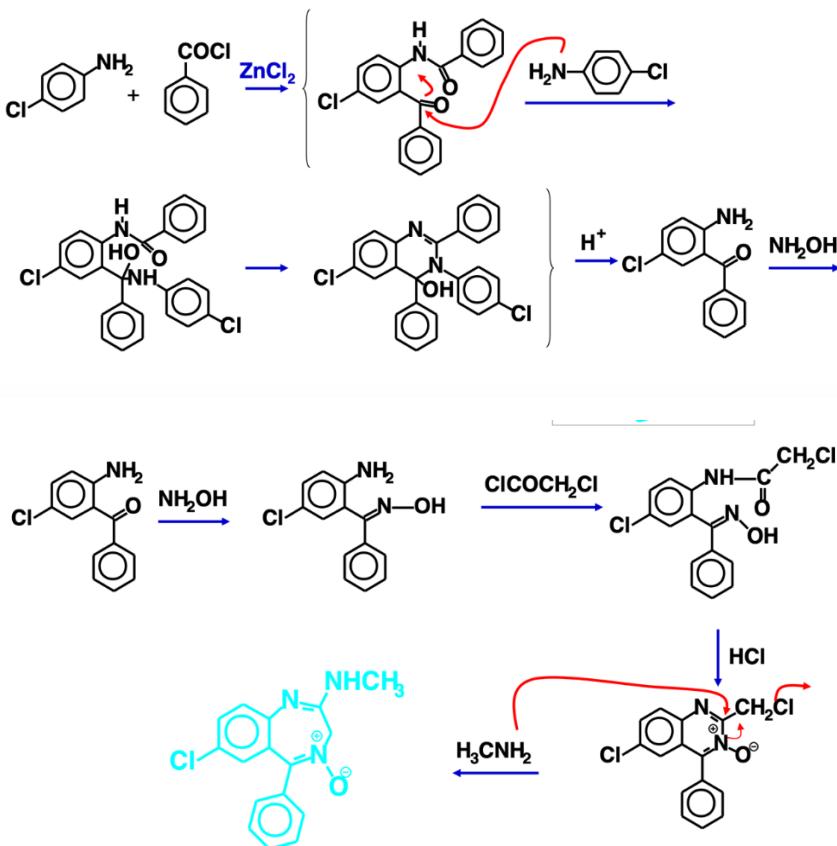
Vediamo la sintesi di:

- 1) Clordiazeposido: Primo ad essere sintetizzato, frutto di un'inaspettata reazione di allargamento dell'anello chinazolinico
- 2) Oxazepam: Presenta gruppo OH in posizione 3
- 3) Diazepam: Presenta l'azoto sostituito con un metile
- 4) Triazolam: Presenta ciclo metilpirazolico fuso in posizione 1,2

(Una parte della reazione è comune e tutte e quattro).

Sintesi del clordiazeposido

Clordiazeposido (Librium®; 7-cloro-2-metilammino-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-4-ossido): Tranquillante: 10-40 mg al giorno per via orale



La sintesi del clordiazeposido inizia con la formazione dell'anello benzodiazepinico. Questo si forma attraverso una reazione inaspettata, dato che l'obiettivo originale era eseguire una reazione di sostituzione in catena laterale su un alogenuro alchilico con una metilammina. Invece, si è verificato un allargamento dell'anello chinazolinico, che è diventato benzodiazepinico.

La prima reazione è contemporaneamente una reazione di ammidazione e acilazione di Friedel-Craft in cui si parte da un'anilina opportunamente sostituita che reagisce con il cloruro di benzoile. Questa reazione si fa in ambiente di acido di Lewis e si usa lo zinco cloruro. Oltre ad avere la reazione di ammidazione con cui formo

l'anilide, abbiamo anche l'attacco dello ione benzilonio che si ottiene grazie alla presenza dell'acido di Lewis sull'anello aromatico e si forma quindi il **benzofenone**.

Si lavora in eccesso dell'anilina (paracloroanilina), che attacca il carbonile del benzofenone dando origine a una carbinolammina. Questa però non rimane così, ma avviene un ulteriore attacco sul carbonile adiacente, con chiusura dell'anello e formazione della chinazolina (è una diidrochinazolina senza doppio legame).

In ambiente acido abbiamo due legami che si rompono facilmente: legame immidico (che ripristina la corrispondente ammina e il carbonile) e il legame carbinolamminico (che si idrolizza per dare origine al carbonile e liberazione della anilina).

Quello che si ottiene in ambiente acido è quindi il benzofenone sostituito in orto con un gruppo amminico e in meta con il cloro iniziale. (In pratica quindi dalla reazione finale ottengo l'acilazione di Friedel-Craft in orto rispetto all'anilina per ottenere il benzofenone).

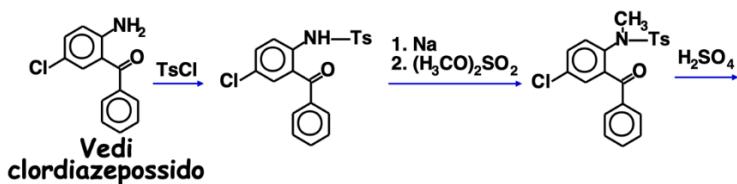
Ora questo benzofenone lo faccio reagire con l'idrossilammina: il carbonile in presenza dell'idrossilammina mi permette di ottenere la corrispondente ossima, che reagisce con un composto bifunzionalizzato, cioè il cloroacetilcloruro che ha sia l'alogenuro alchilico e sia acilico.

Il cloruro acilico da la reazione di ammidazione con il gruppo alchilico e si forma l'intermedio dell'ossima. In ambiente acido il carbonile viene attivato dall'H⁺ e si ha l'attacco dell'azoto ossimico sul carbonio ammidico. Tutto questo porta alla chiusura dell'anello ottenendo **chinazolina N-ossido** che è il punto di partenza per ottenere i composti ansiolitici caratterizzati dall'anello chinazolina N-ossido e catena laterale metilamminica. Per ottenere la catena laterale era stata funzionalizzata la posizione 3 della chinazolina N-ossido con l'alogenuro alchilico attraverso la reazione appena vista.

Inaspettatamente però, l'attacco del doppietto elettronico della metilammina che ci si aspetta avvenga sull'alogenuro non avviene, perché l'N-ossido rende carica positivamente la posizione ad esso adiacente che è resa ancora più reattiva per l'effetto elettron-negativo del cloro; quindi, favorevolmente l'NH₂ attacca il carbonio dell'anello chinazolinico n-ossido. In seguito all'attacco si apre l'anello e l'azoto a cui è stato sottratto la carica + diventa reattivo nei confronti di CH₂ in catena laterale, con la fuoriuscita dell'alogenuro alchilico. L'NHCH₃ si lega in posizione 2 dell'anello benzodiazepinico e il CH₂ viene attaccato dall'N-ossido con allargamento dell'anello che passa da 6 a 7 termini ottenendo l' 1,4-benzodiazepina.

Sintesi del diazepam

Diazepam (Valium®, Noan®; 7-cloro-1,3-didro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-one).
Tranquillante: per via orale o im alla dose di 2-10 mg, 2-4 volte al giorno



Per la sintesi del diazepam ho la stessa sintesi iniziale descritta prima per il clordiazepossido, perché devo sempre ottenere il 2-ammino-5-cloro-benzofenone. In questo caso però devo ottenere un gruppo metile in posizione 1 (l'azoto in 1 infatti può essere sostituito con gruppi non tanto ingombranti, si può anche inserire un ulteriore ciclo, l'importante è che venga mantenuta la coplanarità rispetto all'anello benzenico e che venga mantenuta anche la possibilità di dare dei legami idrogeno accettori con l'istidina).

Per inserire il metile sull'anilina, il metodo più semplice sarebbe fare una metilazione con acido formico e formaldeide, però questa reazione non si può fermare alla monometilazione perché procede verso la

dimetilazione (non va bene perché noi vogliamo inserire solo un metile). Quindi faccio reagire il gruppo anilinico con il cloruro di tosile (passo ad avere un gruppo solfonammidico con NH debolmente acido con un solo H che posso sostituire). In ambiente basico con sodio strappo il protone e metilo l'azoto con dimetilsolfato. Dopodiché in ambiente acido per acido solforico rompo la solfonammide e ripristino il gruppo anilinico sostituito con il metile.

Per quanto riguarda la chiusura dell'anello, questa è descritta in due modi:

- La via preferita prevede l'utilizzo dell'estere etilico del cloridrato di glicina (quella sotto nell'immagine). La glicina viene usata in forma di cloridrato in cui il gruppo amminico è salificato per evitare di avere delle reazioni intermolecolari, perché ho il gruppo carbossilico attivato come estere e quindi se lasciassi il gruppo amminico libero, questo può reagire con il gruppo carbossilico in forma esterificata di un'altra molecola di glicina.

La piridina fa sia da soviente che da base.

Mi serve come base per spostarmi in situ.

Il sale si prende l'acido cloridrico e si salifica e libera il gruppo amminico (libera la base).

Ricapitolando, il gruppo carbonilico del benzofenone subisce l'attacco del gruppo amminico formando un'immina, mentre il gruppo carbossilico attivato in forma di estere da l'ammide con il gruppo metilanilinico.

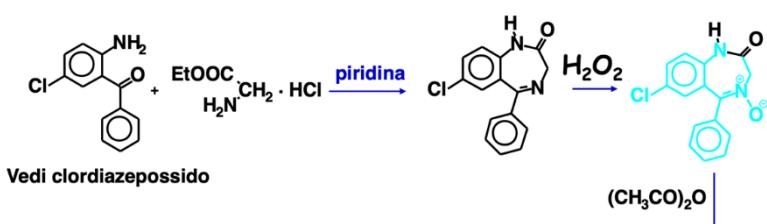
- L'altra strada prevede la reazione con cloroacetilcloruro, cioè un composto bifunzionalizzato, dove la funzione acilica reagisce con il gruppo amminico per dare la corrispondente ammide. La chiusura dell'anello avviene in presenza di esametilentetraammmina, che è la forma solida dell'ammoniaca. L'ammoniaca reagisce con il carbonile per dare l'immina e poi da sostituzione nucleofila con l'alogenuro.

Sintesi dell'oxazepam

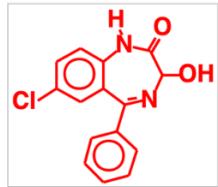
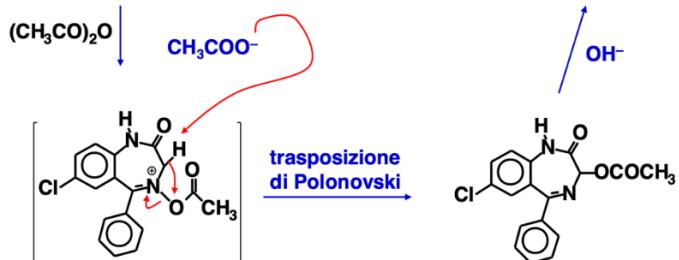
Si parte sempre dal benzofenone. In questo caso devo fare l'ossidrilazione in posizione 3. Il gruppo ossidrilico in posizione 3 ha un vantaggio: da glucuronoconiugazione. È un gruppo che permette di avere meno facilmente accumulo delle benzodiazepine (utile negli anziani, mentre nei bambini non si danno le benzodiazepine perché hanno effetti collaterali irreversibili sulla memoria).

L'OH inoltre può essere derivatizzato in forma di emisuccinato, dove una porzione della molecola può essere esterificata, il gruppo acido viene salificato e questo ne favorisce la solubilizzazione in soluzioni fisiologiche, utile per avere l'assunzione in gocce.

Oxazepam (Serpax®, Limbial®, Quen®, 7-cloro-1,3-didro-3-idrossi-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-one). Tranquillante leggero nelle varie forme di ansia specialmente nei pazienti anziani: per via orale alla dose di 10-30 mg



Recettori GABA_A (oxazepam)



L'anello viene chiuso con la glicina cloroidrato in piridina (come visto precedentemente con diazepam).

A questo punto facciamo l'ossidazione dell'azoto in posizione 4 per poi fare la trasposizione dell'ossigeno.

La reazione di ossidazione viene effettuata con acqua ossigenata con formazione dell'N-ossido. A questo punto tratto l'ossigeno con anidride acetica perché da reazione di acetilazione, dove si forma come intermedio non isolabile l'acetato sull'ossigeno dell'N-ossido che però non è stabile avendo la carica+ e quindi prende gli elettroni dall'adiacente gruppo acetato; il gruppo acetato di conseguenza traspone nella posizione adiacente all'azoto carico positivamente. Questa trasposizione si chiama **trasposizione di Polonovski**.

Tuttavia, noi non vogliamo l'OH acetilato, quindi facciamo reagire la molecola in ambiente basico con OH-. (non usiamo l'ambiente acido perché se lo usassi si romperebbe la molecola, per esempio a livello del gruppo imminico).

Sintesi del triazolam

Il triazolam ha una breve durata d'azione ed è usata principalmente come induttore del sonno.

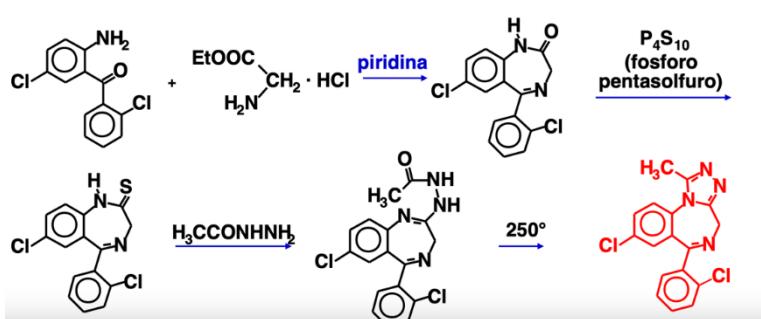
In posizione 1,2 abbiamo fusione dell'anello metiltriazolico.

Nel triazolam abbiamo sostituzione del cloro sia in posizione 7 sia in 2' (due primi). Ottengo il solito benzofenone con cloro in 2' e chiudo l'anello con il cloridrato della glicina in piridina.

A questo punto con il pentasolfuro di fosforo (P₂S₅ ma siccome dimerizza la formula corretta è P₄S₁₀) trasformo l'ammide in posizione 1,2 in tioammide per rendere più reattiva la posizione 2 alla reazione con il gruppo amminico che appartiene all'idrazide dell'acido acetico. Tutto ciò per ottenere il triazolo.

Recettori GABA_A (triazolam)

Triazolam (Halcion®, Songar®: 8-cloro-6-(2-clorofenil)-1-metil-4H-s-triazolo[4,3-a][1,4]benzodiazepina. Viene usato per il trattamento a breve termine dell'insonnia alla dose di 0.25-0.5 mg prima di andare a letto



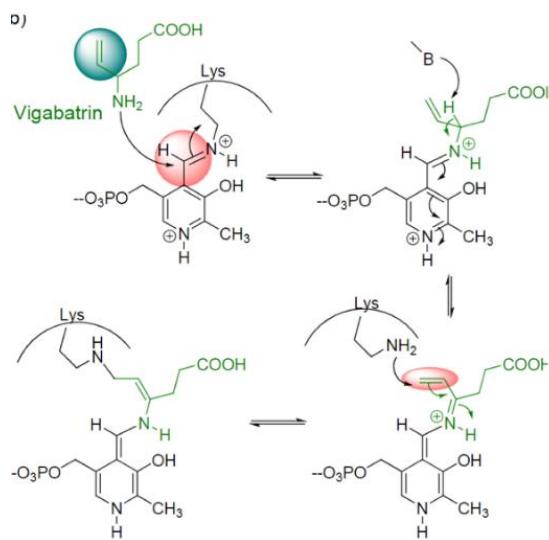
Utilizzo la tioammide al posto di ammide perché la reattività è favorita dal fatto che nel caso della tioammide si libera acido sulfidrico che è volatile e sposta la reazione verso destra più facilmente.

Dall'attacco del gruppo amminico dell'idrazide dell'acido acetico si forma un intermedio aperto che chiuderà lavorando a 250 gradi in modo da ottenere l'attacco dell'azoto sul carbonile, disidratazione e formazione dell'anello metiltriazolico.

In questo modo abbiamo sempre la coplanarità della posizione 1,2 rispetto all'anello adiacente e l'atomo di azoto ha la possibilità di essere accettore di legami idrogeno fondamentale per avere l'interazione con l'istidina.

Agonisti indiretti GABA

Vigabatrin: inibitore suicida dell'enzima GABA-T



Agente anticonvulsivante Vigabatrin.
Il livello di GABA è bilanciato dall'azione di una decarbossilasi che converte il glutammato in GABA e una transaminasi (**GABA-T**) che catabolizza GABA. L'enzima GABA-T, ha il piridossal fosfato (PLP) come co-fattore. Vigabatrin, un inibitore suicida di GABA-T, produce l'intermedio imminio che, a differenza di GABA, è anche un accettore di Michael. Questa specie reattiva è intrappolata da un residuo di lisina del sito catalitico che forma un addotto stabile e abolisce l'attività dell'enzima.

L'inibitore suicida presenta un doppio legame. La molecola in questione è un agente usato come anticonvulsivante, ha lunga durata d'azione ed elevata specificità d'azione poiché l'enzima riconosce la molecola come se fosse il Gaba e la trasforma in maniera tale da portarla al suicidio (cioè che la molecola forma un legame covalente con l'enzima e lo blocca per lungo tempo portando a un aumento della concentrazione del Gaba perché non viene più deaminato).

Meccanismo con cui viene degradato il GABA

È presente una transaminasi (chiamata **Gaba-T**) che trasforma il terminale amminico in terminale aldeidico (deamminazione ossidativa) e forma dal Gaba l'acido succinaldeidico.

L'enzima Gaba-T ha un cofattore che è il piridossal fosfato. Questo di solito è legato all'enzima stesso tramite legame labile. Nel caso specifico della Gaba-T la porzione di piridossal fosfato lega l'enzima attraverso un legame imminico fra l'NH₂ di una lisina dell'enzima e il gruppo aldeidico del piridossal fosfato.

Il gruppo amminico del Gaba attacca il carbonio imminio del piridossal fosfato, si stacca la lisina e si lega al suo posto il gruppo amminico per dare un imminio. Dopodiché attraverso una base si strappa un protone adiacente, si stacca il residuo legato all'ammina e dalla reazione esce l'acido succinaldeidico.

La molecola si riarrangi e si forma un doppio legame coniugato con il gruppo imminio; il doppio legame subisce un attacco: l'addizione di Michael (perché il doppio legame coniugato fa risonanza e la carica + può risonare sul carbonio che subisce quindi l'attacco dal doppietto elettronico della lisina) da cui si forma addotto covalente che blocca in maniera irreversibile l'enzima.

OPPIOIDI

La classe di farmaci in questione è notevolmente complessa e deriva interamente dalla semplificazione molecolare della molecola di morfina.

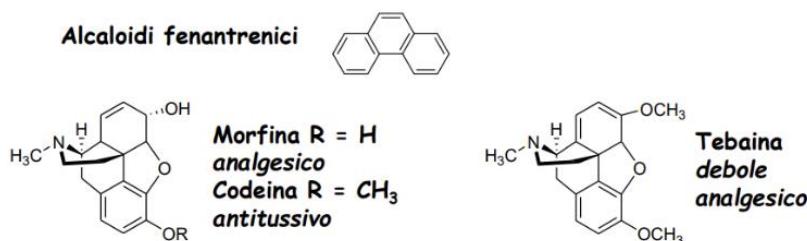
I recettori oppioidi sono stati scoperti dopo l'identificazione dei farmaci che reagiscono con essi. In altre parole, le molecole che interagiscono con i recettori oppioidi sono state identificate prima della scoperta dei ligandi endogeni che agiscono su questi recettori.

La morfina, estratta dalle capsule immature del Papaverum Somniferum, è il prototipo di questa classe di farmaci. Il lattice contenuto all'interno di queste capsule è una miscela di numerosi alcaloidi, tra cui la morfina è la più abbondante. Nel 1803, la morfina è stata isolata, purificata e la sua struttura e stereochimica sono state chiarite, portando infine alla sua sintesi.

Gli alcaloidi dell'oppio più rappresentativi appartengono alle classi degli alcaloidi fenantrenici e isochinolinici.

Alcaloidi fenantrenici

Richiamano la struttura del **fenantrene**, essi sono morfina e tebaina.



Gli alcaloidi fenantrenici, il cui nucleo fenantrenico presenta rispetto al fenantrene l'anello centrale non completamente insaturo, è presente in entrambe le molecole in esame.

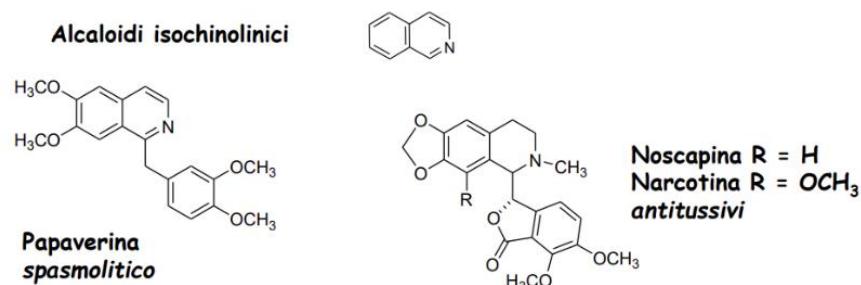
La morfina, alcaloide dell'oppio con proprietà analgesiche, si distingue per la presenza di due gruppi OH nelle posizioni 3 e 6.

La codeina, al contrario, è caratterizzata da un gruppo metossilico che le conferisce principalmente proprietà antitussive piuttosto che analgesiche.

La tebaina, invece, differisce dalla morfina per l'anello C (il più alto), che presenta due doppi legami invece di uno solo.

Nonostante l'attività analgesica della tebaina sia inferiore a quella della morfina, essa rappresenta un importante punto di partenza per la sintesi di una classe di oppioidi utilizzati in terapia veterinaria.

Alcaloidi isochinolinici



Gli alcaloidi isochinolinici non esercitano un'azione analgesica potente e per questo motivo non li tratteremo.

Riguardo la papaverina, l'anello tetraidropapaverinico lo abbiamo già incontrato nell'atracurio, con azione miorilassante. L'azoto chinolinico si trova in posizione 2 invece che 1.

La noscapina e la narcotina contengono sempre un'isochinolina. Hanno una debole azione analgesica e mantengono l'azione antitussiva.

Terminologia oppioidi/oppiaei

Gli analgesici oppioidi, noti per essere i più efficaci nel controllo del dolore profondo, erano un tempo erroneamente denominati “analgesici narcotici”. In realtà, queste molecole riducono la sensazione di dolore senza indurre narcosi. Il termine “narcotico” era usato per indicare la loro capacità di creare dipendenza.

È importante fare una distinzione: le molecole strutturalmente correlate alla morfina, ovvero gli alcaloidi naturali, sono differenti dalle molecole endogene (endorfine ed encefaline). Gli alcaloidi e i loro derivati sono chiamati oppiacei, mentre le molecole che agiscono sui recettori degli oppioidi, tra cui encefaline ed endorfine, sono classificate come oppioidi. È implicito che gli oppiacei, agendo sui recettori oppioidi, siano anche oppioidi, ma non è corretto affermare che tutti gli oppioidi siano oppiacei.

I peptidi endogeni sono stati scoperti molto tempo dopo la morfina e i suoi derivati. Questi piccoli peptidi, chiamati encefaline, derivano da peptidi più grandi noti come endorfine, che a loro volta derivano da peptidi ancora più grandi chiamati norfine.

Definiamo “oppioide” qualsiasi sostanza che interagisce con i recettori oppioidi μ , δ e κ . Tutte le azioni evocate dagli oppioidi possono essere antagonizzate dall'antagonista oppioide naloxone.

Gli oppiacei, d'altro canto, sono solo i principi attivi dell'oppio, quindi di origine naturale, e tutte le molecole che condividono analogie strutturali con essi, quindi sono analoghi della morfina. Pertanto, gli oppiacei sono anche oppioidi.

Ligandi endogeni del sistema oppioide

Nel corso degli anni '70, gli scienziati si interrogavano sull'esistenza di un mediatore endogeno per il sistema oppioide. Successivamente, hanno scoperto l'esistenza di molecole a livello centrale in grado di evocare gli stessi effetti della morfina, interagendo con i vari sottotipi di recettori oppioidi.

Queste molecole, di dimensioni ridotte, sono in grado di esercitare un'attività analgesica.

Sono costituite da un pentapeptide e, a seconda del tipo di amminoacido terminale, si distinguono in due molecole neuromodulatorie: la MetENCEFALINA e la LeuENCEFALINA.

La prima è costituita da Tyr-Gly-Gly-Phe e Metionina, mentre la seconda da Tyr-Gly-Gly-Phe e Leucina.

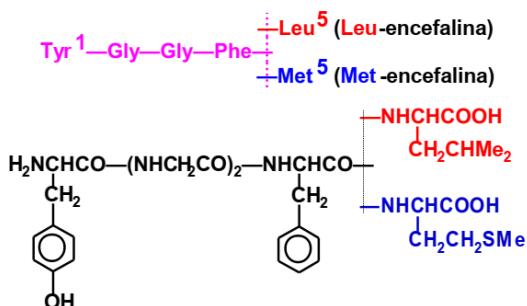
Il gruppo amino-terminale appartiene alla tirosina, elemento fondamentale per l'identificazione del modello farmacoforico, mentre il gruppo carbossi-terminale può appartenere alla metionina o alla leucina, a seconda dell'encefalina.

↓

ENDORFINE

Sostanze endogene con attività oppioide (il nome deriva dall'unione di 'endogeno' e 'morfina')

Modulano la sostanza P



Queste sostanze, genericamente chiamate endorfine, modulano la liberazione della sostanza P, il principale mediatore del dolore.

Le endorfine sono pentapeptidi che derivano dalla degradazione proteolitica di peptidi più grandi. Ad esempio, la LeuENCEFALINA deriva dalla Dinorfina A, un peptide composto da 17 amminoacidi, e ha attività oppioide perché contiene il residuo minimo di quei 5 amminoacidi.

Analogamente, la MetENCEFALINA deriva da un peptide più lungo, la β-Endorfina, composta da 31 amminoacidi, ed è attiva perché contiene quei 5 peptidi con attività analgesica.

Tyr¹-Gly-Gly-Phe-Leu⁵-Arg-Arg-Ile⁸-Arg-Pro-Lys¹¹-Leu-Lys¹³-Trp-Asp-Asn-Gln¹⁷
Dinorfina A
↓ degradazione enzimatica
Leu-encefalina
(+ altri frammenti attivi)

Tyr¹-Gly-Gly-Phe-Met⁵-Thr-Ser-Gln-Lys-Ser¹⁰-Gln-Thr-Pro-Leu-Val¹⁵.
Thr¹⁶-Leu¹⁷-Phe-Lys-Asn²⁰-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn²⁵-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly³⁰-Gly³¹
β-Endorfina
↓ degradazione enzimatica
Met-encefalina (1-5)
Endorfina α (1-16)
Endorfina γ (1-17)
Endorfina δ (1-27)

Entrambe, Dinorfina e β-Endorfina, derivano da proteine ancora più grandi: la proopiomelanocortina, la proencefalina A e la proencefalina B.

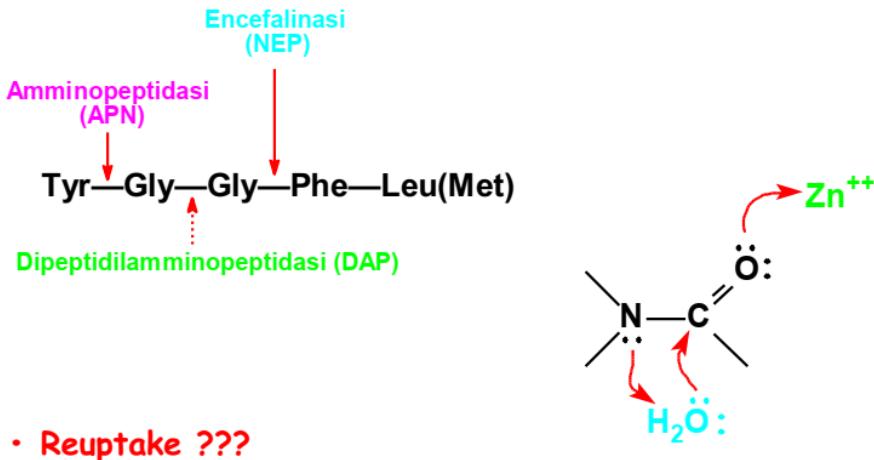
• PROOPIOMELANOCORTINA
• PROENCEFALINA A
• PROENCEFALINA B

Proteine di ca. 260 AA

↓ degradazione enzimatica
ENDORFINE

Anche le encefaline, che sono dei pentapeptidi, sono soggette alla rottura amminolitica.

• **Metabolismo** (ad opera di Zn-metallo peptidasi)



Ad esempio, Tyr da Gly subisce l'attacco di un amminopeptidasi, Gly dall'altra Gly subisce il distacco da dipeptidylaminopeptidasi e tra Gly e Phe agisce una encefalinasi.

Questi enzimi contengono Zn²⁺ al loro interno, per cui sono classificati come Zn-metallo peptidasi.

Lo zinco ha la funzione di metallo di coordinazione dell'O del carbonile per favorirne l'attacco nucleofilo dell'acqua.

Non è ancora stato scoperto se queste molecole hanno un meccanismo di reuptake. A causa di questa mancanza, invece di essere classificate come neurotrasmettitori, vengono chiamate “neuromodulatori”.

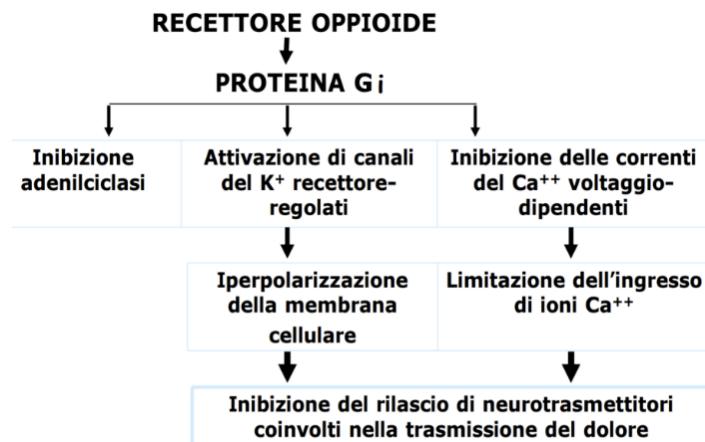
Oltre a questi peptidi neuromodulatori endogeni, sono stati sintetizzati anche dei peptidi sintetici, molti dei quali vengono utilizzati per studiare i recettori oppioidi.

Peptidi Oppioidi Endogeni e Sintetici	
[Leu ⁵]encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
[Met ⁵]encefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Dinorfina A(1-17)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
Dinorfina B(1-8)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile
Dinorfina (1-13)	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
α -Neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
β -Neoendorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro
β_h -Endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Gly-Glu
DAMGO	[D-Ala ² , MePhe ⁴ , Gly(ol) ⁵]encefalina
DPDPE	[D-Pen ² , D-Pen ⁵]encefalina
DSLET	[D-Ser ² , Leu ⁵]encefalina-Thr ⁶
DADL	[D-Ala ² , D-Leu ⁵]encefalina
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂
FK-33824	[D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Met(O) ⁵ -ol]encefalina
[D-Ala ²]Deltorfina I	Tyr-D-Ala-Phe-Asp-Val-Val-Gly-NH ₂
Deltorfina II	Tyr-D-Ala-Phe-Glu-Val-Val-Gly-NH ₂
Morficeptina	Tyr-Pro-Phe-Pro-NH ₂
PL-017	Tyr-Pro-MePhe-D-Pro-NH ₂
DALCE	[D-Ala ² , Leu ⁵ , Cys ⁶]encefalina

La ricerca si è indirizzata non solo sulle modifiche della morfina, ma anche per ottenere composti che agiscono in modo selettivo sui sottotipi recettoriali μ , δ e κ .

Meccanismi effettori recettoriali

I recettori oppioidi, tutti accoppiati alla proteina Gi, inibiscono l'adenilato ciclasi come meccanismo d'azione. Questo porta a una diminuzione della formazione di AMP ciclico, che a sua volta attiva i canali del potassio e inibisce la mobilizzazione del calcio intracellulare.



L'attivazione dei recettori μ, δ e κ sui terminali presinaptici delle fibre afferenti nocicettive ha l'effetto di ridurre il rilascio di trasmettitori eccitatori coinvolti nel dolore, come il glutammato e la sostanza P.

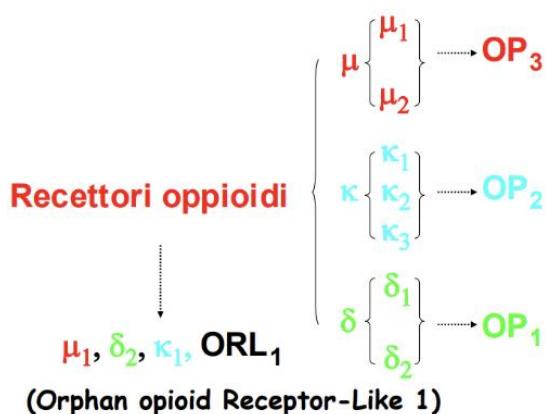
Inoltre, l'attivazione dei recettori μ postsinaptici aumenta la conduttanza al potassio. Questo provoca l'insorgenza di potenziali postsinaptici inibitori (IPSP), che a loro volta riducono la scarica dei neuroni diretti ai centri superiori.

Classificazione dei recettori oppioidi

I recettori oppioidi sono μ, κ e δ. Sono stati chiamati mu, kappa e delta in base ai composti che sono stati utilizzati per identificarli.

Il recettore mu (μ) prende il nome dalla morfina. Il recettore kappa (κ) è stato chiamato così a causa del composto chiamato chetazocina o chetociclozocina. Infine, il recettore delta (δ) è stato chiamato così a causa del suo legame con il tessuto del vaso deferente.

Accanto a questi è stata scoperta una molecola endogena con effetti opposti a quelli delle encefaline, inizialmente chiamata nocicettina ed anche orfanina, perché non si erano trovati i recettori con cui andava ad interagire. Quando sono stati scoperti, sono stati definiti ORL1.



Recettori μ

I recettori μ rappresentano la classe di recettori di cui ci occuperemo principalmente.

Essi sono suddivisi in due sottotipi: μ_1 e μ_2 .

Il sottotipo μ_1 è principalmente associato agli effetti di analgesia. Oltre all'analgesia, i recettori μ_1 mediano il rilascio di prolattina, provocano catalessia, ipotermia e miosi.

D'altra parte, i recettori μ_2 sono associati agli effetti correlati all'assuefazione e alla dipendenza delle molecole che agiscono su di essi.

-
- The diagram illustrates the classification of mu receptors. A large brace on the right side groups the effects into two categories: μ_1 and μ_2 . The μ_1 category is associated with analgesia, prolactin release, acetylcholine turnover, catalepsy, hypothermia, and miosis. The μ_2 category is associated with respiratory depression, constipation, growth hormone release, dopamine turnover, and bradycardia.
- | | | |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| μ | μ_1 | μ_2 |
| | <ul style="list-style-type: none">• analgesia• rilascio di prolattina• turnover dell'ACh• catalessia• ipotermia• miosi | <ul style="list-style-type: none">• depressione respiratoria• costipazione• rilascio dell'ormone della crescita• turnover della dopamina• bradicardia |

Gli effetti associati ai recettori μ_2 includono costipazione (diminuiscono notevolmente la motilità intestinale, motivo per cui alcuni oppioidi vengono utilizzati come antidiarroici), depressione respiratoria (una delle cause di morte in caso di overdose da eroina, un derivato della morfina), rilascio dell'ormone della crescita, azione sul sistema dopaminergico (che causa dipendenza e assuefazione) e bradicardia (che può portare al collasso circolatorio in caso di overdose da eroina).

Ruolo fisiologico

Sulla base del ruolo fisiologico le molecole associabili alla struttura della morfina:

- Analgesia
- Depressione respiratoria (effetto collaterale) che causa morte in caso di overdose
- Sonnolenza ma senza perdita di coscienza, ecco perché non è corretto chiamarli narcotici
- Cambiamento di umore
- Nausea e vomito
- Miosi
- Effetto antitussivo perché reprimono il riflesso della tosse
- Sviluppo di intolleranze e dipendenza con necessità di utilizzare dosi sempre maggiori
- Costipazione

L'utilizzo è indicato per

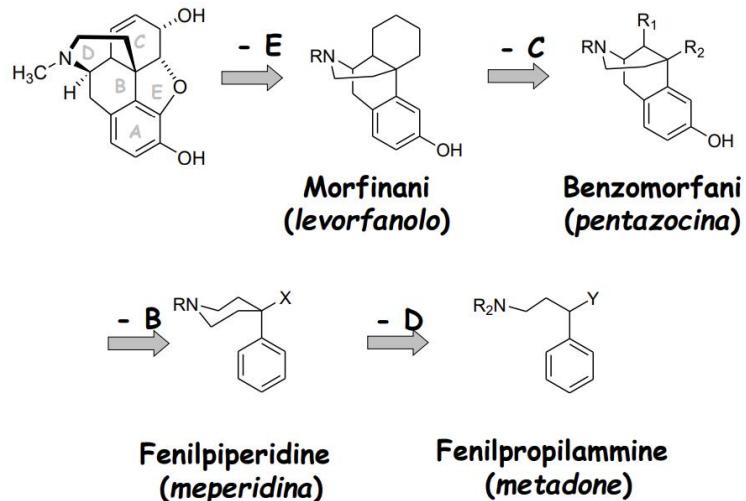
- Dolore profondo e persistente, soprattutto oncologico, con la terapia del dolore
- Trattamento della tosse
- Trattamento della diarrea

Classificazione

Le classi vanno dalla classe della morfina a quella via via più semplificata

- **Classe dei 4,5-epossimorfiniani (morfina e analoghi)** caratterizzata dal ponte ossigeno in posizione 4,5.
- **Derivati oripavini**: rappresentano una complicazione molecolare della morfina e si ottengono per reazione dal punto di vista sintetico, sulla tebaina.
- **Morfinani**: classe semplificata senza ponte ossigeno
- **Benzomorfani**: morfinani ma senza un ciclo
- **4-fenilpiperidine**: benzomorfani ma senza un ulteriore ciclo
- **Fenilpropilammime**: fenilpiperidine ma senza anello piperidinico
- **Ligandi peptidici**: agonisti oppioidi che non hanno a che vedere con gli oppiacei appena descritti.

Semplificazioni molecolari sulla morfina



La morfina, un 4,5-epossimorfinano, può essere semplificata in diverse strutture molecolari. Se si elimina il ponte ossigeno dai 4,5-epossimorfinani, si ottengono i morfinani. Il levorfanolo è un esempio di morfinano e ha un'attività simile alla morfina.

Se si elimina l'anello C dalla struttura della morfina, si ottengono i benzomorfani. Un esempio di benzomorfan è la pentazocina. Se si elimina l'anello B, si ottengono le fenilpiperidine, come la meperidina. Se si elimina l'anello piperidinico mantenendo l'azoto basico a una distanza di 3C, si ottengono i derivati fenilpropilaminici, come il metadone.

Le tre classi di composti più complesse, i 4,5-epossimorfinani, i morfinani e i benzomorfani, condividono le stesse relazioni struttura-attività. Questo non vale per le fenilpiperidine e le fenilpropilammime. Questa differenza è dovuta al fatto che il recettore oppioide ha due siti, noti come sito T e sito P.

Il sito T, che prende il nome dalla ‘tirosina’, è il sito di azione principale dei 4,5-epossimorfinani, dei morfinani e dei benzomorfani. Il sito P è il sito di azione principale delle fenilpiperidine e delle fenilpropilammime. L’interazione di queste due classi di composti con i loro rispettivi siti porta all’attivazione del recettore

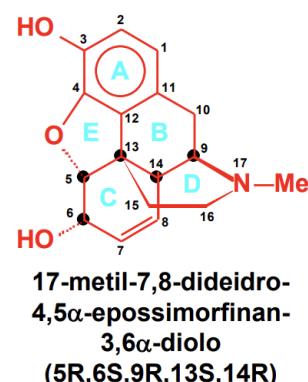
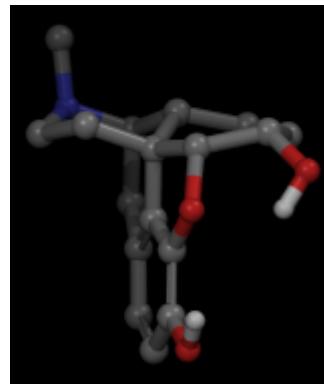
Caratteristiche della morfina

La morfina è stata ampiamente studiata negli ultimi 200 anni. Ecco alcuni punti salienti della sua storia:

- Nel 1803, la morfina fu isolata da un farmacista tedesco di nome Sertürner. Il nome “morfina” fu scelto in riferimento alla mitologia.
- Nel 1925, la struttura della morfina fu determinata da Robinson e Gullard.
- Nel 1952, la morfina fu sintetizzata chimicamente per la prima volta da Gates.
- Sempre nel 1952, la stereochimica della morfina fu definitivamente determinata da Stork.

La morfina è una molecola complessa composta da cinque cicli.

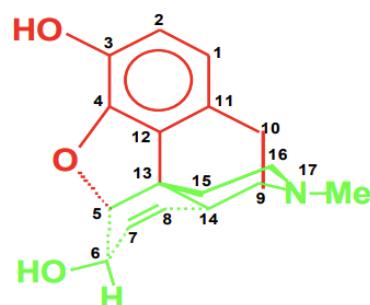
- Il ciclo A è caratterizzato da un gruppo OH fenolico.
- I cicli B e C presentano un gruppo OH in posizione 6 e un doppio legame tra i carboni 7 e 8.
- Il ciclo D è un ciclo N-metilpiperidinico.
- Il ciclo E è un ciclo diidofuranico.



La numerazione dei carboni inizia dal ciclo A, passa al ciclo E, poi al ciclo C, al ciclo B e infine al ciclo D.

La morfina presenta cinque centri chirali, identificati come 5R, 6S, 9R, 13S e 14R (levogiro), il che teoricamente permette la formazione di 32 stereoisomeri.

Tuttavia, le restrizioni geometriche limitano le possibilità a 16 stereoisomeri.



L'enantiomero naturale della morfina è levogiro. L'isomorfina è l'epimero in cui la configurazione assoluta al C-6 è R (ossidrile in posizione β).

La morfina destrogira è circa 10000 volte meno affine e possiede un'efficacia funzionale praticamente nulla, se saggiata a concentrazioni 100 volte maggiori a quelle della morfina naturale.

Durante le semplificazioni della molecola, alcuni di questi centri chirali possono scomparire. Ad esempio, con l'eliminazione dell'anello E, il carbonio 5 perde la sua chiralità.

4,4-EPOSSIMORFINANI

MORFINA

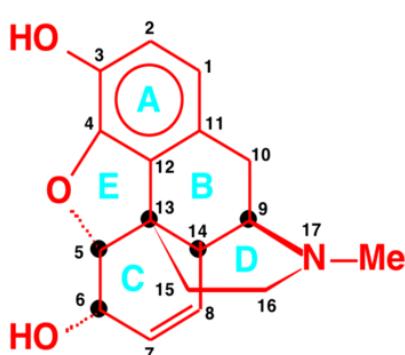
La molecola della morfina viene definita una molecola che assume una struttura a T poiché ha una parte superiore planare che è quella definita dagli anelli (C-D).

La gamba della D è formata dalla giunzione degli anelli A-B-E.

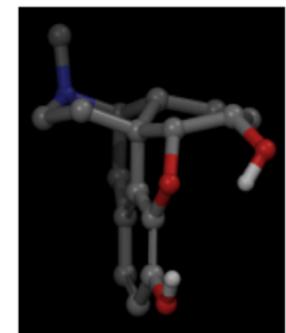
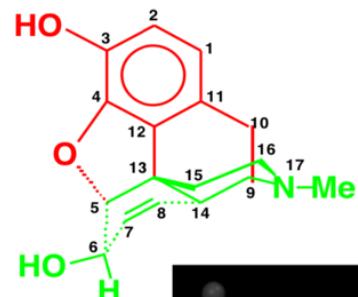
L'anello piperidinico (N) assume una conformazione a sedia e l'anello C(cicloesene) assume una conformazione a barca per l'anellazione con l'anello E per costrizione dovuta alla presenza del ponte epoxidico che congiunge i carboni (4-5) della morfina.

Le giunzioni degli anelli (C-D) sono tra di loro complanari, in trans.

L'anello E e B sono perpendicolari sia all'anello C che D, infatti la giunzione B-D e D-C è una giunzione cis; ciò giustifica la perpendicolarità di questi anelli rispetto alla complanarità del C-D. L'anello A essendo aromatico rende complanare gli anelli B-E.



**17-metil-7,8-dideidro-
4,5 α -epossimorfinan-
3,6 α -diolo
(5R,6S,9R,13S,14R)**



La morfina possiede 5 centri stereogenici che teoricamente corrisponderebbero a $2^5=32$ stereoisomeri ma le restrizioni che ci sono per le varie giunzioni degli anelli riducono il numero degli stereoisomeri possibili per un totale di 16. Lo stereoisomero in cui risiede la maggiore attività è dove i centri chirali sono in configurazione 5R 6S 9R 13S 14R.

Quando elimino l'anello E elimino la chiralità del 5, l'OH in 6 è eliminabile quindi elimino anche lo stereocentro in 6, mentre sul 9, 13 non posso assolutamente cambiare la conformazione, mentre del 14 si. L'isomorfina è l'epimero della morfina in cui varia la configurazione del carbonio in posizione 6 che è alfa; quando lo si sposta in beta si dà origine all'isomorfina che non è un enantiomero perché si cambia solo un centro chirale infatti l'attività della morfina non cambia di molto. Questo indica che la configurazione di quel carbonio non è così importante tanto che quell'ossidrile si potrà poi modificare anche con un gruppo carbonilico (carbonio sp²) e l'attività viene aumentata.

SAR

All'interno della struttura della morfina ho la struttura della tirosina, primo amminoacido N-terminale del pentapeptide naturale (leu e met encefalina) → in questa classe devo sempre mantenere l'OH in 3 che mima l'OH tirosinico del ligando endogeno.

Importante è la presenza in posizione 3 dell'OH: la metilazione è negativa (la codeina è metilata infatti è molto meno attiva della morfina, ma in vivo una percentuale di codeina viene convertita in morfina → residua azione analgesica), mentre l'esterificazione è positiva (da origine all'eroina).

L'eroina è più potente della morfina ed essendo è più lipofila attraversa meglio la barriera ematoencefalica; a livello centrale arriva una concentrazione maggiore e qui l'esterasi sono in grado di idrolizzare sia il gruppo acetile in posizione 3 che in posizione 6.

Differentemente dall'OH in posizione 3, l'OH in posizione 6 non è essenziale tanto che si può epimerizzare e l'attività viene mantenuta; può essere ossidato a gruppo carbonilico o acetilato come nell'eroina.

L'anello A (aromatico) deve rimanere tale perché mima l'anello fenolico della tirosina.

Il doppio legame 7-8 non è fondamentale per l'attività, si può ridurre e l'attività viene mantenuta con una diminuzione della durata d'azione.

La posizione occupata dal C14 aumenta la potenza sia degli agonisti sia degli antagonisti oppioidi e l'orientazione del carbonio deve essere in beta.

Tutti i derivati della morfina sono sostituiti nella posizione 17. Non è essenziale la presenza di un metile in quanto possono esserci altri sostituenti che influenzano l'attività di agonista/agonista parziale fino ad avere attività di antagonista, in particolare l'attività antagonista la si ottiene con dei gruppi ciclo propil metilici o con dei gruppi allilici che danno origine ai due antagonisti più importanti: **Naloxone** e **Naltrexone**.

Queste relazioni struttura-attività sull'N17 sono condivise dai 4-5 epossimorfinani, dai morfinani e benzomorfani (le classi più ingombrate) mentre nelle classi di fenilpiperidine e fenilpropilammime le relazioni struttura-attività non sono più tutte valide, in particolare la sostituzione sull'atomo di azoto che sposta l'attività da agonista ad antagonista.

È importante sapere che l'aumento della potenza in queste molecole porta anche ad un aumento della tossicità in termini di assuefazione e dipendenza (attività tossicomanigena).

La codeina viene prevalentemente utilizzata come sedativo per la tosse e meno come analgesico in quanto ha 1/10 della potenza della morfina.

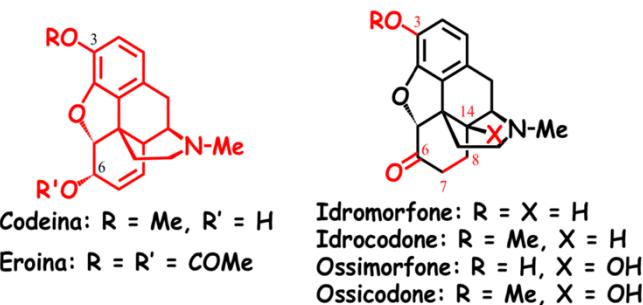
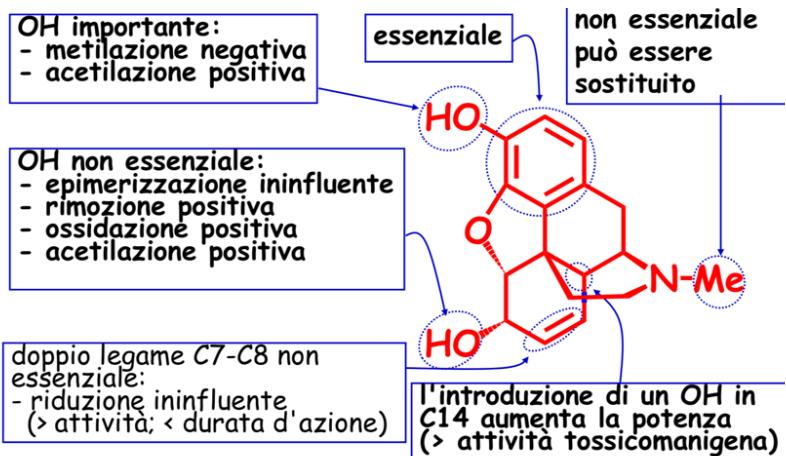
Ci sono una serie di modificazioni quali l'inserimento del gruppo OH in 14 in posizione beta, l'ossidazione in posizione 6 a gruppo chetonico e la riduzione del doppio legame in posizione 7-8 che danno origine ai seguenti composti:

Idromorfone: derivato della morfina in cui viene sostituito un gruppo OH con un carbonile in 6 e si è ridotto il doppio legame in 7-8; l'idromorfone è un po' più potente della morfina proprio perché l'ossidazione dell'OH porta a composti più potenti

Idrocodone: derivato della codeina è ancora più potente e per demetilazione porta all'idromorfone .

Ossimorfone: si ottiene quando si inserisce il gruppo OH in beta in posizione 3

Ossicodone: si ottiene se in posizione 3 ho il metossile.

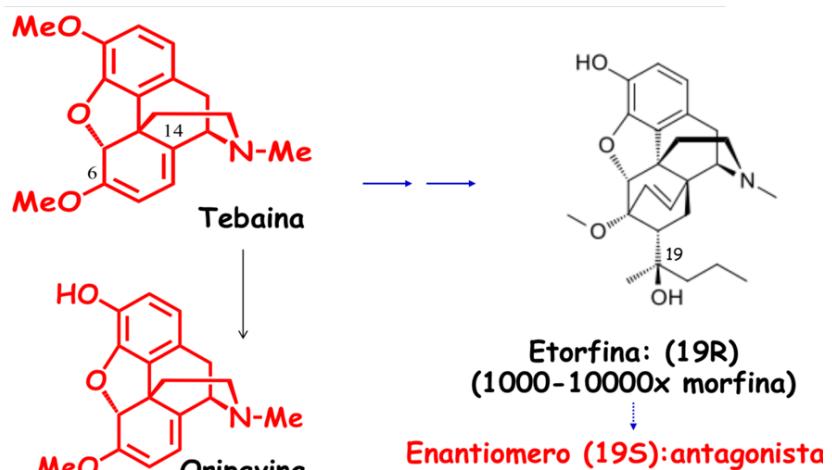


L'inserimento dell'OH in 14, l'ossidazione del carbonio in 6 fanno sì che l'ossimorfone sia un composto molto più potente della morfina e analogamente, anche l'osscodone per demetilazione porta all'ossimorfone più potente della morfina. (L'osscodone è un farmaco che ha fatto molto parlare di sé in quanto veniva prescritto negli Stati Uniti per la terapia del dolore e ha dato origine ad una popolazione di tossicodipendenti).

DERIVATI ORIPAVINICI

Tra gli alcaloidi presenti nell'oppio, in precedenza abbiamo visto la molecola della tebaina che ha due gruppi metossilici al posto dei due OH e invece di avere il doppio legame in 7-8 ci sono due doppi legami, uno in posizione 6-7 e uno in posizione 8-14; questo doppio legame è stato sfruttato per ottenere un ulteriore ciclo nella molecola della morfina che ha portato ai derivati oripavinici.

Per oripavina si intende la tebaina in cui il gruppo OCH₃ in posizione 3 è un OH; la tebaina non ha attività analgesica per la presenza del gruppo metossilico, mentre l'oripavina che ha l'OH in posizione 3 ha attività analgesica. Questi due doppi legami coniugati 6-7 e 8-14 sono stati sfruttati per ottenere un ulteriore ciclo per ottenere il composto Etorfina(19R) che porta ad avere un ulteriore centro chirale con configurazione R che dà origine ad un composto 10000 volte più potente della morfina (usati a scopo veterinario per animali di grande stazza come cavalli).



COME AVVIENE QUESTA ULTERIORE ANELLAZIONE?

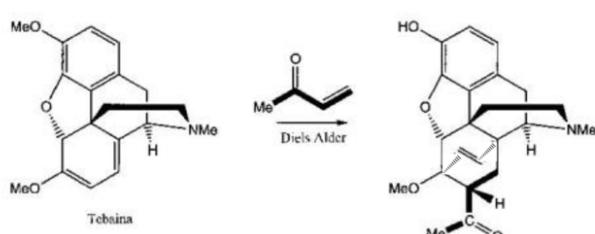


Fig. 17.26 Formazione di oripavine

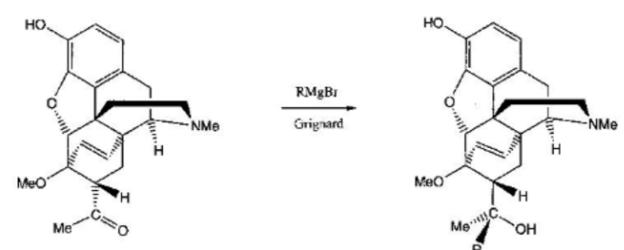


Fig. 17.28 Estensione del farmaco

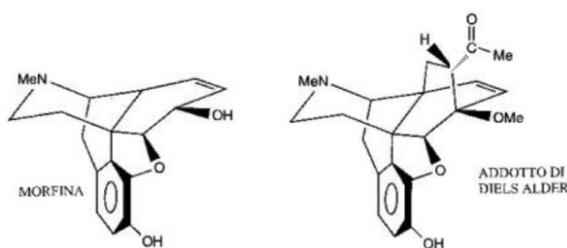


Fig. 17.27 Confronto tra la morfina e l'oripavina

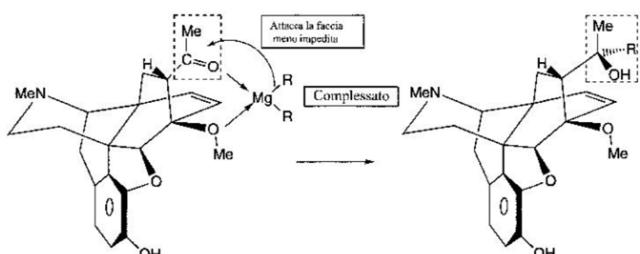
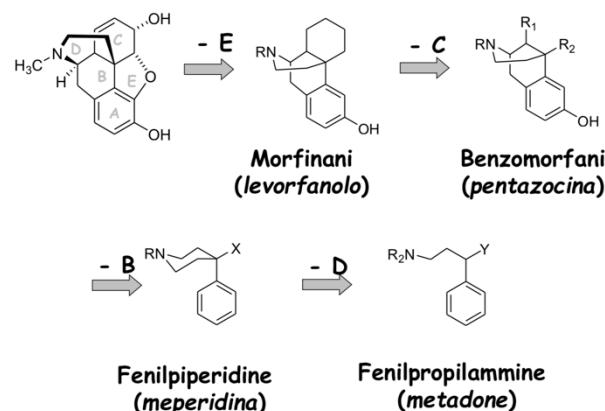


Fig. 17.29 La reazione di Grignard porta ad un centro di assimetria

L'etorfina ha un ciclo ulteriore che viene ottenuto attraverso la reazione 1,4 di diels Alder con un composto vinilico. Si ottiene oltre alla struttura a T, l'inserimento di un ciclo sul C. Nella tebaina ci sono due doppi legami coniugati, che subiscono l'attacco in posizione 1,4 con il vinilmethylchitone da due doppi legami ottengo un doppio legame centrale (2,3) e il doppio legame del vinilmethylchitone, porta alla formazione di un ulteriore ciclo. L'addotto di diels alder non termina qua perché sul carbonile faccio poi una reazione di Grignard, con l'opportuno magnesio bromuro. Inserisco quindi un nuovo centro chirale in 19, che nell'etorfina deve essere R, mentre l'enantiomero 19S è un debole antagonista.

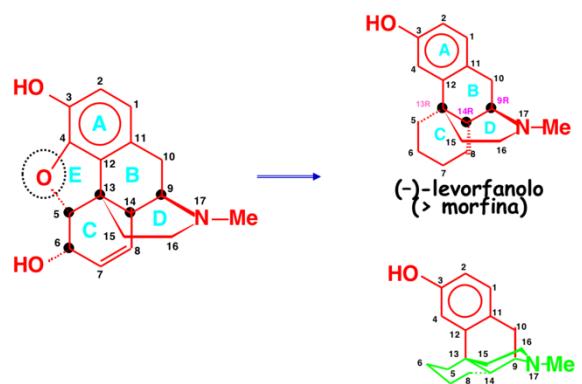
MORFINANI

La prima modifica a partire dalla morfina è stata l'eliminazione dell'anello E (epossidico) che ha dato origine ai morfinani → **levorfanolo**. L'anello C non è più costretto nella posizione a barca quindi si mette a sedia. Il centro chirale 5 sparisce, il 6 non è importante quindi è stato eliminato l'OH. Manca il doppio legame in 7,8. Cambia la configurazione assoluta, il 9R e 14R rimangono, mentre il 13 prima era S mentre adesso è R. L'anello C non è più costretto nella posizione a barca quindi si mette a sedia.

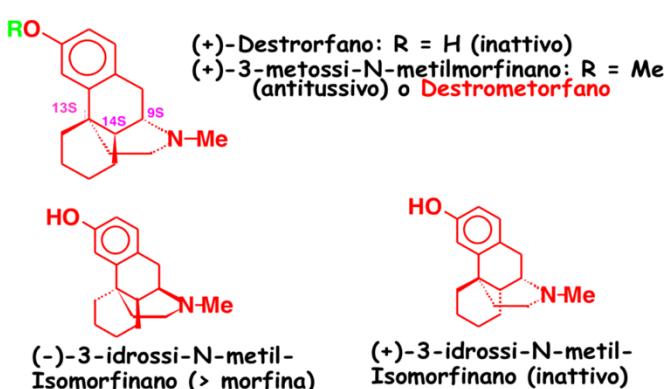


Il levorfanolo ha un'attività uguale se non superiore a quella della morfina. Si chiama levorfanolo perché è levogiro come la morfina. Quando epimerizzo tutti i centri chirali, ottengo il destrorfanolo, che è inattivo come analgesico anche quando in 3 si ha un OH, ma rimane attivo come antitussivo. Per questa ragione il destrometorfano (metossile in 3 al posto dell'OH) è utilizzato come antitussivo privo degli effetti collaterali morfinosimili, perché quando viene metabolizzato diventa inattivo.

Si è visto che quando mantengo la stereochimica 13R e 9R (levorfanolo), quindi epimerizzo solo il 14 → isomorfinano 9R, 13R, 14S, mantiene l'attività del levorfanolo (superiore alla morfina). Quando invece epimerizzo il 13 e il 9 e mantengo il 14R → isomorfinano 9S, 13S, 14R l'attività scompare quindi i centri chirali importanti che non posso modificare sono il centro in 9 e in 13.



Hot plate test: resistenza all'ustione sulla piastra calda della zampa di un topo. Si è utilizzato questo test per vedere l'efficacia di gruppi fenetilici o bioisosteri del fenetil per sostituire il metile sull'N. Se inserisco dei sostituenti di questo tipo l'attività rimane, in alcuni casi è superiore, indicando che il metil non è indispensabile per l'attività, può essere sostituito con sostituenti di una certa dimensione, soprattutto fenetilici. Questo è vero per la morfina, per il levorfanolo ma non è vero per altri derivati.



Si entra nel dettaglio analizzando le varie sostituzioni sull'N17.

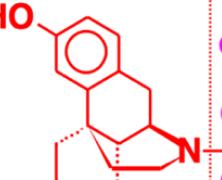
Questa posizione, come è stato visto nel caso della morfina, incide sullo spostamento dell'attività della molecola (agonista, agonista parziale, antagonista).

Anche nel levorfanolo, così come nella morfina, in N17 è presente un metile. Questa molecola è stata sottoposta a numerosi studi, in questo caso è riportato il test del topo su piastra calda per definirne l'attività analgesica. È stato sostituito in vari modi l'atomo N17 e si è visto che andando ad inserire un **gruppo allilico** o un **gruppo ciclopropil metilico**, esattamente come nella morfina, si ha uno spostamento dell'attività da agonista ad antagonista.

Il derivato del levorfanolo con il gruppo allilico si chiama **levallorfan**.

Agonisti Oppioidi (morphinani: SAR)

**ED50 (mg/kg)
Hot plate test (topo)**

	Me	0,48
	CH ₂ CH ₂ -C ₆ H ₅	0,113
	CH ₂ CH ₂ -C ₆ H ₄ -OMe	0,09
	CH ₂ CH ₂ -C ₆ H ₄ -SMe	0,045
	CH ₂ CH ₂ -C ₆ H ₄ -NH ₂	0,018
	CH ₂ CH ₂ -C ₃ H ₅ O	0,01
	CH ₂ CH ₂ -C ₃ H ₅ S	0,019

Analogamente a quello che è stato visto nella morfina, l'inserimento di **gruppi fenetilici** o **gruppi bioisosteri** del fenetile, porta al mantenimento dell'attività agonista.

Per alcune di queste sostituzioni, l'attività è aumentata rispetto a quella del levorfanolo, come si può vedere dall'ED50.

Anche in questo caso le relazioni struttura-attività valgono in particolare per:

- Derivati 4,5 epossimorfinani
- Morfinani
- Benzomorfani

Non sono del tutto rispettate nelle classi più semplificate.

BENZOMORFANI

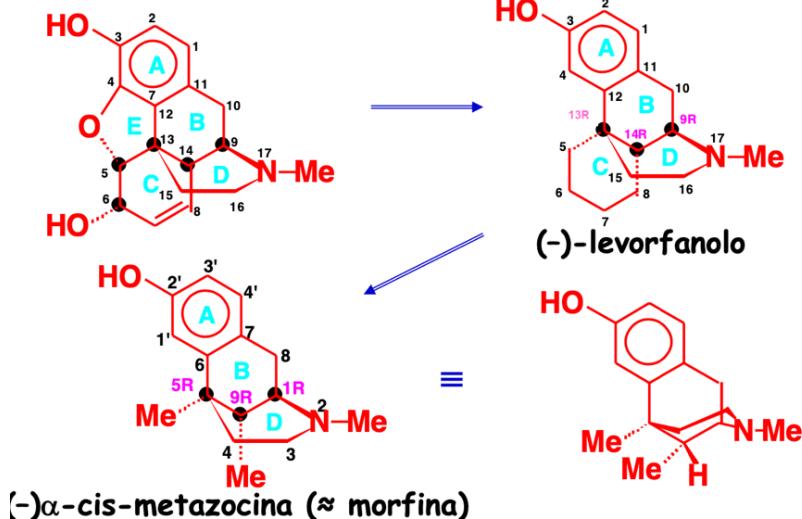
Un'ulteriore semplificazione è rappresentata dai benzomorfani in cui avviene l'eliminazione del ciclo C del levorfanolo.

Questa classe di composti mantiene la sua attività nonostante l'eliminazione di un ulteriore ciclo, il prototipo si chiama **metazocina**.

Qui la numerazione parte dall'anello piperidinico.

Il C9 del levorfanolo adesso è il C1, il C14 del levorfanolo adesso è il C9 e il C13 adesso è rappresentato dal C5.

Agonisti Oppioidi (benzomorfani: SAR)



In questi ultimi derivati la numerazione non è importante, è importante conoscere gli stereocentri.

Ciò che è stato visto nella serie precedente viene anche qui mantenuto: il C1 deve rimanere in configurazione R, allo stesso modo il C5, come conseguenza di quanto detto prima (ovvero che la configurazione del C14 non è importante), teoricamente il C9 può essere epimerizzato, mantenendo la stabilità.

In figura si osserva la **cis-metazocina** (con attività analoga alla morfina) la cui struttura presenta i due metili in alfa esattamente come l'anello C del levorfanolo.

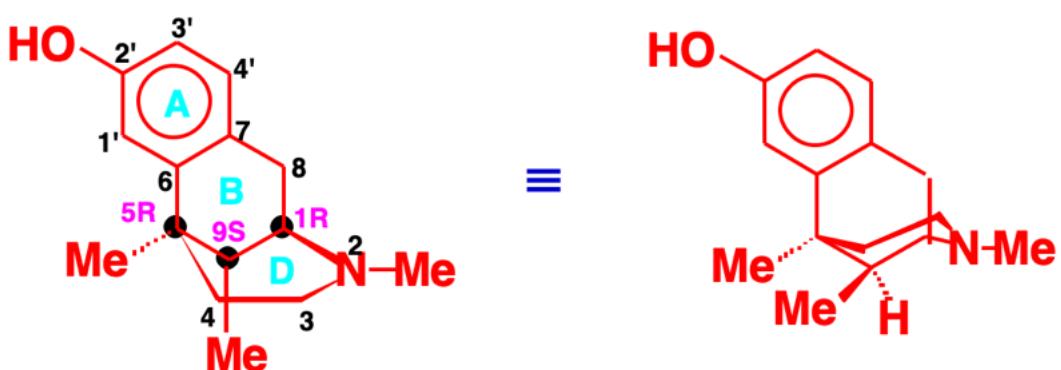
Cosa succede se si epimerizza il C9 della cis-metazocina?

Si ottiene la **trans-metazocina**, molecola il cui metile in posizione 9 è in β .

È possibile nuovamente affermare che il C14 (che adesso è il C9) non è importante ai fini del mantenimento dell'attività della molecola.

Con la trans-metazocina c'è un mantenimento dell'attività come è previsto dalle relazioni struttura-attività viste fino ad ora.

Cambiando le configurazioni in C5 e in C1 si perde l'attività perché corrispondono ai C9 e C13 della molecola di levorfanolo.

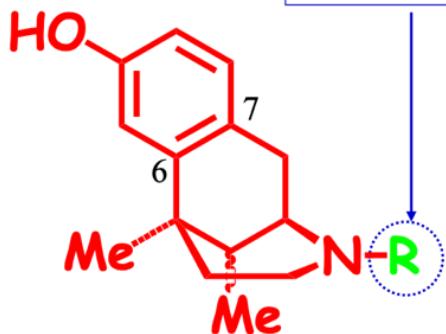


(-) β -trans-metazocina (> morfina)

Cosa succede se si effettuano modifiche su N17?

Il sostituente determina un profondo cambiamento nel profilo biologico:

- agonismo
- agonismo parziale
- antagonismo

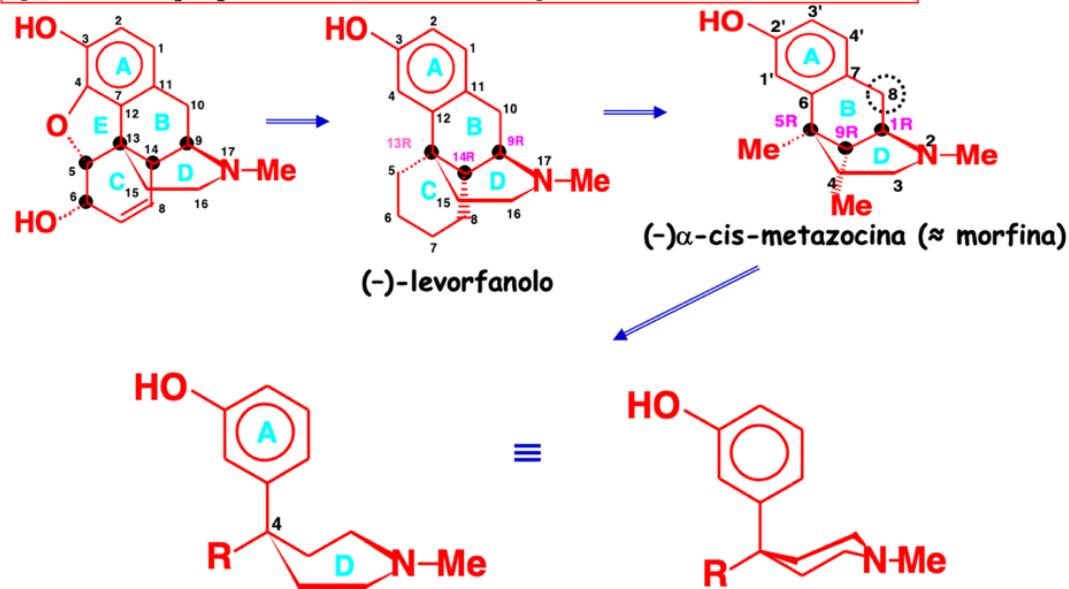


Le sostituzioni su N17 portano al passaggio da agonismo, agonismo parziale, fino ad arrivare ad antagonismo con il gruppo allilico o metil ciclopropilico.

Ne consegue il mantenimento delle relazioni struttura-attività viste nelle classi precedenti.

4 -FENILPIPERIDINE

**Agonisti Oppioidi
(4-fenilpiperidine: SAR)**



Questa classe è caratterizzata dall'eliminazione dell'anello B.

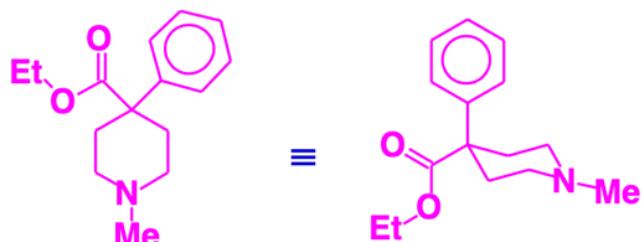
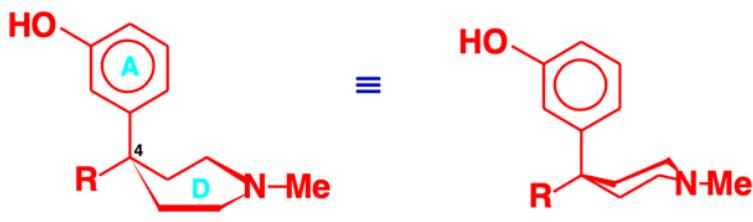
La presenza dell'anello B induce l'anello fenolico a stare in posizione assiale rispetto alla piperidina.

Eliminando l'anello B si acquista una grande libertà in quanto non è detto che il fenolo debba stare in posizione assiale; infatti, può stare anche in posizione equatoriale.

Sono stati effettuati vari studi a riguardo per capire se le relazioni struttura-attività di questa classe fossero sovrapponibili a quelle delle classi già viste.

Il prototipo delle fenilpiperidine è la semplificazione molecolare della cis-metazocina ed è chiamato **Meperidina o Petidina**.

Agonisti Oppioidi (4-fenilpiperidine: SAR)



Meperidina (1/10 morfina)

La Meperidina ha un'attività di circa un decimo della morfina ed ha delle grosse differenze:

1. La mancanza dell'OH in para
2. L'inserimento di un ulteriore sostituente in posizione 4 dell'anello piperidinico.
In particolare, la meperidina ha un gruppo estereo.

La Meperidina è stata il punto di partenza per la determinazione delle relazioni struttura-attività delle fenilpiperidine, soprattutto per la progettazione di potenti oppiacei, tra cui il Fentanil.

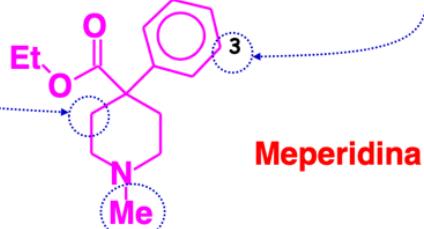
SAR

Nella Meperidina le SAR sono differenti rispetto a quelle viste fino ad ora.

Agonisti Oppioidi (4-fenilpiperidine: SAR)

Un Me in 3 aumenta l'attività:
l'isomero β più dell' α

La presenza di un OH aumenta la potenza



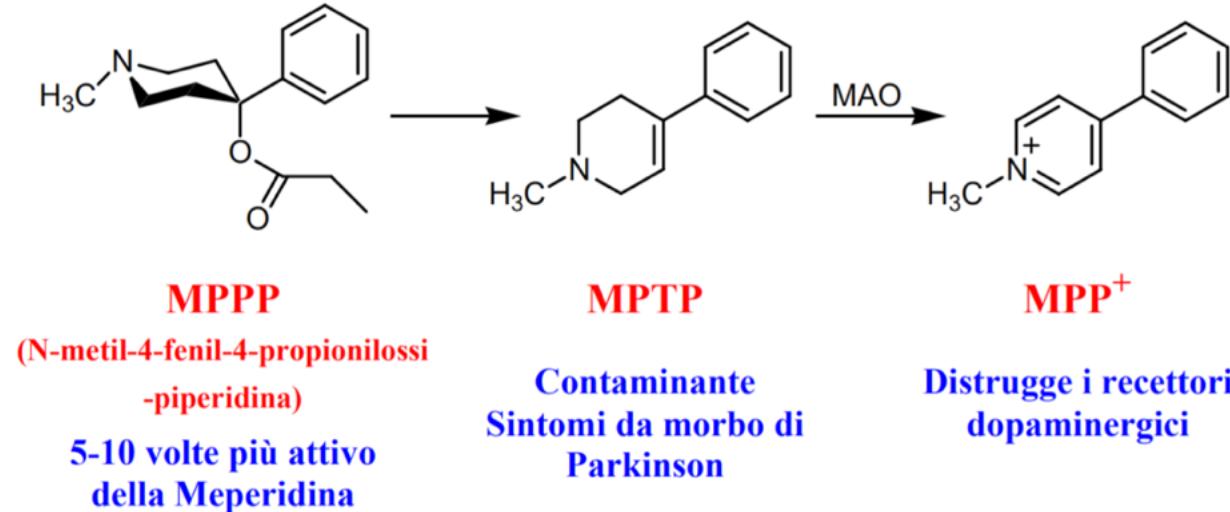
Meperidina

La sostituzione del Me con gruppi che conferiscono antagonismo negli analoghi della morfina non alterano il profilo biologico, mentre l'introduzione di un fenetile aumenta notevolmente la potenza

- Attività:** l'inserimento del metile in posizione 3 aumenta l'attività.
- Anello aromatico:** normalmente si aveva un -OH in 4, in questo caso la posizione migliore per inserire un -OH è in 3. Inserendo un -OH in 3 si aumenta la potenza della molecola
- Metile:** in tutte le altre classi la sostituzione del metile era identica e in tutti i casi il metilciclopropile e l'allile portavano ad un antagonismo.

In questo caso la sostituzione non porta ad antagonismo mentre è vero che l'introduzione di gruppi fenetilici, aumenta di molto la potenza.

Tossina dopaminergica da MPPP



Questa molecola, isomero della Meperidina, è un potente agente oppiaceo, è circa 5/10 volte più attiva della meperidina.

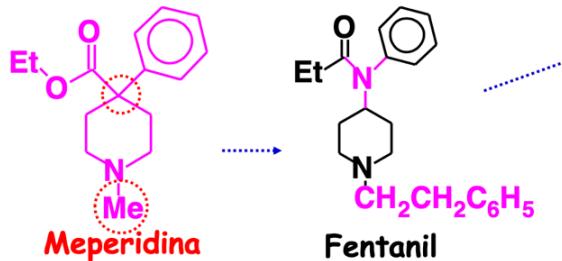
Nel momento in cui viene sintetizzata con l'anidride propionica, agisce in ambiente acido: si ha una disidratazione e conseguente formazione di un doppio legame con la tetraidropiridina, la quale in vivo viene ossidata a metilpiridinio che è un reagente neurotossico per i neuroni dopaminergici che induce il Parkinson in maniera irreversibile.

→ Sostituzione in posizione 4

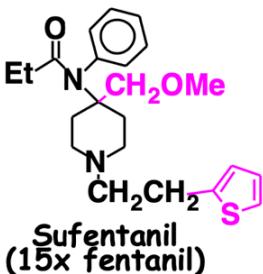
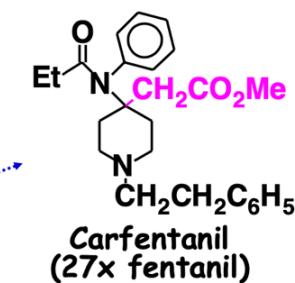
In posizione 4, anche se l'estere viene invertito, la Meperidina mantiene un'elevata attività nei confronti dei recettori oppioidi.

Dallo studio delle interazioni struttura-attività è emerso che i derivati che presentano un gruppo ammidico, con il mantenimento di un anello aromatico e l'inserimento su N di un gruppo fenetilico, portano alla sintesi del Fentanil.

Agonisti Oppioidi (4-fenilpiperidine: SAR)



Il Fentanyl ha una potenza 100 volte superiore alla morfina, deve essere usato con un dosaggio molto attento. Questo farmaco viene impiegato insieme ad un neurolettico per interventi di breve durata.



Aggiungendo un gruppo estero si ottiene il **Carfentanil**: la sostanza più oppioide che si conosca, usata in ambito veterinario.

Un altro derivato che ha azione intermedia tra il Fentanyl e il Carfentanil è il **Sufentanil**.

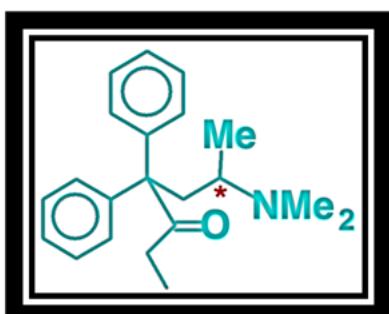
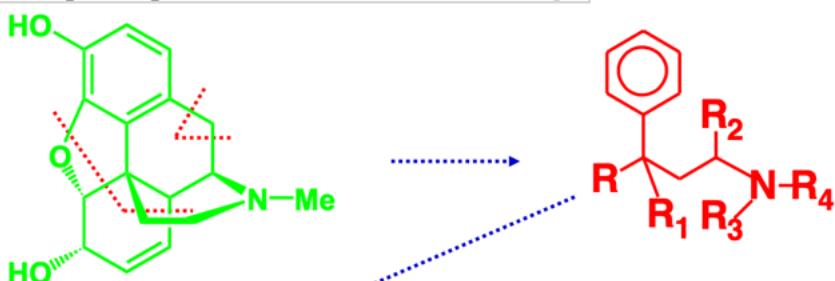
Il Sufentanil è una molecola caratterizzata da una sostituzione bioisostatica del fenile con un tiofene e presenta nella posizione 4 dell'anello piperidinico un gruppo metossi.

Il Sufentanil è usato anche nell'uomo ma sempre con grande attenzione al dosaggio.

FENILPROPILAMMINE

L'ultima classe è rappresentata dalle fenilpropilammime il cui esponente è il **Metadone**, farmaco usato nella disassuefazione da droghe.

Agonisti Oppioidi (fenilpropilammime: SAR)



Il metadone è un agonista μ con un profilo farmacologico simile a quello della morfina con potenza comparabile. È bene assorbito per via orale, ha una lunga durata d'azione (10-12 ore durante il trattamento cronico). Si lega in alta percentuale alle proteine plasmatiche e tissutali, formando un deposito dal quale viene rilasciato lentamente. L'impiego è nella disassuefazione dagli oppioidi: in seguito a sospensione del trattamento, il metadone provoca infatti crisi di astinenza più blande (anche se più prolungate) rispetto alla morfina e all'eroina.

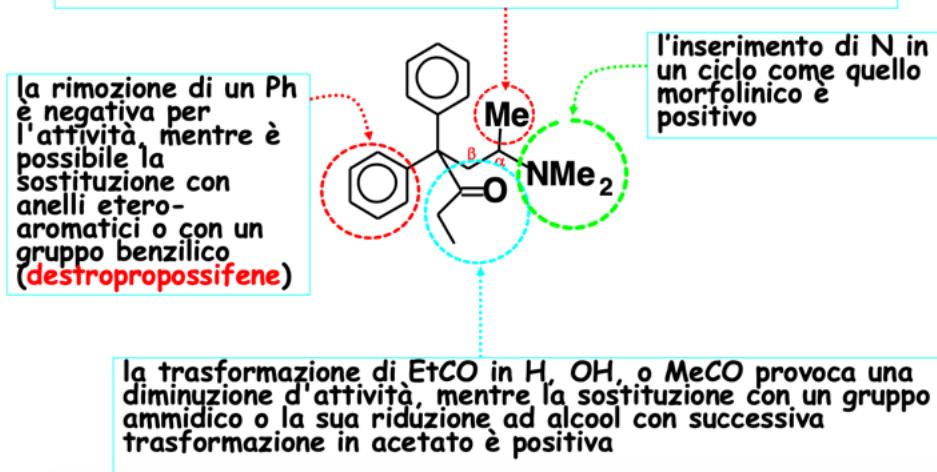
Il metadone appartiene alla classe delle fenilpropilammime, in particolare è un 3-epanone: un chetone a 7 termini, con un carbonile in posizione 3, in posizione 4 ha due gruppi aromatici. Il metadone è così chiamato perché ha sia un metile in catena laterale, che un carbonile.

La sua azione, quando iniettato, è identica o più potente della morfina, infatti viene somministrato per bocca. L'assunzione deve avvenire davanti ad un operatore per evitare che il tossicodipendente se lo inietti. Ha una durata d'azione di circa 10-12 h perché si lega fortemente alle proteine plasmatiche formando un deposito che viene rilasciato lentamente, controllando meglio le crisi da astinenza. L'assunzione è a dosaggi via via sempre più bassi, anche se non sempre si raggiunge lo scopo. In ogni caso, il tossicodipendente che assume Metadone, anche quando va in crisi di astinenza, ha crisi che sono meno forti rispetto a quelle che si hanno con l'eroina.

SAR DEL METADONE

Agonisti Oppioidi (fenilpropilammime: SAR)

- lo spostamento del Me in β conduce all'isometadone meno attivo ma anche meno tossico
- la sostituzione del Me con un H (normetadone) è negativa



Anche in questo caso, come nella classe precedente, l'inserimento di sostituenti nella posizione che dava l'attività antagonista delle prime classi, non ha gli stessi effetti anche sulle fenilpropilammime.

Una modifica interessante è stata la sostituzione di uno dei 2 fenili con un benizile, questo ha dato origine al **destropropossifene**, il quale mantiene l'attività analgesica.

Il metile in catena laterale non può essere rimosso.

L'altra catena che contiene il carbonile è importante in quanto la trasformazione di questa funzione, sia inserendo gruppi diversi, sia riducendo l'etile a metile, porta sempre a composti con diminuita attività.

Se questo gruppo viene trasformato in un acetato, l'attività viene mantenuta, allo stesso modo l'inserimento di un gruppo ammidico.

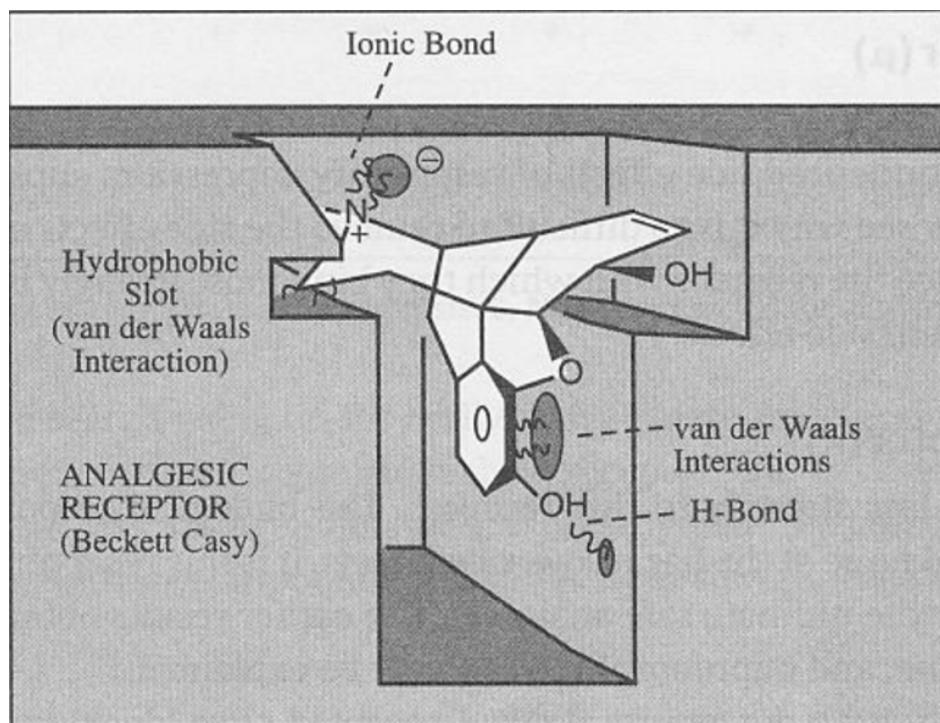
In pratica in questa posizione il carbonile è importante sia che appartenga ad un gruppo ammidico sia che venga esterificato. Infine, il gruppo dimetilico sull'atomo di azoto può essere anche inserito in un ciclo, quello che meglio mantiene l'attività è un **ciclo morfolinico**.

TEORIA DI BECKETT E CASY (1954)

La prima teoria sul modello farmacoforico della morfina e dei suoi derivati con i recettori oppioidi, è stata proposta da Beckett e Casy nel 1954.

Questa ipotesi di interazione farmacoforica prevedeva:

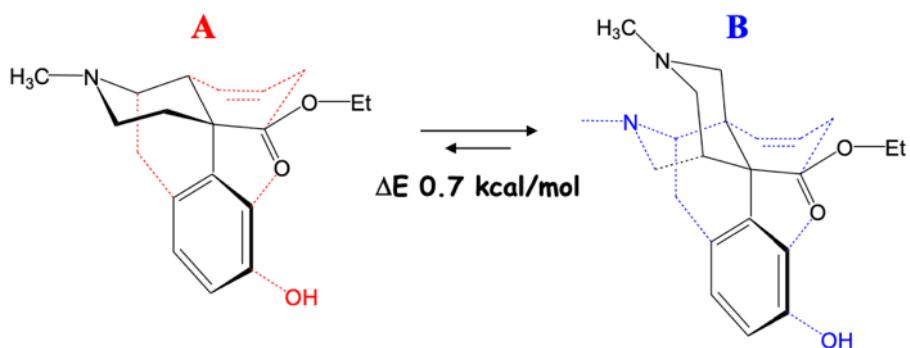
1. La presenza di un sito di legame anionico con l'azoto protonato a pH fisiologico (presente in tutte le classi).
2. Per la struttura a T della morfina, l'interazione dell'anello fenolico tramite un legame a idrogeno (da parte dell'OH fenolico stesso) e interazioni di Van der Waals dell'anello aromatico in una superficie planare dove si inseriva la gamba della T.
3. Una porzione idrofobica dove si alloggiava l'anello piperidinico complanare all'anelloC.



Questa prima teoria non è stata completamente sconfessata, però c'erano dei dati sulle relazioni struttura-attività dei derivati della morfina più complessi, che non chiarivano la differenza di queste relazioni struttura-attività nell'interazione con il recettore.

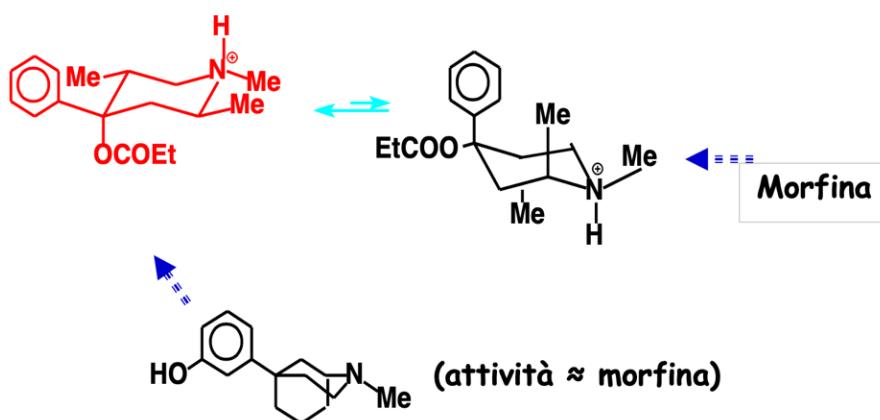
Normalmente quando le relazioni struttura-attività di due serie di composti non sono perfettamente sovrapponibili, si pensa che agiscano magari sullo stesso recettore ma su due siti diversi. Infatti, un dato non molto in linea con questa interazione omogena è emerso nello studio sulla posizione dell'anello aromatico rispetto all'anello piperidinico.

Considerando la struttura della morfina, è già stato detto che per ragioni di costruzione dovuta a questi anelli, l'anello fenolico sta in posizione assiale sull'anello piperidinico.



posizione equatoriale. Questo dato fa pensare che se l'anello fosse libero si disporrebbe quindi in posizione equatoriale.

È stato fatto l'analogico rigido: è stato inserito un ciclo sull'anello piperidinico in maniera da congelare la conformazione equatoriale. Questo anello blocca l'anello aromatico nella sua posizione equatoriale.



Andando a paragonare questa struttura con quella della Meperidina, per analogia bisogna pensare che sovrapponendo questa struttura a quella della morfina, l'interazione con il recettore sia in maniera assiale anche con la Meperidina.

Da un punto di vista di ΔE , la conformazione maggiormente stabile è la struttura della Meperidina quando presenta il gruppo fenolico in

posizione equatoriale.

Si è visto che l'irrigidimento porta ad una attività analoga a quella della morfina, quindi non è indispensabile, in questi composti, la posizione assiale rispetto alla piperidina dell'anello aromatico, in contrasto con quello che avviene nella morfina.

Questa conclusione rappresenta un indizio, il quale indica che l'interazione non avviene sullo stesso sito.

MODELLO RECETTORIALE DI PORTOGHESE

Il modello di Portoghese prevede l'ancoraggio dell'N carico positivamente con un sito anionico del recettore. In seguito a questa interazione sul sito anionico, il resto della struttura può intercettare due siti e cioè quello che poi è stato definito il sito T, dove vanno a interagire i derivati più ingombrati, e un sito P dove reagiscono le molecole più semplificate.

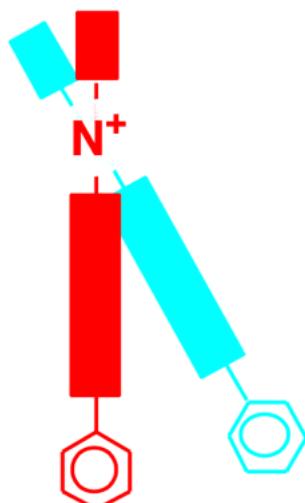
Nel recettore degli oppioidi esisterebbero i siti:

- Sottosito P: dove P sta fenilalanina
- Sottosito A: qui si ancorano gli atomi di N carichi positivamente di tutte le molecole viste
- Sottosito T: così chiamato perché in questo sito interagisce l'anello aromatico fenolico della tirosina delle **encefaline**.

Le encefaline sono costituite da Tyr-Gly-Gly-PheAla-Met-Leu.

Rappresenta il sito di interazione dell'anello fenolico della tirosina, qui ho un gruppo in grado di dare legami ad H con l'OH.

In questo sottosito T interagisce anche l'anello fenolico dei derivati 4,5 epossimorfinalici, morfinanici, benzomorfani.



Il motivo per cui andando ad inserire in questa posizione dei gruppi fenetilici mantiene l'attività agonista, anzi la aumenta, è dovuto al fatto che il gruppo fenetilico può dare ulteriori interazioni con il sottosito T.

Le stesse encefaline oltre a interagire con il sottosito T, con l'anello aromatico dell'Ala danno interazioni con il sottosito P.

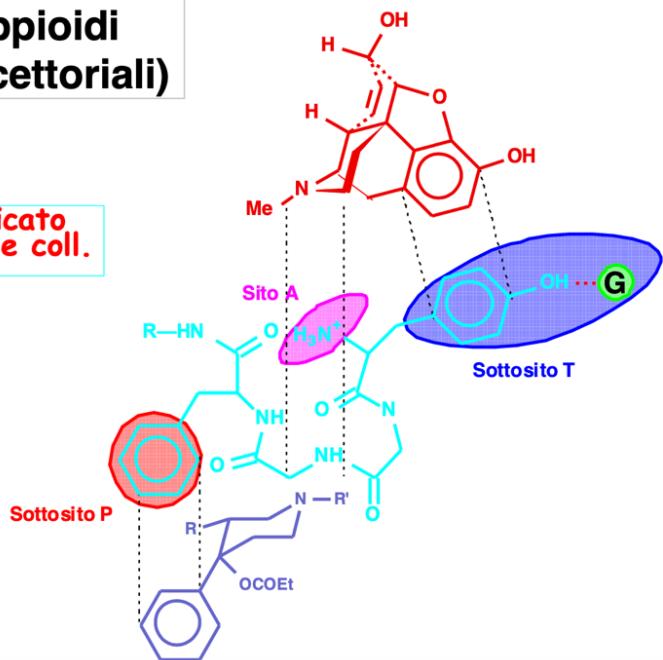
Quest'ultimo è lo stesso sottosito con cui interagiscono i derivati fenilpiperidinici e fenilpropilamminici che, come è stato detto, non hanno bisogno di avere l'OH fenolico in quanto non interagiscono su questo sito.

Questo motiva anche il fatto che l'anello aromatico, nel caso della Meperidina e dei suoi derivati, non deve essere necessariamente in posizione assiale per avere attività in quanto vanno a interagire con un sito diverso.

Inoltre è anche il motivo per cui i sostituenti sull'atomo di N, che danno origine in questo caso ad antagonismo, proiettano da una parte diversa del recettore e quindi non danno origine allo stesso effetto.

Agonisti Opioidi (modelli recettoriali)

Modello modificato
di Portoghese e coll.



Modello farmacoforico di Portoghesi

Portoghesi ha lavorato tutta la vita sui recettori oppioidi. Ha rivisto la teoria di Beckett e Casy modificando il modello proposto dai due ricercatori. Portoghesi ha ipotizzato, per chiarire le diverse SAR della classe dei 4-5 epoximorfani, delle oripavine, dei benzomorfani e dei morfinani rispetto alle classi più semplici, la presenza di 2 sottositi. L'ancoraggio primario è sempre rappresentato dall'N terziario che si protona a pH fisiologico (N che è presente in tutte le classi). Per quanto riguarda la classe dei composti più ingombrati, cioè quelli più correlati alla morfina, si ha l'interazione con il **sottosito T** (T=Tyr) ove avviene, oltre all'interazione dell'anello aromatico con una superficie piana, anche un legame ad H di un OH fenolico che è indispensabile per avere l'attivazione in questa classe di molecole. T sta per tirosina infatti tale sito deve sopportare anche l'interazione dei ligandi endogeni quali Encefaline, le quali sono caratterizzate da una catena pentapeptidica costituita da: Tyr-Gly-Gly-Phe-Leucina, nel caso della Met-encefalina al posto della leucina si ha la metionina. Il sito T è il sito in cui interagisce la Tyr delle Encefaline e di tutti i precursori delle encefaline. L'Encefalina, nel recettore, si dispone proiettando il gruppo NH₂ della Tyr verso il sito A nel quale interagisce con l'aspartato e inoltre interagisce a livello del **sito P** (P=Phe) con una fenilalanina. Nel sottosito P interagiscono gli anelli aromatici, che non necessariamente devono essere ossidrilati, dei derivati più semplificati: 4-fenilpiperidine e delle fenil-propil-ammine.

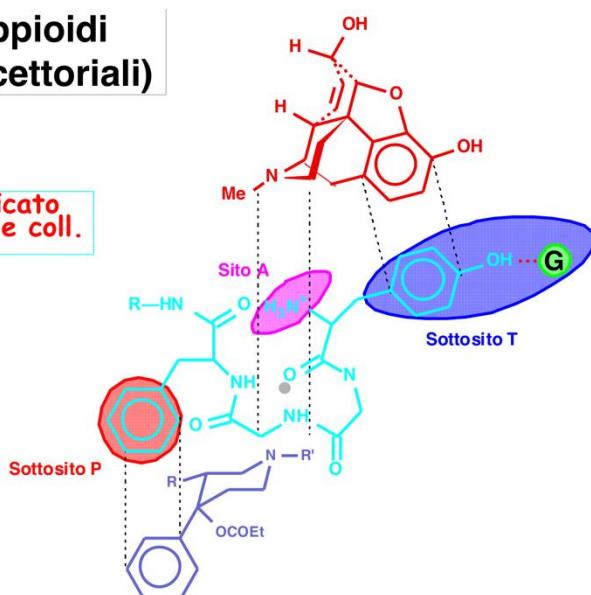
Ciò è supportato dagli studi di conformazione su tali composti dove viene favorita la conformazione in cui l'anello aromatico, rispetto all'anello N-metilpiperidinico, è in posizione equatoriale, a differenza della conformazione della Morfina in cui, per costrizione dovuta al legame epoxidico, l'anello fenolico sta in posizione assiale e non equatoriale.

L'altro indizio che ci fa capire che le due molecole agiscono in siti diversi è che nelle forme più semplificate non sono necessari l'anello fenolico e la presenza di residui sull'atomo di azoto per dare azione antagonista. Quindi tante sono state le motivazioni per far capire che il recettore è attivato da due classi di molecole, che seppure l'una deriva da semplificazioni molecolari dell'altra, agiscono su due siti diversi dello stesso recettore.

Un altro dato importante da sottolineare è la presenza di gruppi su N17 quali: allile e ciclopropile che spostano l'attività della molecola da agonista ad antagonista, ma anche la presenza di gruppi fenetilici che in alcuni casi mantengono l'attività agonista, in altri la aumentano; questo è associato alla possibilità che ha il sostituente di creare delle interazioni $\pi-\pi$ tra l'anello aromatico fenetilico e il sottosito P. Tale posizione (N17) è cruciale per spostare l'attività da agonista parziale e poi ad antagonista.

Agonisti Oppioidi (modelli recettoriali)

Modello modificato
di Portoghesi e coll.

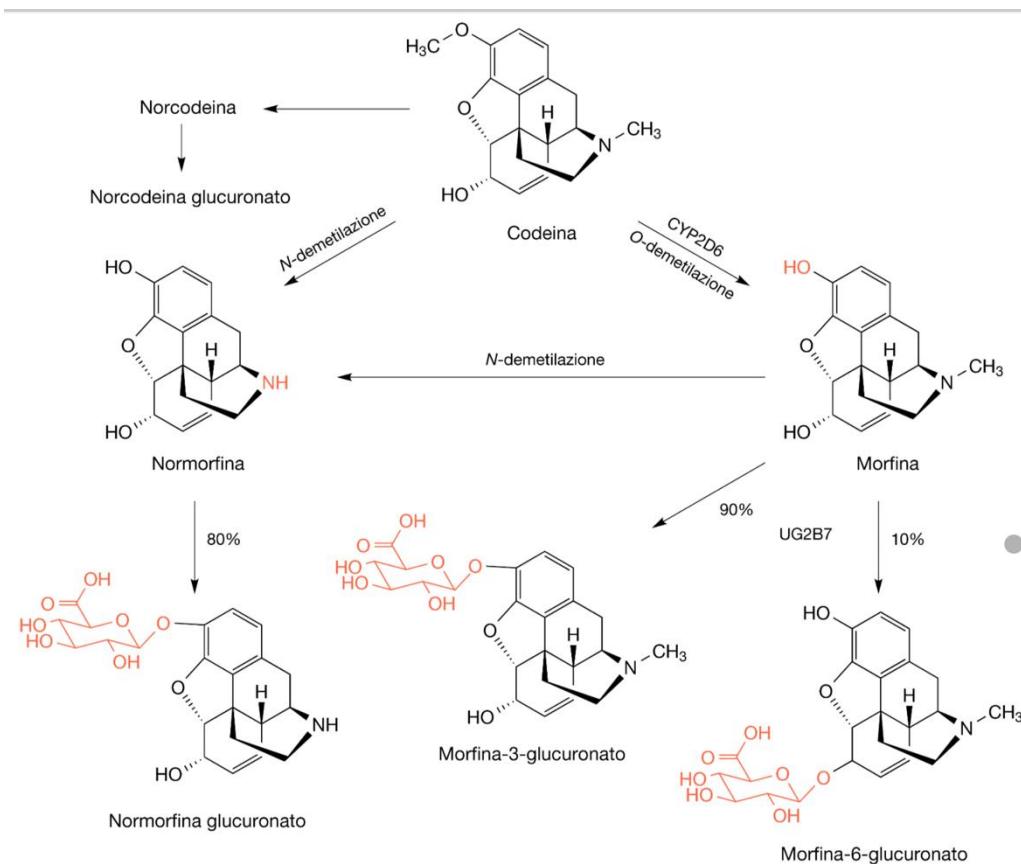


Metabolismo della morfina e della codeina

La codeina ha 1/10 di attività della morfina, proprio per la presenza di un metossile. In vivo una piccola percentuale (10%) di codeina subisce una O-demetilazione, portando alla formazione della morfina (OH) da cui deriva l'effetto.

La codeina e la morfina subiscono anche N-demetilazione per formare: Norcodeina e Normorfina, che hanno un'azione molto più debole rispetto ai precursori; il metile sull'N non è necessario, può essere sostituito anche con altri gruppi, se si ha demetilazione e si passa da ammina terziaria ad ammina secondaria, l'attività diminuisce.

La codeina e la morfina hanno dei gruppi ossidrilici e possono essere metabolizzate mediante glucuronoconiugazione sia sull'OH in posizione 3 della morfina, sia sull'OH in 6 di entrambi i composti. L'effetto provocato è diverso; mentre la morfina 3 glucuronato è inattiva nei confronti del recettore oppioide, la morfina 6-glucuronato, con OH in 3 libero, mantiene un'attività sul recettore oppioide. La molecola glucuronidata in 6 ha minore lipofilia e quindi minore capacità di attraversare la barriera emato-encefalica da un punto di vista teorico; in realtà si è visto che si dispone in maniera compatta dato che il gruppo glucuronato può formare legami ad H intramolecolari con l'OH in 3 e con l'O epossidico, in modo da rendere la molecola nel complesso meno polare, motivo per cui conserva parte di attività della morfina, nonostante sia apparentemente più idrofila.



Sintesi della etorfina

L'etorfina rappresenta l'unico derivato che deriva da una complicazione molecolare della morfina; infatti, oltre agli anelli che compongono la molecola di morfina, si ha un ulteriore anello e questo fa sì che la classe a cui appartiene l'Etorfina è detta classe delle Oripavine, che derivano dalla cicloaddizione di Diels-Alder fra un diene e un dienofilo. Siccome è necessario un diene, per far sì che venga attaccato da un dienofilo, è necessario avere un anello con 2 doppi legami che è quello della tebaina. La tebaina è un alcaloide fenantrenico presente nell'oppio, infatti la tebaina oltre ad avere i 2 metossili in 3 e in 6, ha un doppio

legame in 6=7 e in 8=14. Il fatto che abbia il metossile in posizione 3 determina una diminuzione dell'attività a livello del SNC, come già visto per la codeina. Il dienofilo che deve attaccare la tebaina a livello dei 2 doppi legami coniugati, è il Vinilmethylketone, ovvero un alchene coniugato con un gruppo elettron attrattore che è un carbonile (=il dienofilo è un carbonile alpha-beta insaturo). Con la reazione di Diels-Alder dal doppio legame del diene e dal doppio legame del dienofilo, si formano 2 legami sigma e 1 legame π .

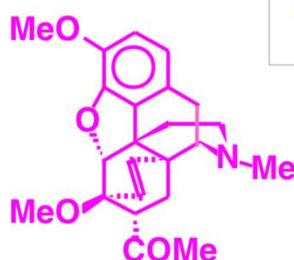
L'attacco del dienofilo, per formare il nuovo ciclo, avviene sui C1 e C4 ovvero sui C6 e C14 dell'anello della tebaina con la formazione di 2 nuovi legami sigma, mentre i due legami π della tebaina danno vita ad un unico doppio legame centrale. Ciò che succede è la formazione di un nuovo ciclo e dal momento che è stato usato un Vinilmethylketone, l'anello presenterà un gruppo metil-chetonico. Il carbonile, nell'addotto di Diels Alder, può dare un'ulteriore reazione; infatti, è possibile inserire il gruppo n-propilico mediante reazione di Grignard con propil-magnesio-cloruro e da questa reazione si forma il gruppo alcolico e si inserisce la catena che è una catena propilica. Bisogna ora eliminare il metossile, perché l'attività è 1/10 rispetto a quella della morfina ed è necessario liberare un metossile (O-demetilazione) mediante KOH ad alte temperature. Sono presenti 2 metossili: il metossile sull'anello aromatico è più reattivo dato che è maggiormente ingombro rispetto all'OCH₃ alifatico; la demetilazione dell'OCH₃ alifatico può avvenire dato che non è importante ai fini dell'interazione. Il metossile può essere anche demetilato con acido bromidrico. Ciò che si ottiene è la molecola dell'etorfina, una molecola molto potente rispetto alla morfina che viene usata su animali non sull'uomo.

L'attacco avviene nella posizione sopra il piano, identificato dagli anelli C e D, per ingombro sterico sull'altra faccia.

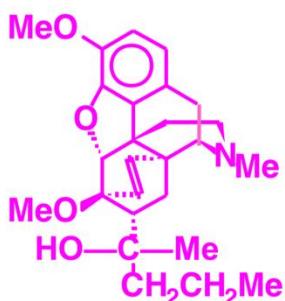
Agonisti Oppioidi (sintesi: etorfina)



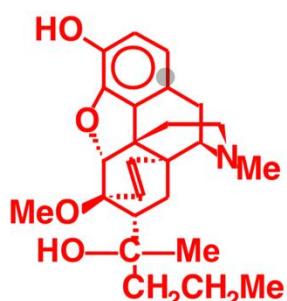
$\text{CH}_2=\text{CHCOCH}_3$
Diels-Alder



$\text{C}_3\text{H}_7\text{MgCl}$



$\text{KOH}, 200^\circ\text{C}$
(O-demetilizzazione)
oppure
 HBr



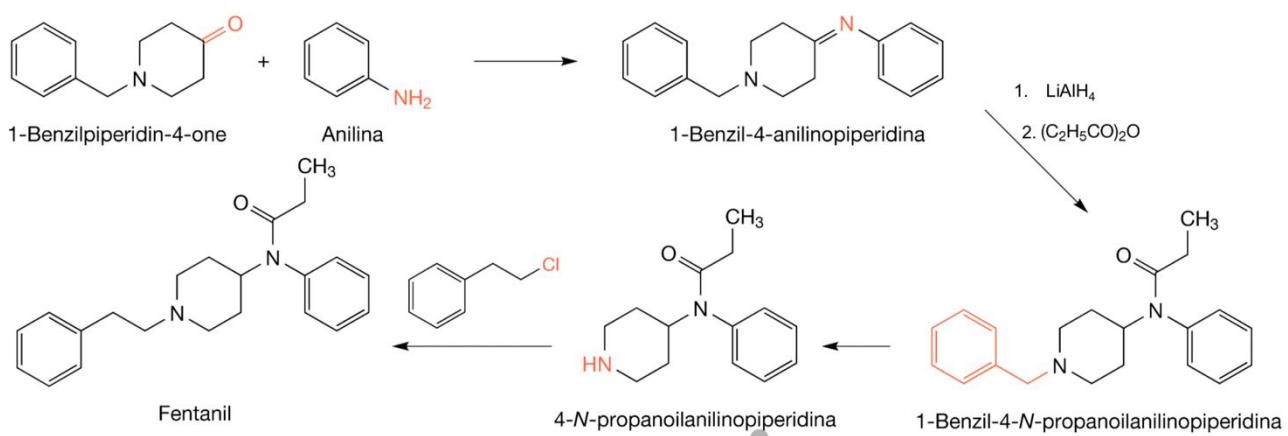
Sintesi di Fentanil

Il fentanil appartiene alle 4-fenilpiperidine, è una molecola molto potente, viene usata nella neurolettoanalgesia, il suo dosaggio deve essere opportunamente controllato perché ha una potenza

tossicomanigena maggiore rispetto alla morfina. Il fentanil è una molecola che per le sue caratteristiche agisce sul sito P, dove vanno ad interagire le molecole più semplificate rispetto alla morfina; quindi, non è necessario l'OH sull'anello aromatico, ma ciò che aumenta l'attività delle molecole è la presenza del fenetile sull'N. Il fentanil differentemente dalla Meteridina che è il prototipo della classe, non ha un gruppo estereo ma un gruppo ammidico, ed è un derivato propionanilidico, "anidilico" perché l'N appartiene ad un anello aromatico (anilina), "propion" perché è legato ad una catena a 3 termini.

Sintesi:

Si parte da un 4-piperidinone, ovvero una molecola che presenta un C=O in 4 e un gruppo amminico protetto con il benzile, perché l'NH₂ potrebbe dare interazioni con il carbonile e viene venduto già in forma protetta. Faccio la reazione di addizione al C=O con l'anilina e si forma la base di Schiff o immina. Bisogna ridurre la base di Schiff per farne la corrispondente anilide con anidride propionica. Essendo un doppio legame coniugato all'anello aromatico, la reazione di riduzione avviene in presenza di LiAlH₄ (il NaBH₄ non dava risultati apprezzabili); si ottiene ora l'anilina che per reazione con anidride propionica forma la propanoil-anilide. A questo punto bisogna liberare il gruppo amminico della piperidina che non dà più interferenze. Nel fentanil è presente un gruppo fenetilico e possiamo effettuare con cloruro di fenetile sul gruppo amminico della piperidina, la reazione di sostituzione nucleofila per dare il Fentanil.

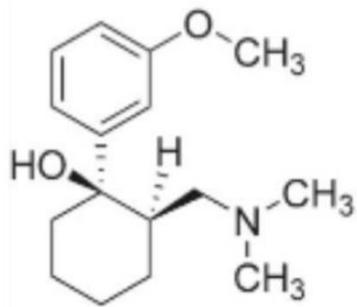


Tramadol agonista

È un agonista oppioide utilizzato come analgesico. È stato progettato alla fine degli anni 70 dalla Grunenthal (azienda farmaceutica tedesca che si occupa di analgesia). In tal caso si ha una molecola con un atomo di azoto terziario, un anello aromatico e la catena laterale è inserita in un ciclosesano. Appartiene alla classe delle fenil-propilammime. La storia del tramadol è stata interessante, prima veniva comprato liberamente e nell'ottobre del 2022 è rientrato nella tabella degli stupefacenti. Nel 2013 un gruppo di ricercatori francesi trovarono tale composto in natura, dalle radici di una pianta sub-Sahariana, la Nauclea latifolia del Camerun. I ricercatori tedeschi passarono al controattacco e notarono che la presenza di tramadol era legata ad una contaminazione antropogenica, umana. Le persone che assumevano tramadol, con gli escrementi, avevano contaminato le radici della pianta. Questo per dire che il tramadol è un composto solo sintetico.

Aspetto importante del tramadol: **non agisce solo sul sistema oppioide ma blocca anche il sistema di Reuptake della serotonina e adrenalina.**

È un potente analgesico con tutti gli effetti collaterali tossicomanigeni che ha la morfina.



Antagonisti oppioidi

Le molecole aventi azione antagonista sono in quantità minori. Tali molecole derivano per modificaione della molecola di morfina. Da un punto di vista terapeutico tali molecole sono usate come farmaci salvavita, perché agiscono antagonizzando la depressione respiratoria in seguito a overdose, ad esempio, di stupefacenti agonisti oppioidi, quali eroina. La depressione respiratoria può essere pericolosa anche nei pazienti in cui si effettua un trattamento del dolore profondo legato ai morfino-simili, che porta ad un aumento progressivo del dosaggio. Ciò può rappresentare un pericolo, perché l'aumento del dosaggio può portare a depressione respiratoria, motivo per cui spesso vengono somministrati assieme a dosi controllate di antagonisti quali Naloxone o di Naltrexone, per controllare questo effetto collaterale. Questi possono essere usati anche per verificare l'abuso di droghe, in quanto la somministrazione di tali antagonisti in una persona che fa uso di eroina, ad esempio, scatena una crisi di astinenza.

La sintomatologia da overdose è nota: miosi, respirazione superficiale (si ha un'iniziale depressione del respiro che evolve in grave depressione respiratoria), ipotermia, riflessi osteo-tendinei ridotti o assenti, cianosi, bradicardia e ipotensione che prelude ad un collasso respiratorio, grave depressione respiratoria, anossia cerebrale e la morte avviene per insufficienza cardiorespiratoria acuta che porta al coma.

Tali molecole si possono dividere in:

- **Competitivi:** sono dei farmaci che interagiscono in maniera reversibile con il ligando
- **Non competitivi:** se ne è occupato il professor Portoghesi, che ha trasformato la molecola della morfina con dei residui tali che erano in grado di legare il recettore in maniera irreversibile, trasformando ligandi reversibili in ligandi non competitivi irreversibili.

L'N 17 è uno dei punti più importanti per modificare l'attività della molecola, solo l'N17 non basta ma è uno dei punti più importanti. Queste SAR sull'N 17 sono concordi tra di loro per le classi: 4-5 e possi-morfinani, Benzomorfani, Morfinani e anche per le Oripavine. Ma non sono concordi per la classe delle Fenilpiperidine e per le fenilpropilammime; infatti, se noi inseriamo dei sostituenti che di solito danno azione antagonista nei primi derivati, questo non è riproducibile nei derivati semplificati. Si è visto, intorno al 1916, mentre si effettuavano studi di SAR, che si poteva passare da un agonismo ad un agonismo parziale per i composti morfino simili, inserendo vari gruppi sul N17 della codeina. Si è visto che inserendo un gruppo allile su N17, si spostava l'attività da agonista a debole agonista parziale. La stessa modifica, intorno agli anni 50, è stata effettuata anche sulla molecola di morfina e il primo derivato con azione agonista parziale nei confronti del recettore oppioide fu la **Nalorfina**, dove sull'N17 è stato inserito un gruppo allile (N=AZOTO; AL=ALLILE). Quindi ciò ha fatto pensare che se si studiava l'N17 e si inserivano altri gruppi, si poteva arrivare ad un'azione antagonista pura. Quindi sono stati fatti tutti questi derivati che per la maggior parte conservano dei doppi legami in catena laterale (allile, catena butilenica...) che hanno dato origine ad uno spostamento dell'attività della molecola di morfina da agonista a agonista parziale con una debolissima attività residua. Poi sono stati studiati i residui metil-ciclici, in cui il ciclo poteva essere: ciclopropile, ciclobutile, diidofurano. Inserendo questi cicli si ottiene attività agonista parziale. Tutto ciò vale per 4-5 e possi-morfinani, Benzomorfani, Morfinani, con le classi meno ingombrate non si avevano gli stessi risultati.

Inoltre, si sono studiati i requisiti per avere un antagonismo puro e si è visto che oltre al sostituente in N17 (quali metil ciclopropile e l'allile), per avere antagonismo puro deve essere presente:

- Il carbonile in posizione 6

- Non deve essere presente il doppio legame in posizione 7=8
- Presenza di un gruppo ossidrilico in 14 e per ragioni di ingombro sterico deve stare sopra il piano in β .

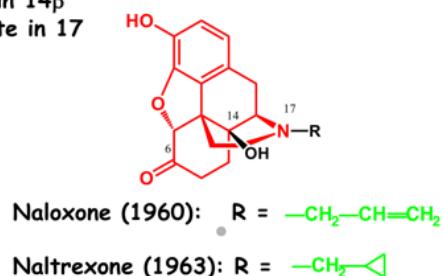
Da tutte queste SAR negli anni 60 sono entrati in terapia degli antagonisti puri per il recettore oppioide quali:

- **Naloxone**: con il gruppo allile, con il carbonile in 6
- **Nalrexone**: con il gruppo ciclopropilico

Tali molecole sono in grado di antagonizzare l'azione di Morfina e derivati.

Requisiti per l'antagonismo puro

- carbonile in 6
- ossidrile in 14β
- sostituente in 17



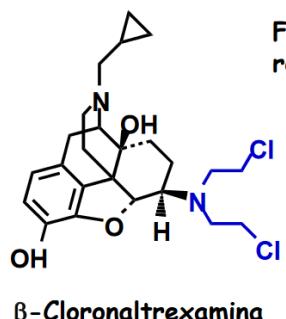
Antagonismo irreversibile

Il gruppo del professor Portoghese ha studiato anche la possibilità di avere un antagonismo di tipo **irreversibile** verso il recettore per gli oppioidi.

Sappiamo che la posizione 6 è una posizione non critica dal punto di vista della sostituzione, infatti, nella morfina è presente il gruppo OH che può essere eliminato o convertito in carbonile; quindi, è la posizione meno critica dal punto di vista dell'interazione e delle modificazioni.

Se si inserisce in posizione 6 al Naltrexone il gruppo β -cloroetilamminico, si ottiene la **β -Cloronaltrexamina**, caratterizzata dall'OH in 14β e anche dal gruppo metil ciclopropilico; in particolare, questo sostituente (β -cloroetilamminico) permette di formare lo *ione aziridinio* per ciclizzazione dell'alogenuro sull'atomo di azoto, creando un gruppo molto reattivo che può dare un attacco con un addotto covalente a livello recettoriale. In questo modo si sposta l'attività del Naltrexone da attività antagonista competitivo ad antagonista irreversibile.

La β -Cloronaltrexamina non è una molecola utilizzata in terapia, ma è un importante tool farmacologico per l'inibizione irreversibile del recettore oppioide.

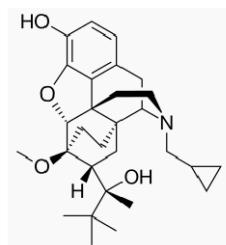


Azione sui recettori k e δ

La trattazione dei farmaci attivi sul sistema oppioide è stata incentrata soprattutto su quelli che agiscono sul **recettore μ** (perché sono quelli più presenti in terapia). Molti derivati della morfina danno però interazione anche con gli altri sottotipi recettoriali **k** e **δ** ; questi hanno sempre un effetto analgesico ma cambiano gli effetti collaterali: ad esempio, nei recettori μ si ha assuefazione e dipendenza, mentre questo effetto è minore nei recettori **k**; inoltre, nei μ si ha anche euforia, mentre nei **k** si ha disforia. Quindi alcune attività (a parte quelle dell'analgesia, mediata soprattutto dai **k**) possono essere un po' diverse.

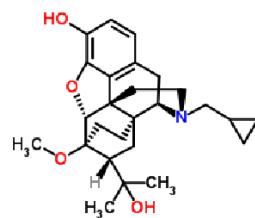
A questo punto possiamo chiederci se tutti i ligandi visti fino ad adesso abbiano attività sui recettori **k** (il nome deriva dalla ketocicloclazocina, che è un potente agonista selettivo) e **δ** (da bass deference).

Analogamente a quanto visto per la morfina, anche nella classe delle Oripavine, la **Buprenorfina** – corrispondente dell'etorfina – si comporta da agonista parziale sui recettori μ e sull'N ha il gruppo N-metil-ciclopropilico; è potente antagonista dei recettori k.



Buprenorfina
agonista parziale μ ,
antagonista K

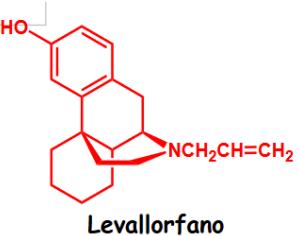
Un antagonista puro verso tutti i sottotipi recettoriali (μ , δ e k) è un derivato oripavinico, ovvero la **Diprenorfina** che, come l'etorfina, è solo ad uso veterinario. Anche in questo caso si osserva il gruppo metil-ciclopropile.



Diprenorfina:
Antagonista (uso veterinario)

Un altro antagonista del recettore per gli oppioidi è il **Levallorfanolo**, ottenuto dall'inserimento di un gruppo allilico sull'N in 17 del levorfanolo.

In tutte queste molecole l'OH è sempre presente.



Levallorfanolo

Infine, abbiamo considerato i derivati analoghi alla metazocina, la cui struttura ha due metili che possono trovarsi in cis o in trans tra loro; il centro chirale in 13 non può essere modificato, a differenza del 14 (il metile può anche essere in β – *trans* *metazocina* – con miglioramento dell'attività della molecola).

Metazocina e *trans*-metazocina sono due agonisti.



Quando si inseriscono dei sostituenti allilici su queste molecole, si ottengono degli antagonisti μ che, in linea con quanto già detto per la classe dei 4,5-epossi-morfinani, benzomorfani e morfani, mantengono l'attività antagonista (**Pentazocina**). La pentazocina è un agonista parziale dei recettori k, quindi ha una debole azione analgesica, molto meno potente rispetto a quella della morfina. Quando al posto del gruppo allilico inserisco un metil-ciclopropile, si ottiene un agonista k e agonista parziale μ .

La potenza verso il sottotipo k viene aumentata se si inserisce il sostituente carbonilico sul cicloesano: il derivato che ha contemporaneamente il metil-ciclopropile sull'N e il carbonile è la **Ketocicloclazocina**, ovvero l'agonista più potente verso il recettore k.

Quindi le stesse molecole hanno azione diversa sui diversi sottotipi recettoriali.

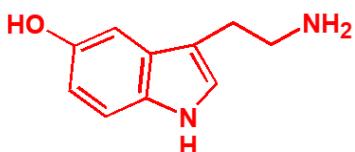
Pentazocina: $R = -CH_2-CH=C(CH_3)-CH_3$
agonista parziale κ , agonista parziale σ
antagonista μ . potenza analgesica < morfina.

Ciclazocina: $R = -CH_2-$
Agonista parziale μ , agonista κ

Ketocicloclazocina: $R = -CH_2-$
 $R' = =O$
Agonista κ

SISTEMA SEROTONINERGICO

Abbiamo già parlato di questo neurotrasmettore per la stretta connessione del suo metabolismo e delle sue caratteristiche strutturali con i sistemi dopaminergico e noradrenergico; abbiamo infatti visto che alcuni ligandi hanno selettività non solo sul sistema adrenergico e dopaminergico, ma anche sul serotoninergico. Questo è dovuto anche alla presenza dell'*anello indolico* che è bioisostero del fenolo nella relazione struttura attività dei derivati dopaminergici.



La serotonina, il cui nome deriva da *siero* in quanto presente nel sangue, ha una *struttura indolica*; in particolare, è una **5-idrossi triptamina** (la numerazione parte dall'N indolico) ed è sostituita in posizione 3 con una catena *etilamminica*; l'anello indolico con questa catena laterale prende il nome di **triptamina**, che deriva a sua volta dall'amminoacido Triptofano.

I recettori su cui va ad agire, classificati in 7 sottotipi recettoriali, sono

indicati con la sigla **5-HT**.

Negli anni, il nome della serotonina ha subito delle modifiche, prima di capire che tutte le sostanze isolate in vari distretti dell'organismo, in realtà, erano la stessa cosa.

Il primo isolamento della 5-idrossi triptamina risale al 1900: venne isolato un agente vasocostrittore dal sangue e il nome che gli fu attribuito per via del suo effetto è **vasotonina**. Successivamente, nel 1935, un altro gruppo di ricercatori scoprì un'ammina (una molecola basica) isolata dalla mucosa gastrointestinale (infatti la serotonina è sintetizzata anche a livello delle cellule enterocromaffini gastriche); per la localizzazione a livello gastroenterico, la molecola fu chiamata **enteramina** e si vide che questa sostanza aveva anche la capacità di contrarre la muscolatura liscia di ratto. Nel 1950 si scoprì una sostanza vasocostritrice rilasciata dalle piastrine nel processo di coagulazione; unendo il termine *tonina* (in quanto vasocostrittore) a *siero*, questa sostanza fu chiamata **serotonina**.

Solo nel 1952 vasotonina, enteramina e serotonina furono associate alla stessa molecola, al cui venne dato in definitiva il nome di **5-idrossi-triptamina**.

Ruolo fisiologico

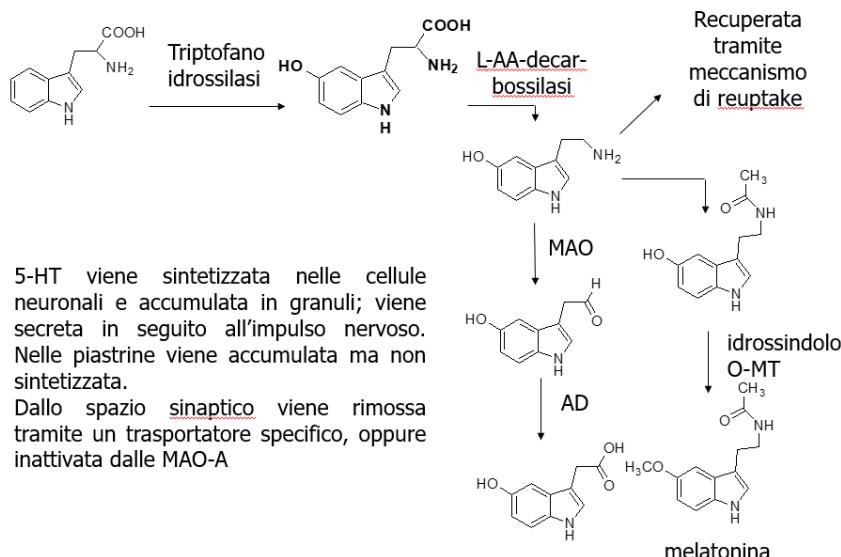
La serotonina è un neurotrasmettore, in quanto ha un sistema recettoriale sia a livello centrale che periferico, ma per l'80% non deriva dalla biosintesi a livello neuronale, bensì da quella a livello delle cellule enterocromaffini gastriche. È distribuita anche a livello del sistema cardiovascolare in particolare nelle piastrine, dove viene liberata nei processi di coagulazione; non viene però prodotta al loro interno: infatti la serotonina che si trova nelle piastrine è captata dal circolo.

Per quanto riguarda l'azione della serotonina a livello del SNC, l'abbiamo già vista nell'ambito degli antidepressivi e in particolare degli inibitori selettivi del re-uptake della serotonina; infatti, la serotonina è coinvolta in alcune funzioni importanti quali sonno, stati comportamentali, nausea e vomito, modulazione di altri sistemi recettoriali; normalmente, viene definito come neurotrasmettore ad azione inibitoria perché la carenza di serotonina dà origine a comportamenti aggressivi. Abbiamo parlato di serotonina anche in riferimento agli antipsicotici e in quel caso il recettore maggiormente coinvolto è il 5HT-2A.

A livello periferico, l'attività della serotonina riguarda prevalentemente la motilità del tratto gastroenterico, motivo per cui molti farmaci agonisti serotoninergici sono definiti pro-cinetici (aiutano lo svuotamento gastrico); ha un effetto importante anche a livello vasale (si comprende già dal nome di vasotonina) perché è coinvolta nel controllo della pressione arteriosa e a seconda del distretto di interesse può avere azioni contrastanti: in generale provoca vasodilatazione, mentre a livello delle coronarie dà vasocostrizione. Agisce anche sul sistema renina-angiotensina, in particolare sulla produzione di renina, aumentando la pressione arteriosa.

Un altro aspetto importante è il suo ruolo nella liberazione di ormoni di natura peptidica, in particolare dell'ossitocina e di prolattina (si ricorda che il sistema dopaminergico, al contrario, ne inibisce la liberazione).

Biosintesi e catabolismo



5-HT viene sintetizzata nelle cellule neuronali e accumulata in granuli; viene secreta in seguito all'impulso nervoso. Nelle piastrine viene accumulata ma non sintetizzata.

Dallo spazio sinaptico viene rimossa tramite un trasportatore specifico, oppure inattivata dalle MAO-A

La biosintesi della serotonina ha inizio a partire dal **triptofano** (aa).

Il primo step prevede l'ossidrilazione dell'anello indolico in posizione 5, da parte della *triptofano idrossilasi*; segue poi la decarbossilazione, per azione della decarbossilasi, che converte la catena laterale amminoacidica in etil-amminica: si ottiene così la **5-OH triptamina**.

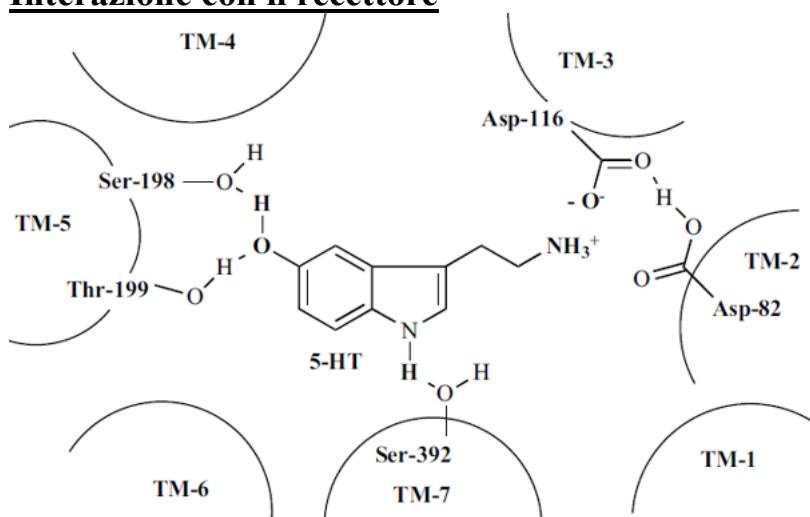
Per quanto riguarda la terminazione della trasmissione nervosa, la 5-idrossi-triptamina è soggetta al reuptake da parte del trasportatore SERT che ha struttura analoga a quello della dopamina (DAT) e della noradrenalina (NET); il neurotrasmettore è recuperato come tale e re-immagazzinato nelle vescicole sinaptiche.

La 5-idrossi-triptamina è anche soggetta a inattivazione enzimatica, in particolare per azione delle MAO: quella maggiormente attiva è la **MAO-A**, che trasforma il terminale amminico in aldeidico e successivamente l'aldeide deidrogenasi la converte in acido indol-acetico.

Parallelamente alla via delle MAO c'è quella dell'acettilazione del gruppo aminico primario della catena laterale: si ottiene un composto inattivo che, per azione dell'*idrossi-indolo metil transferasi* (trasferisce il gruppo metilico sull'OH in 5 a dare la funzione metossilica), viene convertito in **melatonina**.

La melatonina è usata in terapia per ripristinare il ritmo circadiano sonno-veglia.

Interazione con il recettore



Si consideri l'interazione della serotonina con il sottotipo recettoriale 5HT-1A:

- *interazione elettrostatica* con il residuo di Aspartato 116 sul TM-3 (conservato in tutti i recettori per le ammine biogene); questo legame è anche rinforzato dalla presenza di un altro Aspartato sul TM-2.

- rete di *legami a idrogeno* del OH con i residui di ser e treonina sul 5TM, e un altro legame a idrogeno con la serina sul 7TM con l'NH indolico.

Recettori

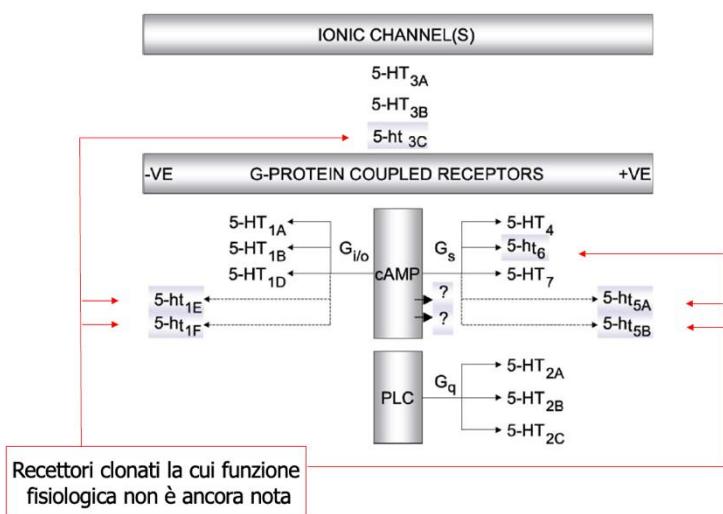
Sono stati distinti 7 sottotipi recettoriali, di cui una parte sono presinaptici (**5HT-1A, 1B, 1D**) e l'altra sono postsinaptici (**5HT-1A, 1B, 1D, 1F, 1E, 2A, 2B, 2C, 4** e infine **5, 6, 7** anche se poco rappresentati). Sono tutti accoppiati a proteina G.

I recettori HT-3 sono recettori ionotropi di classe I, pentamerici e permeabili a Na^+ e Ca^{2+} quindi portano a depolarizzazione della membrana; sono quelli maggiormente coinvolti nel senso di nausea e vomito; infatti, gli antagonisti sono usati come antiemetici in associazione con i chemioterapici.

Caratteristiche dei recettori

Non è una classe omogenea in quanto abbiamo sia recettori accoppiati a proteina G, sia recettori canale, dove l'unico sottotipo è rappresentato dal recettore 5HT3 e vede un'ulteriore classificazione in 5HT3-A e C. I recettori accoppiati a proteina G si classificano relativamente a quelli associati a proteina G e associati a proteina Gs e Gq. I recettori della superfamiglia 5HT1 che si classificano ulteriormente in 1A, 1B, 1D, 1E e 1F, dove 1E ed F sono stati caratterizzati solo più recentemente dal punto di vista farmacologico, sono accoppiate tutte alla proteina Gi e diminuiscono la produzione di AMP ciclico attraverso la inibizione dell'adenilato ciclasi. I recettori 5HT4, 6 che sono stati caratterizzati anche farmacologicamente e 5HT7 sono accoppiati positivamente con l'adenilato ciclasi in quanto stimolano la proteina Gs.

Infine, i 5HT2 sono recettori accoppiati a proteina Gq e quindi all'idrolisi tramite la fosfolipasi C dell'inositol trifosfato e diacilglicerolo. Questi portano come effetto finale a un effetto maggiormente eccitatorio.



Irecettori 5HT1 e 5HT5 sono considerati dei recettori di tipo inibitorio. Mentre i recettori 5HT1-A sono stati caratterizzati in tutte le loro sottospecie dal punto di vista anche farmacologico, i recettori 5HT5 non hanno farmaci che agiscono su di essi anche se sono stati trovati comunque dei ligandi selettivi. Gli altri sottotipi recettoriali 5HT2, 3 e 4 (non vedremo 5HT6 e 7 non saranno visti perché non ci sono farmaci in terapia) sono considerati dei recettori stimolatori.

L'impiego terapeutico spazia per farmaci che agiscono a livello centrale e farmaci che invece hanno azione prevalentemente periferica. La classe di recettori maggiormente studiata per ciò che riguarda la ricaduta in terapia è quella dei recettori 5HT1. A questi sottotipi recettoriali appartengono i recettori presinaptici che sono principalmente di sottotipo 1A, 1B ma anche 1D.

I recettori 5HT1-A che hanno un prevalente localizzazione presinaptica, sono coinvolti nella modulazione non solo del rilascio di serotonina ma anche nel rilascio di altri neurotrasmettitori e ormoni. In particolare, rivestono un ruolo importante nella regolazione dell'ormone adrenocorticotropo e sono coinvolti maggiormente nella regolazione dell'ansia. Infatti, gli agonisti parziali dei recettori 5HT1-A sono farmaci ansiolitici, vengono detti ansiolitici atipici, da differenziare dai farmaci ansiolitici come le benzodiazepine, ma agiscono con un meccanismo differente e non danno origine all'effetto di sedazione visto per le benzodiazepine, così come quello di induzione del sonno.

Gli altri sottotipi recettoriali **5HT1B e D** (manca 1C perché era stato classificato ma poi si è visto che era identico a un sottotipo già caratterizzato) sono i recettori maggiormente coinvolti nella vasocostrizione carotide, e cioè la vasocostrizione a livello della circolazione cerebrale e per questa ragione controllano una patologia molto dolorosa a livello dell'encefalo che è l'emicrania. Non sono recettori solo post-sinaptici ma

hanno anche una localizzazione presinaptica e sono coinvolti anch'essi nella regolazione della liberazione dei neurotrasmettitori. In particolare, in riferimento alla patologia dell'emicrania dove vengono rilasciati dei peptidi vasoattivi che creano la vasodilatazione e dolore, hanno la funzione di modulare in maniera negativa il rilascio di questi peptidi vasoattivi coinvolti. Più recentemente oltre ai sottotipi 1D e 1B, anche i recettori 1F e 1E sono stati studiati relativamente al loro effetto di modulazione presinaptica di questi peptidi. Sono ancora in fase di chiarimento.

I recettori 5HT2 si distinguono in 2A, 2B e 2C. Più recentemente i 2B e 2C sono stati classificati come maggiormente coinvolti nella assunzione di cibo. Per questo motivo gli agonisti soprattutto quelli che agiscono selettivamente nei confronti del sottotipo 5HT-2C, sono utilizzati per il controllo dell'obesità. Il 5HT-2A è il sottotipo recettoriale maggiormente coinvolto a livello centrale negli stati comportamentali. Inoltre, hanno il compito di provocare la produzione e la secrezione di ormoni non solo adrenocorticotropo e renina, e per questa regione hanno effetto ipertensivo e sono gli altri farmaci usati nel controllo della schizofrenia, in quanto regolano gli stati comportamentali. Molti dei dopaminergici di seconda generazione, gli "atipici", hanno anche azione antagonista 5HT-2A, hanno un effetto anche antipertensivo: molti sono stati studiati ma si portano dietro molti effetti collaterali, in quanto è difficile scindere l'effetto periferico da quello centrale. Inoltre, i 5HT-2A mediano anche l'aggregazione piastrinica.

I 5HT3 sono quelli maggiormente coinvolti nel vomito e nella nausea. La loro attivazione a livello del SNC è strettamente correlata alla dopamina. La dopamina ad alte concentrazioni ha un effetto emetico, tant'è che l'apomorfina viene proprio utilizzata per trattare le intossicazioni come emetico. Quindi sono recettori coinvolti nella liberazione di dopamina e ciò fa sì che gli antagonisti vengano utilizzati nel controllo del vomito, soprattutto in quello indotto da chemioterapici e radioterapici in pazienti che stanno svolgendo dei cicli di queste.

Infine, i 5HT4 sono quelli coinvolti a livello periferico come procinetici nella peristalsi gastrointestinale: questo perché provocano la contrazione sia a livello esofageo che del colon, e determinano uno svuotamento e passaggio verso il basso e sono utili nella patologia del reflusso gastroesofageo.

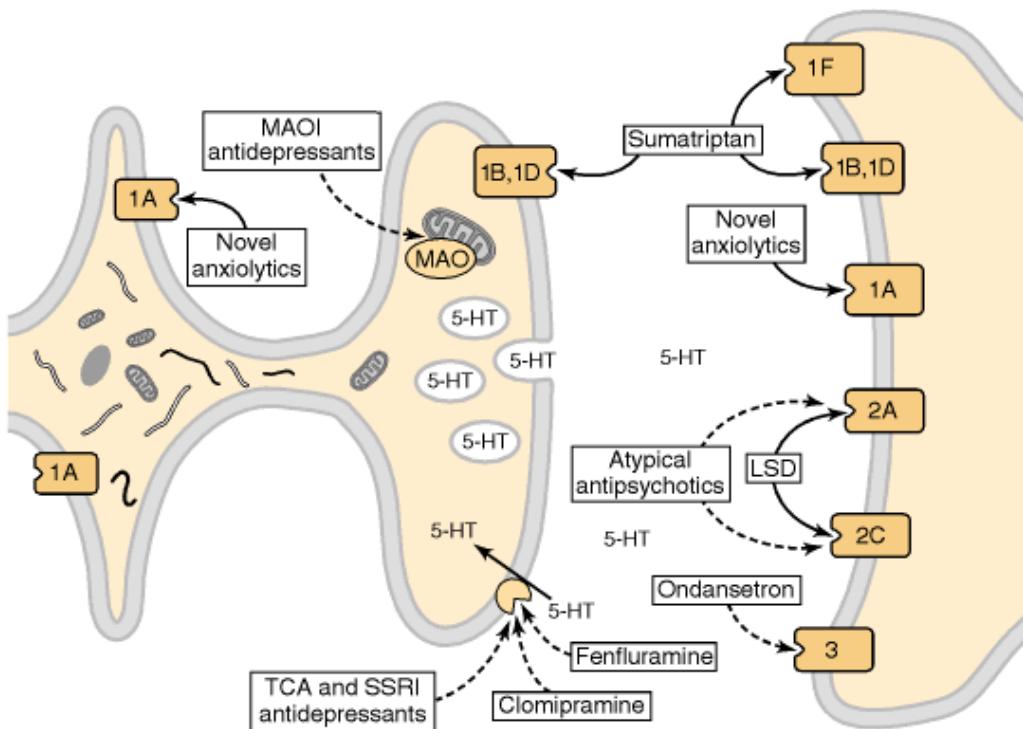
I 5HT5 non hanno un ruolo chiaro; i 5HT6 hanno un coinvolgimento della memoria e nell'apprendimento e hanno quindi un potenziale ruolo nelle patologie neurodegenerative ma sono ancora in fase di studio; i 5HT7 sono coinvolti principalmente nella termoregolazione.

La serotonina, oltre ad essere coinvolta negli stati comportamentali, negli stati di ansia e nel controllo della nausea e del vomito, e sono coinvolti in queste funzionalità; inoltre è correlata alla melatonina essendone il precursore. Infine, i 5HT7 hanno anche un ruolo nel ritmo circadiano.

Farmaci che interagiscono con il sistema serotoninergico in varie patologie

Si ha una localizzazione presinaptica prevalentemente a carico dei recettori 5HT-1A, 1B e 1D. questi normalmente non condividono nel neurone presinaptico la stessa localizzazione: 1B e 1D sono a livello della membrana presinaptica nel terminale, gli 1A sono a livello somato-dentridici e sono a livello del soma e

dell'assone e sono i recettori dove interagiscono principalmente gli ansiolitici atipici per distinguerli dalle benzodiazepine.



Gli inibitori delle MAO agiscono prevalentemente sulla MAO-A, che maggiormente è coinvolta nel metabolismo della serotonina. La MAO ha sempre effetto di deaminazione ossidativa del terminale amminico. Hanno effetto antidepressivo perché aumentano la concentrazione di serotonina.

Gli altri farmaci agiscono sui recettori del sottotipo 5HT-1B, 1D e 1F dopo caratterizzazione e queste molecole che agiscono sia sui recettori pre e post-sinaptici sono i cosiddetti triptani, con una struttura strettamente correlata alla serotonina; il prototipo si chiama sumatriptan.

Gli ansiolitici agiscono sui recettori 1A pre e post-sinaptici e sono agonisti parziali del recettore 5HT-1A e appartengono alla classe degli azapironi. La struttura non è analoga a quella della serotonina.

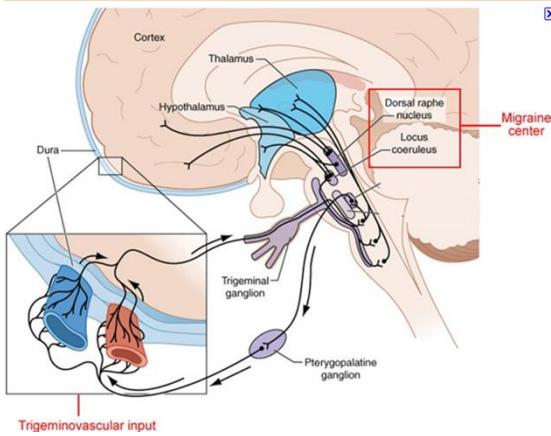
Recettori 2A e 2C: i 2A hanno azione periferica correlata all'azione degli antagonisti 5HT-2A anche come antipertensivi; sono anche antipsicotici e quindi alcune strutture di questi antipertensivi assomigliano ad alcuni antipsicotici atipici. Si vedrà, inoltre, un agonista 5HT-2C che invece è utilizzato nel controllo dell'assunzione del cibo e quindi nella obesità solo negli adulti. È una molecola abbastanza selettiva che rappresenta un analogo rigido della serotonina.

Per i 5HT3 gli antagonisti (unici recettori canale) agiscono con un meccanismo a livello centrale, stimolando il centro del vomito. Questo avviene non solo per stimolazione della dopamina ma anche di altri peptidi; quindi gli antagonisti il cui prototipo è il Tropisetron sono utilizzati nel controllo del vomito come antiemetici insieme ai chemioterapici. Infine, esiste un trasportatore della serotonina deputato al suo re-uptake a livello del neurone presinaptico. Così come gli inibitori del re-uptake di noradrenalina che sono poco selettivi, quelli della serotonina sono inibitori selettivi. La proteina che provoca il re-uptake condivide una struttura a 12 domini transmembrana, quindi, non è semplice trovare una selettività per una proteina trasportatrice rispetto ad un'altra. La maggiore selettività si è avuta con la proteina trasportatrice della serotonina che viene chiamata Sert. Gli inibitori del re-uptake della serotonina il cui prototipo è la Fluoxetina, sono farmaci antidepressivi.

Agonisti 5HT-1B, 1D,1F

Manca l'1E perché appartiene ai recettori coinvolti nella patologia dell'emicrania ma non è stato ancora caratterizzato in maniera completa. L'emicrania è il più comune disturbo cerebrale. Normalmente è caratterizzato da mal di testa che colpisce solo una parte. Questo dolore a volte è talmente forte da limitare la

vita sociale ed è accompagnato da fotofobia, vomito e altri sintomi tutti associabili a sensibilità sensoriale.



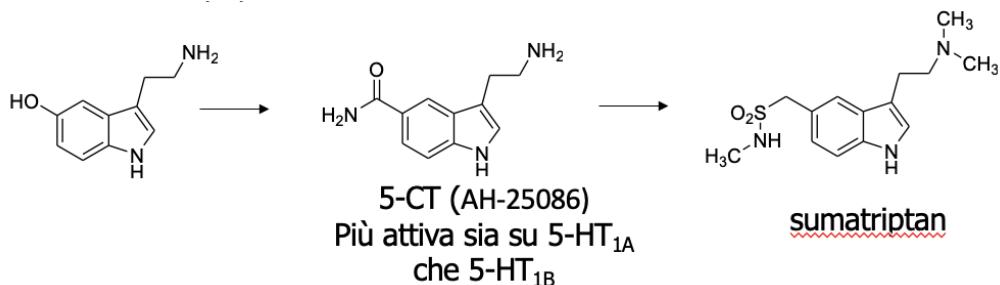
B Fino a pochi anni fa il disturbo veniva associato a una vasodilatazione dei vasi vascolari a livello della dura madre. Più recentemente si è associato questa patologia a una infiammazione trigemino vascolare da cui dipenderebbe il dolore associato agli attacchi di emicrania. Sia nell'infiammazione trigemino vascolare che nell'evento vasodilatatorio che determina pressione endocranica c'è un peptide CGRP (peptide correlato geneticamente alla calcitonina) il quale insieme alla sostanza P dilata i vasi sanguigni ed è un mediatore della sensazione dolorifica. Si è cercato di evitare questa vasodilatazione attraverso molecole che portassero a vasocostrizione e contemporaneamente controllare l'infiammazione trigemino vascolare, stimolata da questi peptidi modulatori del dolore, andando a inibirne il rilascio. Questo negli ultimi anni si è fatto attraverso due principali classi di farmaci, che hanno superato i farmaci ampiamente usati negli attacchi di emicrania quale ad esempio l'ergotamina.

I farmaci che vengono utilizzati contro l'emicrania, oltre ai nuovissimi, che sono anticorpi monoclonali utilizzati in pazienti gravi, nel quotidiano il controllo avviene attraverso due classi di farmaci: triptani, che agiscono come agonisti, i quali stimolati determinano vasocostrizione della circolazione carotide, e gli antagonisti del peptide CGRP, che sono stati progettati più recentemente.

Triptani

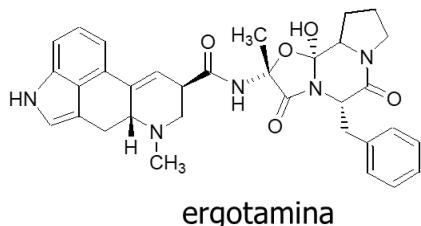
Il nome triptani fa capire che hanno stretta somiglianza alla triptamina, ossia l'ammina strettamente correlata alla serotonina senza il gruppo OH. La prima evidenza che si potesse separare l'attività serotoninergica è venuta dalla 5CT, cioè la 5 carbossammin-triptamina, dove al posto del gruppo OH è inserito un gruppo ammidico che ha la possibilità di dare sempre legame a H ma la rende più selettiva nei confronti dei sottotipi 1A e 1B.

A questo punto si doveva separare ulteriormente l'attività 5HT-1A dalla 1B per renderli più selettivi. Sono stati eseguiti numerosi studi sulle SAR e dalle modifiche in posizione 5 e 3 ovvero nella catena laterale sull'atomo di N, la prima molecola entrata in terapia per la sua attività è stata il sumatriptan, che in posizione 5 contiene un gruppo ancora più ingombrante di un gruppo carbossaminico che è un gruppo metilsolfon-amminico e inoltre si nota che il gruppo amminico terminale non è più primario ma lo si rende terzario inserendo due gruppi metilici. Sia il gruppo in posizione 5 che la catena laterale in 3 possono essere entrambi ulteriormente modificati per avere composti con emivita migliore mantenendo però le caratteristiche della triptamina dove



l'anello dovrà essere mantenuto. Il sumatriptan e suoi congiunti che lo hanno seguito hanno superato il farmaco che da sempre era utilizzato nei controlli degli stati di emicrania: l'ergotamina, che è un derivato dell'acido lisergico, caratterizzato dall'anello indolico. Si ritrova anche in questo caso la catena laterale della triptamina. Sono stati fatti molti studi di interazione sul sito ortosterico, dove appare strano che una molecola così ingombrante possa andare ad agire; in effetti nel sito ortosterico, la molecola di serotonina in relazione alla molecola della ergotamina, che ha gli anelli dell'acido lisergico dove vediamo la stessa struttura della catena

laterale della serotonina ma anche tutta la parte relativa ai legami di gruppi amminici con cui è derivatizzata l'acido lisergico che interagisce con la cosiddetta extended binding site ma che il recettore può accogliere nelle vicinanze del sito ortosterico nonostante le dimensioni di questo grande gruppo a cui è legato. La porzione



Il sumatriptan ha soppiantato la ergotamina per la cura dell'emicrania; gli alcaloidi dell'ergot sono stati usati sin dalla metà del 1800, mentre l'ergotamina in forma pura è stata introdotta solo verso il 1930.

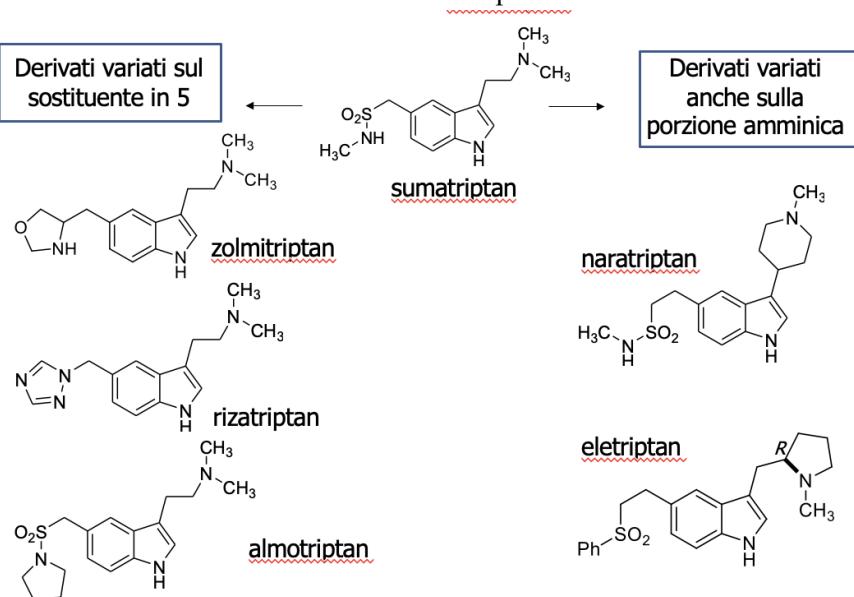
dell'acido lisergico, quindi, interagirebbe con il sito ortosterico come la serotonina ma è raccolta anche in una binding zone più grande dove può accomodarsi questo ciclo enorme della ergotamina. La stessa cosa riguarda un altro agonista del sistema serotoninergico che agisce sui recettori 5HT-2A, che è la dietilammide dell'acido lisergico, l'LSD, che non viene utilizzata come farmaco perché è un noto allucinogeno.

Ergotamina

Non è un farmaco selettivo (vista nel sistema adrenergico, dopaminergico e ora nel serotoninergico). Parlando degli alcaloidi dell'ergotamina, si era parlato delle SAR in relazione al sistema adrenergico mettendo in evidenza il fatto che eliminando il doppio legame in posizione 9-10 con una riduzione, ottengo la diidroergotamina, che ha maggiore attività adrenergica. Per cui l'ergotamina che agisce prevalentemente 5HT-1B ha un'azione vasocostrittrice, ed è il motivo per cui è utilizzata nell'emicrania. Riducendo il doppio legame ottengo una maggiore attività antagonista adrenergica e quindi azione maggiormente vasodilatatoria attraverso l'antagonismo sui recettori Alpha-1 periferici. Il farmaco utilizzato per il sistema serotoninergico deve avere il doppio legame. È stato per molto tempo il farmaco di scelta per l'emicrania.

Sumatriptan

Il problema del sumatriptan è l'emivita, cioè richiede somministrazioni frequenti. Per migliorare la farmacocinetica di questi triptani, le modifiche sono state eseguite sia sui sostituenti in posizione 5 sia sulla porzione amminica in catena laterale. I farmaci in terapia sono:



È stata modificata la funzione solfonammidica andando a inserire dei gruppi abbastanza ingombranti ma sempre in grado di mantenere la possibilità di dare dei legami a H.

Nello **zolmitriptan** è stato inserito un anello ossazolidinico; nel **rizatriptan** un anello triazolico e nell'**almotriptan** riportiamo la sulfonammide ma l'azoto è interito in un ciclo pirrolidinico.

È stata fatta anche una modifica della catena laterale, mantenendo il gruppo solfonico. Questo nel **naratriptan** e nell'**eletriptan** è stata inserita la catena laterale in un ciclo metil piperidinico e metil pirrolidinico. Nell'eletriptan inserisco un centro chirale, dove l'enantiomero R sarà l'eutomero più utilizzato, soprattutto perché è più stabile metabolicamente.

Quindi, il sumatriptan è stato modificato sia nella porzione sulfonamminica con dei cicli in grado di mantenere il legame H con il recettore e mantenendo in catena laterale la dimetiletil ammina, mentre invece nelle altre classi il gruppo solfonico è stato mantenuto ma la catena laterale è stata ciclizzata mantenendo l'N terziario.

Azione



Ciò che si vuole avere è una vasocostrizione della circolazione dei vasi cranici e questa è modulata principalmente dal sottotipo recettoriale 5HT-1B. Si vuole ottenere una inibizione neuronale periferica mediata dai recettori 5HT-1D e inoltre, forse più importante di tutti secondo i nuovi studi condotti sulla patologia, si vuole avere una inibizione della trasmissione neuronale, mediata dal sistema trigemino vascolare. In questo caso il controllo è sui peptidi vasoattivi, sul rilascio di questi, attraverso l'attivazione, stimolazione dei recettori presinaptici che appartengono sia al sottotipo 1B, D ed F che inibiscono il rilascio dei modulatori del dolore.

Verranno trattati ora farmaci riguardanti ansia e depressione che possono essere considerate patologie separate e/o connesse.

Nel contesto degli stati d'ansia abbiamo già visto una classe di farmaci quali le benzodiazepine che oltre ad essere ansiolitici hanno anche tanti altri effetti come sedativi ipnotici e anticonvulsivanti.

Gli ansiolitici che affronteremo oggi sono quelli che agiscono sul sistema serotoninergico e sono farmaci che sono in grado di controllare l'ansia con minori effetti collaterali perché non provocano un'azione sedativa, ipnotica e miorilassante.

Se lo stato d'ansia non è associato a depressione abbiamo gli agonisti parziali del recettore 5HT1 che prendono il nome di Azapironi.

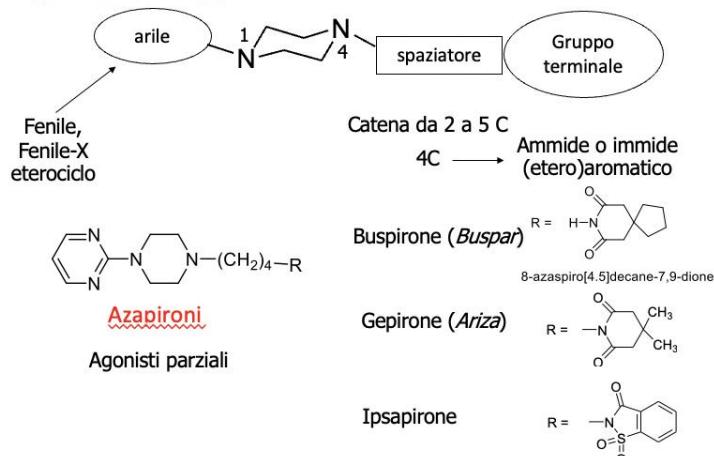
Se lo stato d'ansia è correlato ad uno stato depressivo i farmaci serotoninergici maggiormente usati sono gli inibitori del re-uptake della serotonina detti anche SSRI.

Gli agonisti del recettore 5-HT1a condividono una struttura analoga tra di loro ma che si differenzia dalla struttura della triptamina.

Sono definiti Azapironi perché caratterizzati da un anello pirimidinico legato ad uno piperazinico e come elemento comune c'è una catena spaziatrice alla quale è legato normalmente un gruppo che contiene un immide, in generale di natura ciclica;

queste molecole (il cui prototipo è il Buspirone) oltre che avere azione di agonisti parziali del recettore 5TH1a sono anche antagonisti di due presinaptici e hanno anche un'azione agonista parziale nei confronti del recettore alpha1.

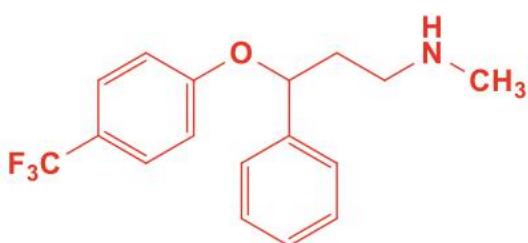
Agonisti 5-HT_{1A}



Buspirone agisce anche come antagonista D₂ presinaptico e agonista parziale α₁

In tutti questi Azapironi la porzione azapironica è costituita da una pirimidina legata alla piperazina e anche la catena è uguale per tutti (può andare da 2 a 5 metileni) normalmente si usa una catena butilica, a 4 metileni.
 Buspirone → Bus=sta per butilica. Spirone=perché la porzione immidica contiene una giunzione spiranica cioè i due anelli, l'immidico e il pentatomico sono congiunti in un unico punto.
 -One perché in posizione 7 e 9 abbiamo due gruppi carbonilici che originano l'immide ciclica.
 Il Gepirone → ha la stessa caratteristica della parte azapironica ma manca il secondo anello e ci sono solo i due metili.
 Ipsapirone → c'è solo una solfonimmide.
 Nei tre varia quindi solo il gruppo terminale.

Per quanto riguarda gli stati depressivi parliamo di inibitori selettivi della ricaptazione delle ammine biogene; le principali coinvolte nelle patologie depressive sono la noradrenalina e la serotonina. Questi antidepressivi triciclici non sono molecole selettive perché agiscono andando a inibire sia il re-uptake della noradrenalina che della serotonina; hanno una struttura ciclica con la giunzione degli anelli 7 6 6 (motivo per cui si distinguono dagli antipsicotici appunto per il ripiegamento di questa struttura triciclica).



Fluoxetina

Per quanto riguarda questi inibitori selettivi del re-uptake della serotonina il prototipo è la Fluoxetina; questi mancano di questa struttura triciclica e sono invece caratterizzati da due anelli aromatici e da una catena che termina con un gruppo amminico fondamentale per l'azione sul trasportatore della serotonina (come negli antidepressivi triciclici) che non necessariamente deve essere terziario ma può anche essere secondario;

nella Fluoxetina è più attivo l'ammina 2° rispetto alla 3°.

La Fluoxetina contiene un centro chirale ma viene usata come racemo; è entrata in terapia nel 1987

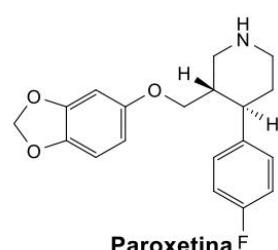
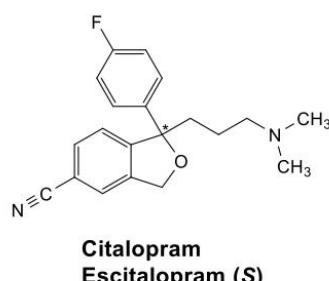
Quali sono gli elementi strutturali comuni a questa classe di antidepressivi che agiscono selettivamente sul re-uptake della serotonina?

Si possono trovare elementi comuni rappresentati da:

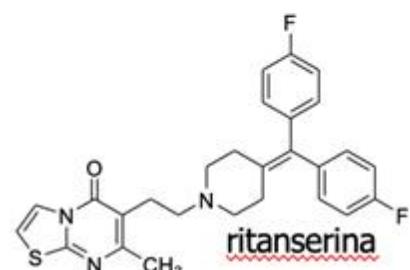
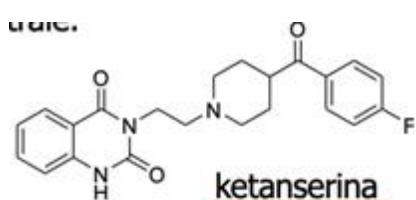
un centro basico (un'ammina secondaria o terziaria) che può essere in catena laterale o all'interno di una struttura ciclica.

un anello aromatico povero di elettroni (gruppi elettron-atrattori come CN nel Citalopram o i due gruppi Cl nella Sertralina).

un secondo anello aromatico come in Fluoxetina. nella Sertralina l'altra funzione ciclica è data da un tetraidronaftalene. Nella Paroxetina è poi presente un benzodiossolo e nel Citalopram il secondo anello aromatico è un benzodiidofurano; qui il centro chirale è importante; esiste anche in forma racemica ma l'S è metabolicamente più attivo.



Nonostante la notevole diversità strutturale condividono lo stesso farmacoforo. Ciò spiega la loro interazione con lo stesso bersaglio biologico, il trasportatore di 5-HT, con conseguente attività biologica simile.

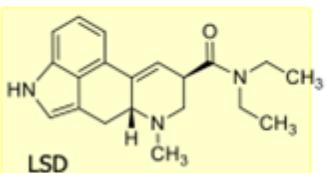
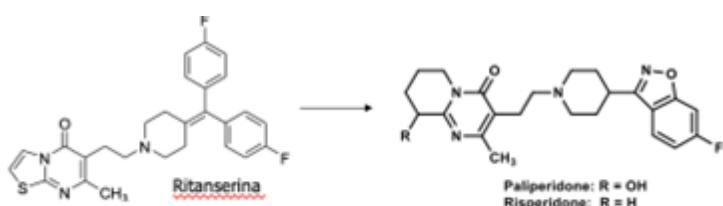


Per quanto riguarda ora la classe degli antagonisti serotoninergici che agiscono sul recettore 5-HT_{2a} sono già stati analizzati come antipsicotici intesi come antagonisti del recettore 5HT_{2a} e anche per i loro effetti periferici cioè antiipertensivi;

La molecola maggiormente studiata è la Ketanserina che è caratterizzata da un anello chinazolinonico il quale è stato poi modificato per ottenere delle molecole più selettive perché di per sé questa ha un effetto antipertensivo che non è mediato solamente dall'antagonismo dei recettori 5HT2a ma ha anche azione antagonista nei confronti del recettore alpha1 quindi la sua azione antiipertensiva è una combinazione di questi due effetti.

Non è usato come farmaco antiipertensivo però è stato il punto di partenza per trovare strutture più selettive come la Ritanserina la quale è stata ottenuta modificando il gruppo carbonilico con un anello parafluorofenilico per ottenere una maggiore selettività.

Ketanserina e Ritanserina rappresentano quindi due bioisosteri che modificano il profilo di queste molecole nei confronti dell'alpha cioè diminuiscono notevolmente l'affinità verso l'alpha1 adrenergico mantenendo invece l'azione antagonista 5HT2a.



Ricordare che l'allucinogeno LSD è un agonista 5-HT_{2A}

Queste molecole sono state il punto di partenza per arrivare alla struttura degli antipsicotici atipici (precedentemente visti negli antipsicotici nel sistema dopaminergico) che hanno anche azione antagonista 5HT2a.

Queste molecole sono state progettate inserendo la porzione della Ritanserina e della Ketanserina cioè l'anello piperazinonico legato con una catena etilenica ad una piperidina e il F per il problema della metabolizzazione che porterebbe ad una riduzione dell'attività per ossidrilazione aromatica al fine di ottenere Risperidone e Paliperidone.

Queste riescono meglio ad attraversare la BEE e sono stati definiti migliori antipsicotici atipici.

Nel contesto dei 5HT2a inoltre va menzionato che l'LSD, cioè la dietlammide dell'acido lisergico, è invece potente agonista del recettore 5HT2a e che la stimolazione di quel recettore porta ad un effetto allucinogeno.

Considerando sempre il recettore 5HT2 del sottotipo "c" c'è quello maggiormente coinvolto a livello ipotalamico nel controllo del senso di fame/appetito e del metabolismo; la molecola della Lorcaserina può essere considerata l'analogo rigido della catena laterale della triptamina (è come se inserissimo la catena etilamminica in questo ciclo detto benzoazepina). L'atomo di cloro aumenta la potenza della molecola motivo per cui è molto selettiva nei confronti del recettore 5HT2c; è infatti abbastanza scevra di effetti collaterali verso altri tipi di recettori. È usato solo nell'obesità degli adulti perché appunto la stimolazione di questo recettore va a diminuire il senso di fame.

Considerando ora il recettore 5HT3 questo è l'unico recettore canale, recettore pentamerico costituito da cinque subunità; controlla principalmente la nausea e il vomito con il meccanismo centrale aumentando il rilascio di dopamina(antiemetici); agisce inoltre sul rilascio di un peptide ansiogeno che è la CCK infatti molte di queste strutture sono state studiate per la loro azione sul comportamento degli stati d'ansia; il vantaggio che avrebbero queste molecole usate come

ansiolitici e neurolettici rispetto agli antidopaminerigici e che non porterebbero ad avere gli effetti extra piramidali (perché il recettore non è presente nelle fibre microstriatali).

Il prototipo è rappresentato dal Tropisetron a cui poi hanno fatto seguito il Ganisetron e l'Ondalsetron.

L'origine della progettazione di queste molecole (in particolare del prototipo perché le altre sono state ricavate mediante le SAR) deriva da una ibridazione molecolare, in particolare dalla cocaina che ha un azabiciclo e due gruppi esterei.

La cocaina è stata studiata per la sua azione sul trasportatore della dopamina e per la debole azione sui recettori del 5HT3;

Dall'altra parte si è considerata la Metoclopramide che appartiene alla classe delle benzoammidi;

la Metoclopramide oltre ad avere una azione antagonista, ha anche un'azione antagonista nei confronti del recettore 5HT3; Si è presa quindi la porzione aromatica (benzammidica) e si è ibridata con l'anello azabiciclo della cocaina.

Questo è stato il primo antagonista 5HT3 molto potente che viene rappresentato solo con una sigla perché non è mai entrato in terapia a causa del gruppo ammidico che aveva effetto anche sui recettori 5HT4. Per separare quindi l'attività 5HT3 da 5HT4 si è provato a ricomporre al posto dell'ammide un gruppo estero e si è sostituito all'anello aromatico l'anello indolico della serotonina.

Da ciò è appunto nato il Tropisetron che è il primo antagonista selettivo nei confronti del recettore 5HT3.

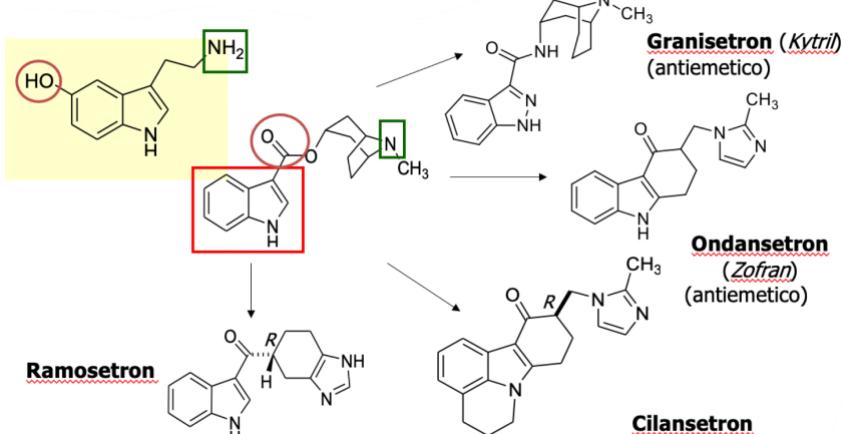
Dal **tropisetron** sono dedotte le seguenti SAR, che hanno portato a 2 molecole molto utilizzate: **Ganisetron** e **Ondansetron**.

Esse devono avere un **anello Aromatico (Indolo o Bioisosteri)** un **Carbonile** tra l'anello e la catena laterale che deve avere un **centro Basico**.

Nel **Granisetron** è stata fatta la sostituzione **Bioisosterica** dell'indolo con un **benzoisoimidazolo**, viene comunque mantenuto il gruppo **Ammidico** che però **non fa legami a H intramolecolari**.

Nell'**Ondansetron** viene ulteriormente modificata la struttura: si elimina il gruppo ammidico e il gruppo estero → viene lasciato solo un CO che fa parte di un **Esenone**; abbiamo un ulteriore irrigidimento della struttura (la catena laterale è inserita in un ciclo) e la porzione basica appartiene ad un anello **metil-imidazolico**.

N.B.: I punti in cui si



Tropisetron, Granisetron e Ondansetron;

è intervenuti per queste modifiche sono quindi stati:

- **Bioisosterismo imidazolo;**
- **Mantenimento di un CO** (fondamentale per dare leg a H con il recettore);

-Funzione Basica (N sempre III);
A queste molecole sono seguite altre che sono già in fase **Clinica** (**Cilansetron**) → si è visto avere una azione positiva nella **Sindrome dell'intestino irritabile**.

[L'importante è ricordare i

AGONISTI 5HT4

È uno dei recettori più recenti (classificato alla fine degli anni '80), si trova prevalentemente a livello del SNC ma i Farmaci **Agonisti 5HT4** agiscono a livello **Periferico**.

Infatti, i Farmaci hanno una azione **Pro-Cinetica** e quindi sono i Farmaci di 1^a scelta nelle patologie da **Reflusso Gastro-Esophageo** in associazione agli **inibitori della pompa protonica**.

(**Procinetici**: aumentano la **Peristalsi** sia a livello esofageo che gastrico provocando lo svuotamento unidirezionale ed impedendo così il reflusso).

⇒ Questo **Recettore 5HT4** è quindi molto presente a livello centrale ma anche periferico nel sistema GI.

I farmaci che agiscono su esso (che devono avere azione **Agonista** per determinare un aumento della **Peristalsi**) derivano da studi di SAR delle molecole come la **Metoclopramide** (questo perché quando si sono studiati gli **Antagonisti 5HT3**, si è vista quest'altra azione di Agonismo sui **5HT4**).

Si è quindi cercato di separare l'affinità di queste molecole per avere **Selettività 5HT4**.

→ Si era appunto visto che la **Metoclopramide** oltre ad avere l'azione **Antagonista 5HT3** aveva anche azione **5HT4** e quindi aveva anche un blando effetto **pro-cinetico**.

Come avevamo detto, parlando degli **Antagonisti 5HT3**, ciò che era importante per dare selettività 5HT3 era la non presenza della ammide e la presenza dell'Estere. Se fosse stata presente l'**Ammide** avremmo avuto anche attività

Antagonista 5HT4.

Per questo si è quindi pensato per prima cosa di ripristinare la funzione ammidica. Dopodiché lo sforzo successivo è stato quello di capire come passare da una attività **Antagonista 5HT4** ad una attività **Agonista 5HT4** —> sono stati fatti vari derivati del **Tropisetron**: si è giunti ad una molecola (**BIMU8**) dove si è inoltre visto che (nello stesso Tropisetron) andando a ripristinare il gruppo **Ester** dall'**Ammidico** si poteva ottenere **Agonismo 5HT4**.

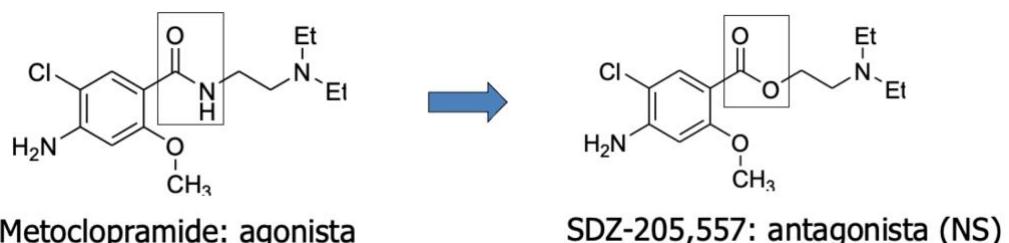
Il **Tropisetron** è un Debole **Antagonista 5HT4** mentre se ad esso modifichiamo la funzione esterea in ammidica e mettiamo un benzoisoimidazolo al posto dell'indolo otteniamo un **Agonismo 5HT4**?

Questo è stato razionalizzato con la possibilità del **gruppo ammidico** di formare con l'adiacente N un **Leg a H intramolecolare**.

Ricorda: Questo stesso concetto di **leg a H intramolecolare**, l'avevamo

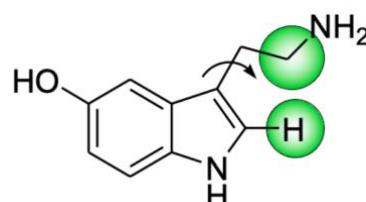
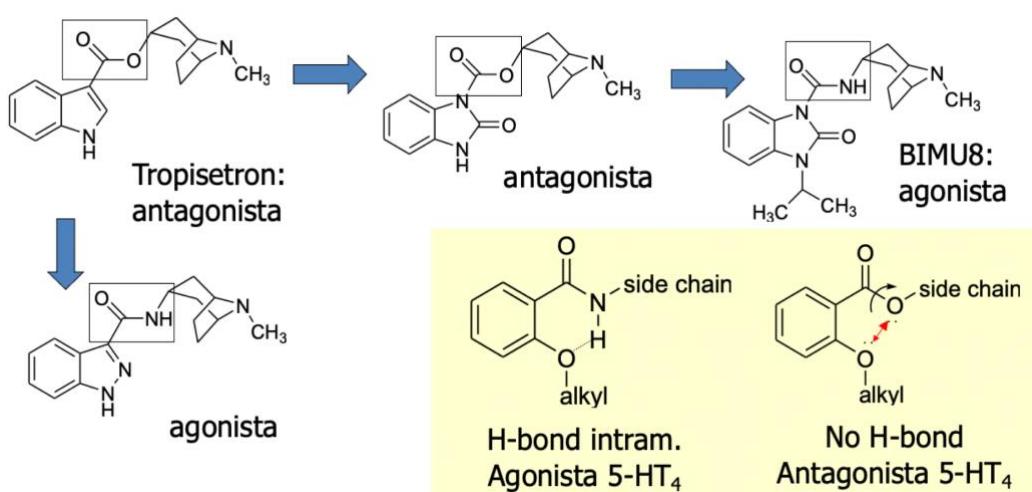
visto nel **Dopaminergico** con **Sul托pride** e **Sulpiride (Benzammidi)**: in quel caso è stato fatto uno studio per verificare se quel leg a H fosse importante ai fini dell'attività. Lo studio è stato possibile andando a bloccare la coplanarità tra la catena laterale e l'anello aromatico: si è inserito un **Metossile** sulla **Benzamide**. In quel caso si vide che non era indispensabile la formazione del **Leg a H intramolecolare** ai fini dell'attività **Dopaminergica** ma allo stesso tempo si disse che invece il legame a H è indispensabile per l'attività delle Benzammidi che agiscono sul **Serotoninergico 5HT4**.

Infatti, nel sistema **Serotoninergico 5HT4** la formazione di questo **legame a H intramolecolare** è estremamente importante.



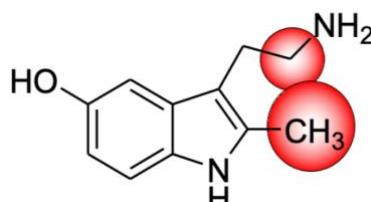
Metoclopramide: agonista

SDZ-205,557: antagonista (NS)



Cosa succede mettendo un CH₃ in 2 della HT?

Si è visto che l'inserimento di questo metile, crea ingombro sterico e obbliga la catena ammidica a porsi più distante rispetto a quella che si ha nella **5HT** non sostituita in 2. Questa **2-MetilSerotonina** mantiene sempre l'**Agonismo 5HT3** ma non ha attività sul 5HT4: questo perché l'N viene spostato in una zona non consona all'interazione con il **5HT4** —> ci sono requisiti ben specifici per l'interazione con il 5HT4 di **distanza** tra il **centro di legame a H** (OH in 5 della HT) e il **gruppo basico** legato in catena laterale.

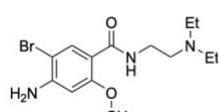


Questa distanza è molto importante soprattutto per questi derivati **Benzammidici** e quindi per il mantenimento dell'anello aromatico ad una distanza ottimale dall'N basico.

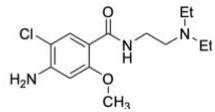
Questo mantenimento della distanza è favorito dalla possibilità di formare un **leg a H intramolecolare** che fa sì che ci sia una conformazione ben definita.

Anche l'N in catena laterale, nei derivati che adesso vedremo (usati principalmente come **procinetici**), è normalmente inserito in un ciclo proprio per avere una orientazione dell'N in una definita posizione del recettore.

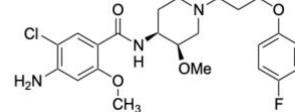
I principali derivati utilizzati sono la **Cisapride** (viene mantenuto un gruppo **Ammidico** e adiacente un **Metossile** per la formazione del **leg a H intramolecolare** e l'N basico è inserito in un **ciclo piperidinico** [il resto della struttura è = alla **Metoclopramide**]).



Bromopride (*Valopride*)
Agonista 5-HT₄. Usato come procinetico.
Indicato nel GERD



Metoclopramide.
Stessi usi, maggiori effetti collaterali

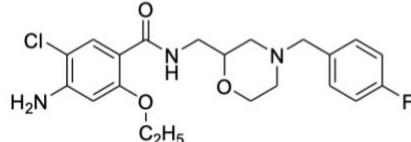


Cisapride (*Prepulsid*) Agonista 5-HT₄. E' usato come procinetico.

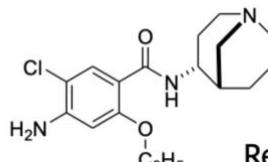
Nota: non è necessaria **lipofilia** perché devono agire a livello periferico.

N.b.: Si chiama **Cisapride** perché abbiamo 2 centri chirali ed è importante che l'NH ammidico e il **Metossile** stiano tra loro in **Cis** per formare il **Leg a H intramolecolare**. Come terminale ho un anello aromatico sostituito in para con un **F** e questo sempre per aumentare la **Emivita** della molecola (diiminuisce la possibilità di Ossidrilazione e quindi di Glucurono-Coniugazione).

Un altro **Agonista** è la **Mosapride** dove abbiamo un anello **morfolinico** che mantiene l'N basico.



Mosapride Agonista 5-HT₄. Indicato nel GERD



Renzapride (HCl)
Agonista 5-HT₄ e antagonista 5-HT₃
Indicato nel GERD

SINTESI FLUOXETINA

1: Mannich

La sintesi parte dall'**Acetofenone** sul quale viene fatta una **Amminometilazione di Mannich** con la quale ho l'allungamento della catena e l'inserimento del gruppo dimetil amminico.

Si utilizza la **Dimetilammmina** in presenza di **Formaldeide** in **HCl**: si forma così il reattivo di **Mannich** molto elettrofilo che sarebbe l'**imminio** che poi viene attaccato dal **CH₃** leggermente nucleofilo dell'Acetofenone.

2: Riduzione

Si effettua la riduzione del **CO** con **NaBH₄** in **EtOH**. Si ottiene l'**Alcol**.

3: Eterificazione SNuAc

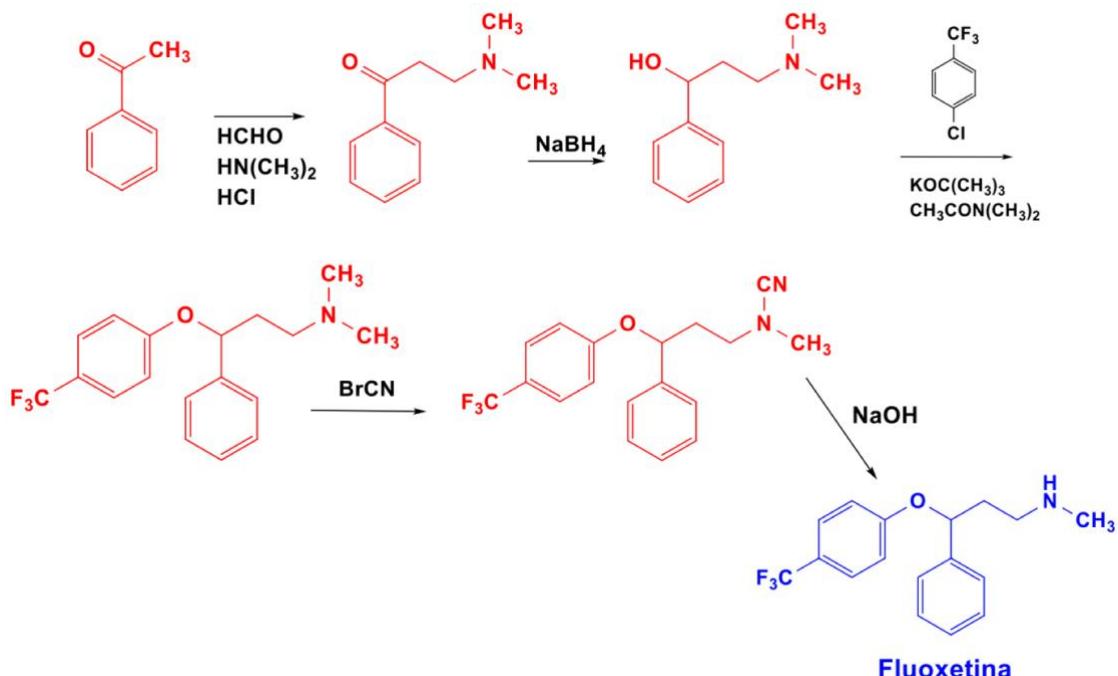
Si va per prima cosa a rendere più Nucleofilo l'**O** dell'**OH** con una base (**Potassio Terbutossido**) per poi farlo reagisce con il **p-TrifluorometilCloroBenzene** che reagirà con l'**O** facendo uscire il buon gruppo uscente **Cl⁻**. Il tutto lo si fa in **DimetilAcetammide**.

=> Siccome in questi derivati è migliore l'**N II** anziché **III** dobbiamo togliere un **Metile** che comunque ci è servito per non avere reazioni collaterali:

4, 5: Demetilazione

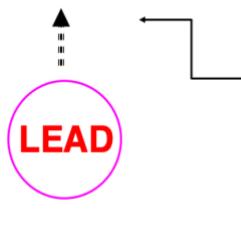
Per fare una **Demetilazione** selettiva si utilizza il **Bromuro di Cianogeno** che scambia il gruppo **Nitrile** sull'**N** e si forma **Bromuro di Metile**. A questo punto si effettua l'idrolisi **Basica a Caldo**: non si può fare in **Acido** perché altrimenti mi salterebbe l'**Etere** appena creato.

Con l'**Idrolisi** si trasforma il **CN** in **COO⁻** che poi a caldo decarbossila portando l'**Ammina II**.



DRUG DESIGN

FARMACO



Modificazione
molecolare
↑
Strategia

Durante tutta la trattazione abbiamo rivolto molta attenzione, in tutte le varie classi di molecole, sulla **Ottimizzazione del Lead** iniziale e questa ottimizzazione l'abbiamo fatta per ogni classe attraverso delle **Modificazioni Molecolari** di varia natura.

Quali sono queste Modificazioni Molecolari?

Esse sono generalmente 4 tipologie:
1 -> Isosteria:

noi più che mai abbiamo parlato del concetto di **Bioisosteria** e cioè spesso abbiamo inserito dei gruppi non **isosteri classici** che comunque mantenevano l'attività.

2 -> Abbiamo anche applicato il concetto di **Semplificazione Molecolare**: questo per molecole molto complesse che quindi sarebbero difficili e costose da sintetizzare. Per questo vengono semplificate allo scopo di identificare il Farmacoforo e avere dei processi di produzione di sintesi più semplici.

Più la molecola è complessa, oltre al problema della sintesi, più sarà anche difficile da purificare e avrà anche una > difficoltà per gli aspetti **Farmacodinamici** e **Farmacocinetici**.

Abbiamo però visto che non sempre la semplificazione molecolare porta a risultati desiderati.

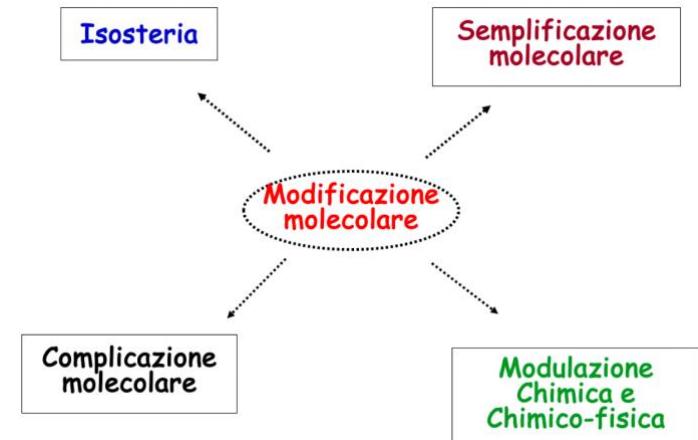
3 -> Abbiamo anche operato al contrario per molecole molto flessibili: con **Complicazioni molecolari**. Queste sono state vantaggiose sia per conoscere la **Conformazione Attiva** di una molecola flessibile che per separare l'attività nei confronti dei vari sottotipi recettoriali.

n.b.: Se pur è vero che la **Semplificazione** ci risolve il problema della complessità della molecola, ci rende però la molecola soggetta a diverse **conformazioni** così che possa perdere **Selettività** perché in grado di accomodarsi a diversi Siti Ortosterici. Al contrario con una **Complicazione** si può guadagnare in **Selettività** ma i gruppi che inserisco possono però ostacolarmi l'interazione e la Farmacocinetica.

—> Deve quindi esserci sempre un buon bilanciamento tra tutto.

4 -> Modulazione Chimica e Chimico-Fisica: ci riferiamo alle proprietà **Idrofilia/Lipofilia**. Come si può spostare una attività da Centrale a solamente Periferica? Avevamo per esempio visto l'**Atropina** in cui abbiamo quaternarizzato l'**N** per renderlo costantemente protonato per rendere la molecola molto **idrofila** e quindi far sì che non possa attraversare la **BEE** e quindi avere effetti centrali.

Ovviamente il contrario non si può fare a meno che non si facciano somministrazioni **Intratecali**.



Strategie che hanno portato alle modificazioni molecolari del lead



Le modificazioni molecolari del lead sono state applicate per ottenere le modificazioni spiegate precedentemente:

- **Analoghi funzionalizzati**

Gli analoghi funzionalizzati, ad esempio, sono tutti i profarmaci modificati per rendere una molecola metabolicamente più stabile. Questo può essere ottenuto funzionalizzando funzioni idrofile come i gruppi OH. Si può agire o mascherandoli in quanto danno un'instabilità metabolica e questo è stato affrontato nei derivati catecolici dove sono stati funzionalizzati tutti i gruppi OH per evitare il metabolismo a carico delle COMT, oppure rendendo una molecola più lipofila del normale per ottenere ad esempio preparazioni deposito.

- **Analoghi rigidi**

Visti soprattutto nel sistema dopaminergico. La dopamina, un neurotrasmettore endogeno, ha una notevole flessibilità della catena laterale. Gli analoghi rigidi, ad esempio le amminotetraline da cui sono derivati i vari farmaci, al contrario, mostrano una maggiore stabilità della molecola e ci hanno permesso di comprendere la conformazione attiva della dopamina nei confronti dei recettori dopaminergici.

- **Ibridazione molecolare**

L'ibridazione molecolare implica l'unione di due gruppi farmacoforici di due molecole che agiscono per ottenere lo stesso effetto ma interagendo con bersagli diversi. Questo viene fatto per ottenere un effetto sinergico. Tuttavia, ci sono dei problemi in quanto la molecola che si ottiene dall'ibridazione molecolare deve avere un'attività cosiddetta bilanciata: cioè, le due funzioni farmacoforiche unite devono rispettivamente mantenere un'attività dello stesso ordine di grandezza sui due target su cui va ad interagire la molecola.

- **Approccio indirizzo-messaggio**

L'approccio indirizzo-messaggio deriva dalla semplice constatazione che molte molecole peptidiche sono l'assemblaggio degli stessi aminoacidi, però disposti in modo diverso tra loro. È il caso di molti ormoni peptidici, ad esempio perché la prolattina ha un'azione diversa dalla vasopressina? Perché

questa combinazione di amminoacidi nel peptide in modo diverso porta ad azioni completamente diverse? Questo discorso può essere esteso anche a molecole non peptidiche come gli oppioidi (è stato Portoghesi a studiare e ad estendere questa strategia anche ai recettori opioidi). In ogni caso, sia per le molecole peptidiche che non peptidiche, c'è sempre una porzione che serve per il riconoscimento con il recettore (indirizzo) e un'altra porzione che, una volta che questa si è correttamente direzionata verso un determinato target, costituisce il messaggio, cioè che in seguito all'interazione dà origine all'attività biologica. Tenendo presente questo concetto, l'approccio indirizzo-messaggio nei peptidi descrive come gli amminoacidi di un peptide sono organizzati per interagire con il recettore. Ci sono quindi parti di una proteina che servono, ad esempio, per attivare effettivamente il recettore, mentre altre parti servono per guidare la proteina stessa al riconoscimento con il suo bersaglio corretto.

- **Approccio passpartout**

L'approccio "passpartout" ricorda il modello "chiave-serratura", in cui le molecole interagiscono con vari sottotipi recettoriali, implicando una mancanza di specificità d'azione. Si è lavorato sul concetto di "passpartout" in relazione alle catene poliamminiche, come policationi che interagiscono con aspartato o glutammato di alcuni recettori. Per rendere l'attività di una poliammina più specifica verso un sottotipo recettoriale con l'approccio "passpartout", si può prendere come esempio la benextramina. Questa è una poliammina con un ponte disolfuro centrale SS che interagisce con vari sottotipi recettoriali, sia adrenergici che muscarinici. In presenza del residuo cistaminico, cioè del gruppo SS centrale, la molecola è un antagonista irreversibile del recettore adrenergico. La stessa molecola è un antagonista competitivo sul recettore muscarinico in quanto non c'è un gruppo cisteinico. Seppure queste molecole con varie teste cationiche possono intercettare diversi target biologici, modulando i sostituenti sull'atomo di azoto e i linker tra questi azotti basici, possiamo rendere una molecola più selettiva per un sistema recettoriale piuttosto che un altro.

- **Ligandi bivalenti**

I ligandi bivalenti sono utili soprattutto quando nel recettore si individuano due siti importanti per l'attività di quel recettore o di quell'enzima. Un ligando bivalente, normalmente costituito da due unità identiche raddoppiate, quindi normalmente separate da un linker, ha una maggiore attività su quel sistema biologico recettoriale perché intercetta contemporaneamente due siti, aumentandone l'affinità. I ligandi bivalenti sono stati molto importanti anche per studiare la dimerizzazione recettoriale. Molti recettori accoppiati a proteina G e lo stesso recettore β funzionano accoppiandosi ad un altro recettore, cioè come dimeri. I ligandi bivalenti hanno quindi la funzione di stabilizzare la struttura del dимерo che in alcuni sottotipi recettoriali rappresenta lo stato attivo del recettore.

- **Modulazione chirale**

Un altro aspetto è la modulazione chirale, che è estremamente importante per alcune classi di neurotrasmettitori, in particolare nel recettore adrenergico, ma anche nel recettore degli opioidi, dove la modulazione chirale è fondamentale per il mantenimento dell'attività. Un aspetto importante della chiralità è che in alcuni casi, un enantiomero ha un'attività, mentre l'altro ha un'attività diversa, come nel caso della chinina e della chinidina, uno è un antimalarico e l'altro è un antiaritmico.

Applicando le strategie appropriate, ci aspettiamo miglioramenti, ma anche possibili effetti inaspettati.

Ciò che bisogna controllare quando si fanno queste modifiche sono:

- **Proprietà farmacologiche**

Mantenimento, miglioramento delle proprietà farmacologiche che includono affinità, efficacia, specificità, tossicità ed effetti collaterali. È importante che le modificazioni strutturali non comportino

delle variazioni della tossicità della molecola e spesso si effettuano proprio per modularla, ma non sempre questo porta a dei risultati.

- **Caratteristiche chimico-fisiche**

Queste riguardano la solubilità, la struttura globale della molecola e la stabilità. Sono tutte di fondamentale importanza e richiedono un equilibrio appropriato. Ad esempio, l'idrofilia è molto importante nella farmacodinamica, mentre la lipofilia è cruciale nella farmacocinetica; quindi, deve esserci un buon bilanciamento delle due. Un esempio di come abbiamo affrontato la stabilità è nelle modifiche dell'anello catecolico di noradrenalina e dopamina.

- **Proprietà farmacocinetiche**

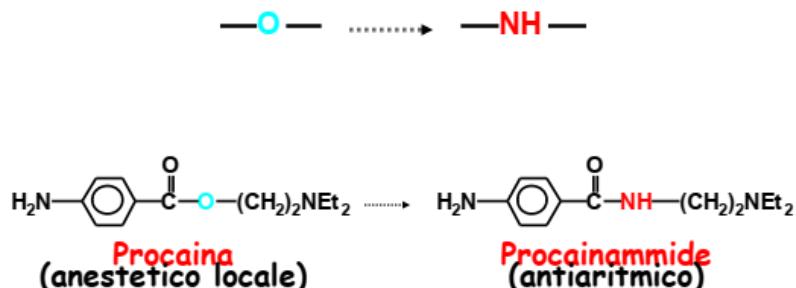
Queste includono la biodisponibilità, la stabilità metabolica, la durata d'azione, l'ADME e l'emivita della molecola. Normalmente, molte delle modificazioni molecolari fatte sono volte a migliorare tutte queste proprietà farmacocinetiche. Però è anche possibile che si migliorano le proprietà farmacodinamiche ma poi la molecola non ha più la possibilità di raggiungere il sito d'azione, in quanto si sono peggiorate contemporaneamente le proprietà farmacocinetiche.

Tutti questi aspetti portano alle relazioni struttura-attività (SAR) che sono la parte più importante relativamente a tutte le classi di farmaci studiate. Da queste si identifica l'unità minima a cui è associata l'attività biologica, ovvero il farmacoforo. Ad esempio, dalla non coerenza delle SAR tra le varie classi degli oppioidi, abbiamo identificato un farmacoforo minimo ed anche la presenza di due macroclassi che interagiscono con un sito P ed uno T, cioè due siti di interazione diversi nello stesso recettore.

Modificazioni molecolari del lead: Isosteria e bioisosteria

L'isosteria è una modifica strutturale che non altera la capacità del lead di riconoscere il target biologico. Nell'isosteria classica, si prevede l'inserimento di gruppi isosteri classici che devono avere la stessa forma e occupano lo stesso volume. In realtà non necessariamente due molecole isostere devono avere questo requisito. In particolare, abbiamo affrontato maggiormente delle sostituzioni di tipo bioisosterico. Quando si fa una sostituzione bioisosterica/ isosterica, si vuole ottenere o una riduzione della tossicità o un miglioramento della farmacocinetica, della stabilità o della farmacodinamica. Tuttavia, quando si inizia un processo di modifica di questo tipo il risultato che si ottiene spesso è imprevedibile. Per illustrare questo concetto, consideriamo alcuni esempi:

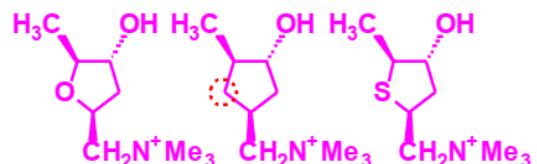
- Nel caso della procaina e della procainammide, abbiamo una sostituzione bioisosterica da estere in ammide. Questa sostituzione aumenta la stabilità della molecola in quanto un'ammide è più stabile dell'estere, ma cambia la sua attività da anestetica locale ad antiaritmica.



- Prendiamo in considerazione la muscarina, che è caratterizzata da un anello tetraidrofuranico. Si tratta di un esempio di isosteria classica con la sostituzione dell'ossigeno con un metilene o uno zolfo. Da questo isosterismo si è ottenuto un risultato inaspettato. Questo perché l'ossigeno della muscarina è importante in quanto mima le caratteristiche dell'ossigeno dell'estere dell'acetilcolina in quanto fa il legame a idrogeno con il recettore. In poche parole, la muscarina è l'analogo rigido dell'acetilcolina.

Se si sostituisce l'ossigeno con un CH₂, si dovrebbe ottenere una diminuzione dell'attività molto maggiore rispetto ad una sostituzione con lo zolfo, perché lo zolfo mantiene la possibilità di fare legame a idrogeno. Tuttavia, ciò non accade. Cioè, la modifica dell'ossigeno con un CH₂ diminuisce l'attività, ma questa viene ulteriormente diminuita se l'ossigeno viene sostituito con uno zolfo.

L'attività diminuisce perché bisogna controllare anche il volume dell'atomo da sostituire. Lo zolfo è molto più grosso dell'ossigeno, e questo comporta una distorsione dell'anello tetraidrofuranico iniziale della muscarina. Questa distorsione, provocata dalle maggiori dimensioni dello zolfo che si sentono di più rispetto a quelle di un CH₂, fa sì che i gruppi che interagiscono con il sito attivo del recettore, in particolare l'atomo di azoto carico positivamente in modo permanente (ammonio quaternario), non lo intercettano più favorevolmente. In questo caso non bisogna solo considerare la possibilità di fare dei legami a H ma bisogna guardare alla geometria globale della molecola. Quindi, pur facendo una sostituzione isosterica con un gruppo simile all'ossigeno, abbiamo una perdita completa di attività. Questo esempio evidenzia l'importanza di considerare anche la geometria molecolare nell'isosteria.



Attività muscarinica decrescente

Sviluppo del concetto di isosteria e bioisosteria

Nel 1919, Langmuir introdusse l'idea che le molecole con lo stesso numero di atomi, disposti nello stesso modo e con lo stesso numero di elettroni, possono essere considerate isostere (es. CO₂ e N₂O).

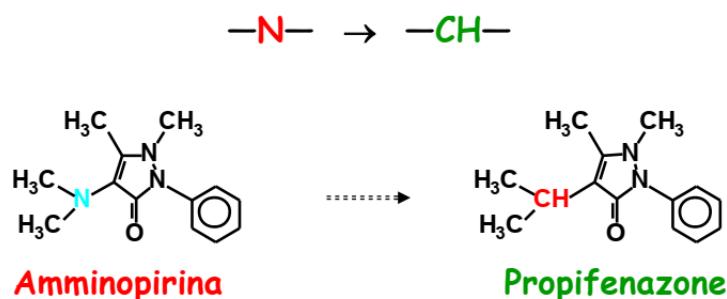
Nel 1925, Grimm ampliò il concetto di isosteria, rendendolo meno rigido e quindi più applicabile. Secondo Grimm, l'aggiunta di un atomo di idrogeno ad un atomo della riga precedente non altera l'isoelettronicità dell'atomo successivo.

<u>Grimm:</u> N. totale elettroni					
	6	7	8	9	10
C	N	O	F	Ne	
CH	NH	OH	FH		
CH ₂	NH ₂	OH ₂			
CH ₃	NH ₃				
					CH ₄

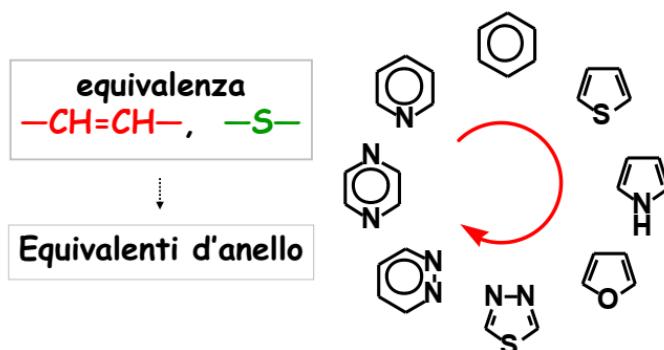
Nel 1925, Erlenmeyer ha proposto un'estensione della teoria di Grimm sull'isosteria. Secondo Erlenmeyer, ciò che è rilevante per l'isosteria non è il numero totale di elettroni, ma il numero e la disposizione degli elettroni nel guscio esterno.

N. elettroni di valenza	4	5	6	7	8
C		N	O	F	Ne
	CH	SiH	NH	OH	FH
			CH ₂	NH ₂	OH ₂
			SiH ₂	CH ₃	NH ₃
			PH	SiH ₃	CH ₄
				SH	SiH ₄
				PH ₂	PH ₃
					SH ₂

Un esempio classico di isosteria può essere osservato tra l'amminopirina e la propifenazone. L'ammina terziaria è molto tossica poiché può dare origine a nitrosamine, quindi l'amminopirina è un potenziale cancerogeno. Tuttavia, l'introduzione di un gruppo CH può eliminare questa potenziale tossicità pur mantenendo l'attività antiinfiammatoria del composto.



Hinsberg ha introdotto il concetto di isosterismo dell'anello aromatico (abbiamo visto tante sostituzioni isosteriche del benzene con il tiofene, pirrolo, furano, pirimidine, piridine, pirazine, tiadiazoli) che è stato applicato in molte classi di farmaci. Questa applicazione ha portato a volte a modifiche positive, mentre in altri casi ha comportato una diminuzione dell'attività.

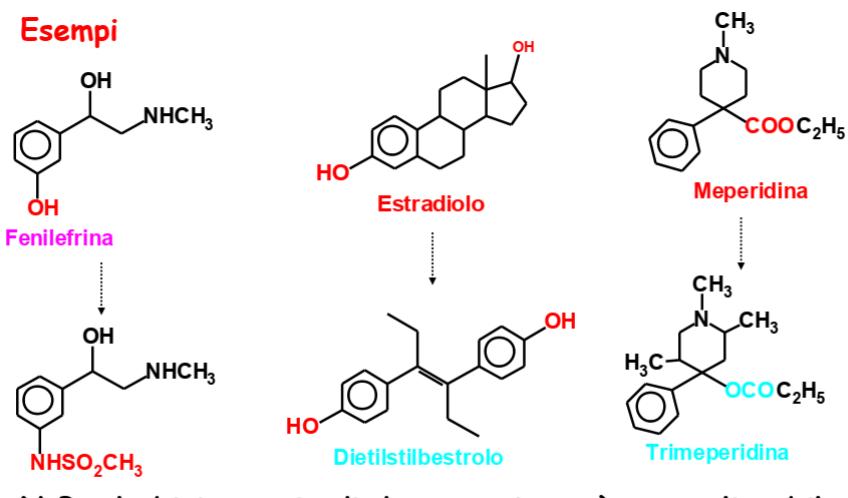


Nel 1951, con Friedman si è passati dall'isosteria alla bioisosteria. Friedman ha sottolineato che il numero di elettroni non è una caratteristica essenziale e ha definito i bioisosteri come quei gruppi che non sono isosteri classici e che, quando sostituiti al gruppo originale di una molecola, mantengono l'attività biologica oltre che farmacodinamica e farmacocinetica.

Gruppi isosteri suddivisi secondo la valenza

Monovalenti	Bivalenti	Trivalenti	Tetravalenti	Equiv. di anello
-CH ₃ , -NH ₂ , -OH, -F, -Cl	-CH ₂ -, -NH- -O-, -S- -Se-	-CH=, -N=	>C<, >Si<	-CH=CH-
-PH ₂ , -SH	-COCH ₂ - -CONH-	-P=, -As=	=C=, =N ⁺ =	-CH=, -N=
	-COO-		=P ⁺ =	
	-COS-			
-Br, -i-Pr				
				-O-, -S-
				-CH ₂ -
				-NH-
				-I, -t-But

Ecco alcuni esempi di bioisosteria:



N.B.: la bioisosteria di due gruppi non è generalizzabile per target biologici diversi

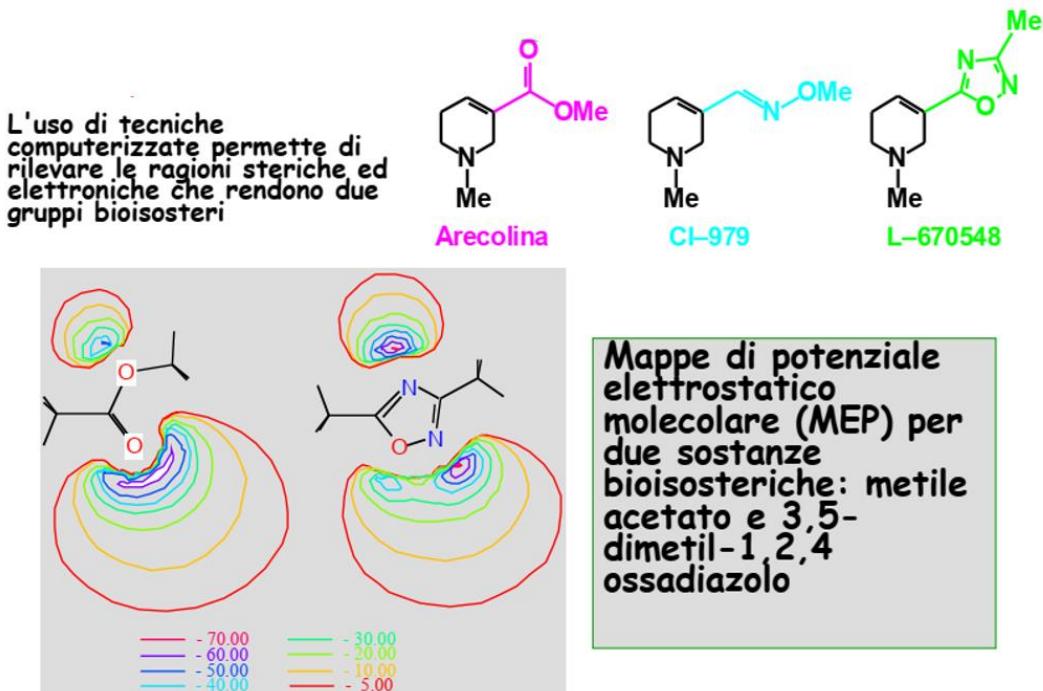
- La fenilefrina è un agonista α -adrenergico. Abbiamo più volte detto negli adrenergici che è possibile sostituire il gruppo OH, tenendo conto del gruppo OH in posizione meta' rispetto alla catena laterale, cioè fenolico, con un gruppo metilsolfonammidico. Questo gruppo, cioè NH della solfonammide, è comunque debolmente acido (come del resto l'OH fenolico) ed è in grado di dare legami a idrogeno con il recettore, ma ha anche una maggiore stabilità metabolica (aumenta l'emivita e diminuisce il metabolismo).
- Tra estradiolo e dietilstilbestrolo: questa è una isosteria particolare e non classica perché si è sostituito ai due cicli una catena con un doppio legame. Questa è contemporaneamente anche una semplificazione molecolare. L'importante è il mantenimento della distanza ottimale tra i due OH in posizione 3 e 17 dell'estradiolo. Quindi anche il dietilstilbestrolo agisce sul recettore degli estrogeni.
- Tra meperidina e trimeperidina. Nel caso degli oppioidi abbiamo visto i derivati della meperidina. Con l'inversione dell'estere in posizione 4 della piperidina si ottiene l'estere invertito e si mantiene l'attività oppioide. Anche questa non è una sostituzione isosterica classica ma bioisosterica.

L'uso di tecniche computerizzate permette di rilevare le ragioni steriche ed elettroniche che rendono due gruppi bioisosteri.

Abbiamo visto anche delle sostituzioni bioisosteriche molto strane:

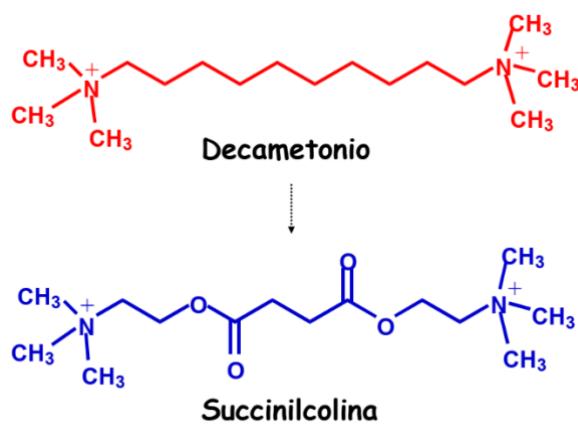
- Ad esempio, sostituendo nell'arecolina (agonista muscarinico) il gruppo estero con una ossima si mantiene comunque l'attività muscarinica. Oppure, mettendo un anello ossadiazolico, in quanto si mantiene il doppio legame ed anche l'ossigeno e quindi la possibilità di fare legami a idrogeno da parte dell'azoto. Avremo quindi in questa posizione del recettore una zona dove si dovrà avere una determinata densità elettronica mantenuta o con una ossima o con un anello aromatico.

Questi sono tutti esempi di bioisosterismi e non di isosterismi classici.



Altro esempio è tra decametonio e succinilcolina:

- Questo è un esempio di bioisosterismo: si tratta della modifica apportata alla molecola del decametonio che è un antagonista non competitivo del recettore nicotinico muscolare andando a sostituire due dei gruppi metilenici centrali con funzioni esteree. Il decametonio, essendo un antagonista non competitivo depolarizzante, ha una azione che non può essere revertita dagli inibitori dell'acetilcolinesterasi quindi porta a tossicità ed è una molecola pericolosa da usare. Al contrario, la succinilcolina è meno pericolosa e più sicura perché mantiene uguale la distanza tra i due atomi di azoto quaternari, ma può essere idrolizzata dalle esterasi ematiche.



Modificazioni molecolari del lead: Semplificazione molecolare

Nel trattamento di molecole complesse, è necessario eliminare le parti della struttura originale che non contribuiscono all'azione biologica. Questo processo è particolarmente utile con molecole difficili da sintetizzare. Normalmente si fanno semplificazioni molecolari di molecole naturali in quanto la natura ha la capacità di formare molti cicli (esempio i derivati dell'acido lisergico, gli oppiacei, apomorfina). Si cerca di modificare queste molecole per ottenere molecole più semplici ma ugualmente attive, più facilmente sintetizzabili e anche con una farmacocinetica più semplice in quanto dotate di un minor numero di gruppi che sono soggetti a metabolismo.

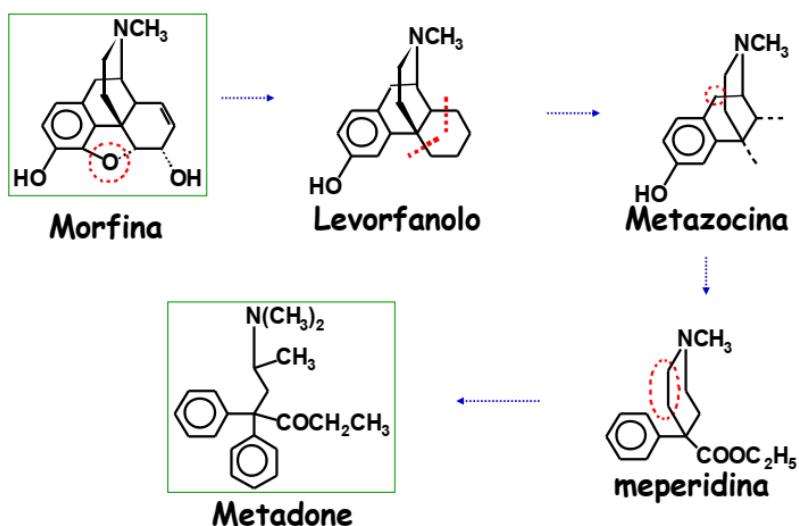
Le strategie comuni includono:

- L'apertura o l'eliminazione di cicli, come abbiamo visto in tutti i derivati della morfina.
- Un'altra strategia consiste nell'eliminazione o modifica di catene laterali
- La semplificazione della stereoisomeria, attraverso l'eliminazione di centri chirali inutili o non importanti. Ottenendo quindi delle modifiche della stereochemica ed un guadagno nella sintesi della molecola

Tutte queste operazioni sono utili per identificare l'unità minima in cui risiede l'attività biologica di una data molecola, ovvero il farmacoforo. Tuttavia, queste strategie presentano alcuni svantaggi in quanto esse possono portare:

- Alla perdita della specificità d'azione. La molecola più flessibile può andare ad interagire su diversi sottotipi recettoriali, utilizzando varie conformazioni.
- All'alterazione delle proprietà farmacocinetiche.

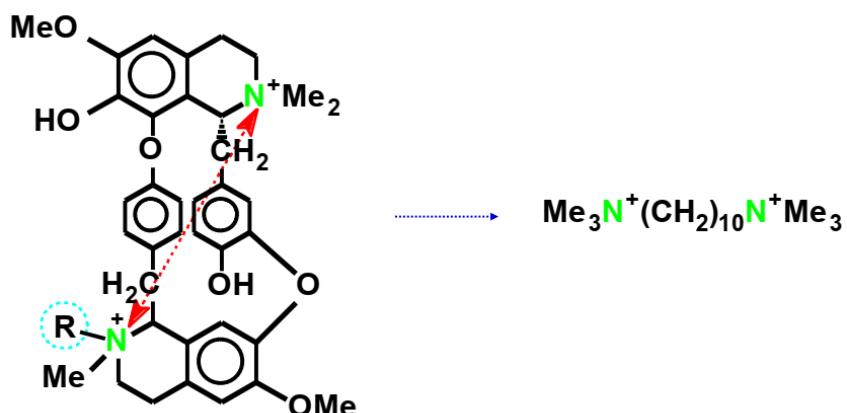
Rivediamo ancora una volta le semplificazioni molecolari applicate alla morfina fino ad arrivare al più semplice metadone e l'unità minima che è la fenilpropilammina. Abbiamo visto che le prime tre classi agiscono sul sito T (dove è indispensabile la presenza dell'anello fenolico che mima la tirosina), le altre due classi agiscono sul sito P (dove non è indispensabile il gruppo OH). In questo caso la semplificazione molecolare ci ha dato, oltre che il farmacoforo minimo, anche informazioni sulla presenza di due siti nel recettore.



Un altro esempio di molecola complessa in termini strutturali è la d-tubocurarina, dotata di una struttura tetraidropapaverinica e di vari centri chirali. È davvero necessaria l'intera struttura per avere azione antagonista nicotinica muscolare?

Per semplificarla, si è studiata la distanza tra le 2 teste cationiche ovvero tra una testa ammonica quaternaria permanente e l'altra che non lo è. Infatti, il secondo atomo di N in realtà non è legato a due metili, ma è terziario e si protona a pH fisiologico. Quindi in realtà l'R è un idrogeno. La molecola agisce sul recettore nicotinico

muscolare in virtù di questi 2 atomi di N o carichi permanentemente o che si protonano a pH fisiologico. Per identificare il farmacoforo minimo, si è andata a studiare la distanza tra i due centri di interazione N1 e N2 e si è visto che questa distanza è di circa 10 Å, equivalente a circa 10 gruppi metilenici, tradotta in termini di linker. È stato quindi costruito un linker di 10 gruppi metilenici che unisce le due teste ammoniche quaternarie alle estremità (sostituite con 3 metili). Si ottiene una molecola che interagisce con il recettore nicotinico muscolare ma molto più semplice della d-tubocurarina. Tuttavia, il decametonio non è un antagonista competitivo come la d-tubocurarina, ma un antagonista non competitivo. Entrambi agiscono sullo stesso recettore, ma con un meccanismo diverso. Pertanto, non sempre la semplificazione molecolare mantiene l'attività.

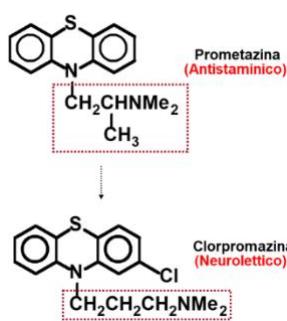


Complicazione molecolare

Esistono vari modi per complicare una molecola. Troviamo:

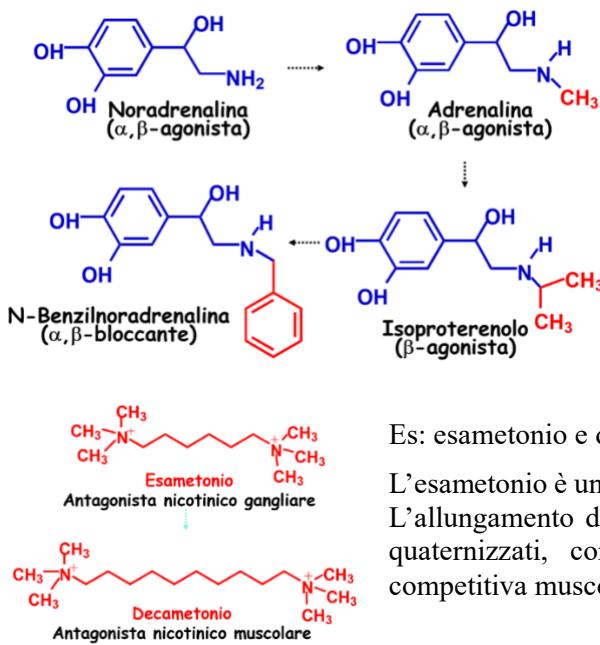
- Omologazione
- Omologazione arilica
- Vinilogia
- Ciclizzazione
- Raddoppiamento molecolare
- Ibridazione molecolare
- Derivatizzazione

Omologazione



Es: prometazina e promazina

La prometazina è un antistaminico, agisce come antagonista del recettore H1 istaminergico. Andando ad omologare un metile si fa sì che si abbia una catena di tre metileni tra l'N fenotiazinico endociclico e l'N basico esociclico, che si protona a pH fisiologico. Questo fa sì che la promazina (qui in particolare troviamo la clorpromazina) sia una molecola con azione antidopaminergica D2, con azione antipsicotica, neurolettica.



Es: derivati della noradrenalina

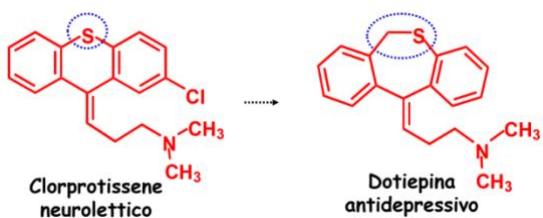
Passando da noradrenalina ad adrenalina, dove l'ammina primaria viene sostituita con un metile, io mantengo l'attività α - β . Se quel metile diventa un gruppo più ingombrante, cioè un isopropile, ottengo l'isoprenalina (o isoproterenolo) che è un agonista β_1 e β_2 .

Se ulteriormente al posto dell'isopropile metto un terz-butile ottengo un agonista β_2 .

Se inserisco un anello aromatico, in questo caso la N-benzilnoradrenalina inizia a mostrare attività antagonista sia α che β .

Es: esametonio e decametonio

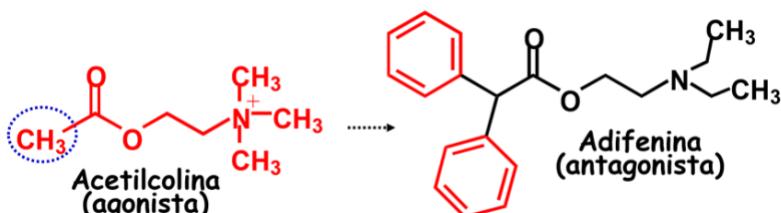
L'esametonio è un antagonista competitivo del recettore nicotinico gangliare. L'allungamento della catena alifatica, che aumenta la distanza tra i due N quaternizzati, conferisce al decametonio un'attività antagonista NON competitiva muscolare.



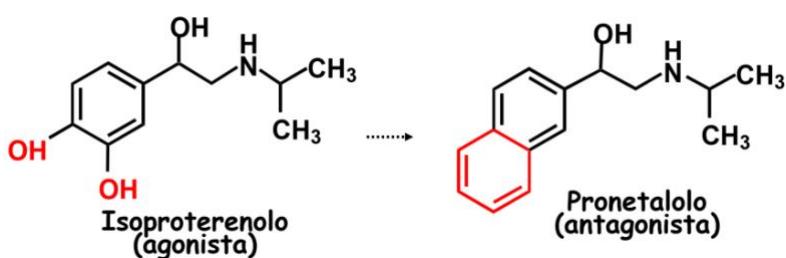
Es: clorprotissene e dotiepina

Il clorprotissene, che appartiene alla classe dei tioxanteni, è un antidopaminergico, quindi antipsicotico. La dotiepina, che presenta una dibenzotiepina, è un antidepressivo triciclico che agisce sul trasportatore di adrenalina, noradrenalina e serotonina.

Omologazione arlica



alifatici o uno aromatico e uno alifatico).



Es: derivati dell'acetylcolina

L'acetylcolina è un agonista. I derivati "difenilmelano", ovvero in cui due H del CH₃ sono stati sostituiti da due fenili, diventano antagonisti muscarinici (non è necessario che siano per forza aromatici, possono anche essere anelli)

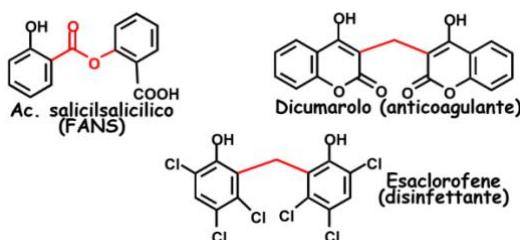
Es: isoprenalina e pronetalolo

L'isoprenalina (o isoproterenolo) è un agonista β adrenergico.

Il dicloroisoproterenolo, dove i due OH sono sostituiti con due atomi di Cl, è un anello di giunzione tra i due; è infatti un agonista parziale β .

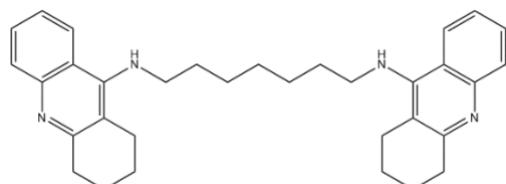
Il pronetalolo, dove al posto dei due OH troviamo un altro anello aromatico, è stato il punto di partenza per la scoperta di tutti gli antagonisti β adrenergici (propranololo ecc.)

Raddoppiamento molecolare



Il raddoppiamento molecolare consiste nella duplicazione del farmacoforo sia direttamente sia per mezzo di uno spaziatore.

Esempio: dicumarolo, principio attivo del COUMADIN, usato come anticoagulante.

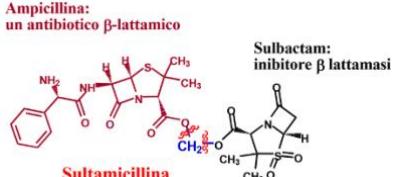


Esempio: bis-tacrina
La tacrina è stato il primo farmaco in terapia per l'Alzheimer però ha un grosso problema: è epatotossico, per cui è stato ritirato dal commercio. Il derivato più interessante è la bis-tacrina dove l'anello aminoacridinico è congiunto con un linker di 7 metileni. Ha una IC₅₀ di 0.4nM, quindi è molto più potente, circa 1000 volte più potente della tacrina, ed è molto meno epatotossico. Purtroppo non è mai entrato in terapia poiché ha una farmacocinetica non ottimale.

La bis-tacrina è un esempio sia di ligando bivalente che di raddoppiamento molecolare. Ligando bivalente significa unire due farmacofori nella stessa molecola attraverso un linker che deve avere una distanza opportuna per far sì che i farmacofori vadano ad intercettare due siti della stessa struttura enzimatica. In questo caso parliamo del sito periferico e del sito attivo dell'acetilcolinesterasi. Raddoppiamento molecolare perché in questo caso i due farmacofori sono la stessa molecola.

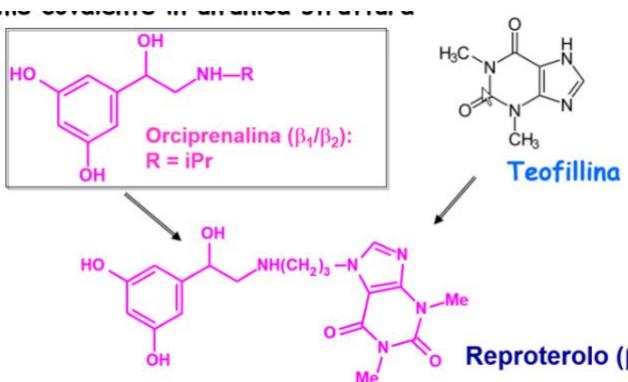
Ibridazione molecolare

L'ibridazione molecolare è un approccio che normalmente serve ad avere un effetto sinergico. Sono in genere due molecole, con un meccanismo d'azione diverso ma con un identico effetto farmacologico, che vengono unite tramite un legame covalente in un'unica struttura. Essendo un legame covalente non è un profarmaco, poiché non si deve rompere il legame per agire.



Esempio: sultamicillina

La sultamicillina presenta un'ampicillina, antibiotico β -lattamico ad ampio spettro, legato covalentemente con un ponte metilenico al sulbactam, un inibitore delle β -lattamasi.



Esempio: reproterolo

Il reproterolo è derivato dall'ibridazione strutturale dell'orciprenalina, il derivato resorcinolico dell'isoprenalina, con la teofillina.

La teofillina è un inibitore delle fosfodiesterasi e come tale aumenta la concentrazione di AMPciclico.

L'orciprenalina agisce attivando tramite recettore β_2 l'adenilatociclasi che porta anch'esso ad un aumento dell'AMPciclico. A livello bronchiale

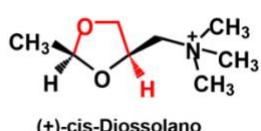
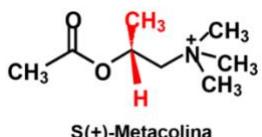
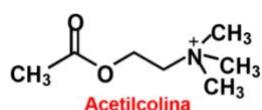
questo porta ad una broncodilatazione.

Nel reproterolo ho unito l'atomo di N terminale dell'orciprenalina con un linker di 3 metileni all'N dell'anello purinico della teofillina, ottenendo quindi un effetto sinergico.

Anche in questo caso non si deve rompere il legame perché si attiva, ma la molecola agisce interamente, da una parte sul recettore β_2 e dall'altra sulla fosfodiesterasi.

Domanda: Qual è l'aspetto più importante dell'ibridazione molecolare?
Risposta: È il bilanciamento dell'attività. Le due porzioni della molecola devono agire sui loro rispettivi target biologici con un'attività simile. Le due IC₅₀ devono essere dello stesso ordine di grandezza, altrimenti diventerebbe o inattiva una parte o tossica l'altra.

Modificazioni steriche

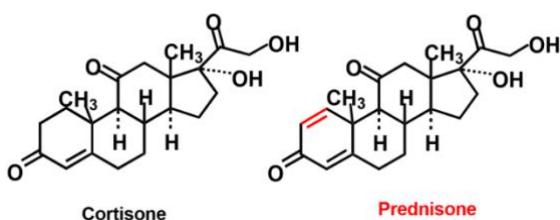


Es: derivati dell'acetilcolina

Se inseriamo un metile in α rispetto alla testa cationica perdo l'attività muscarinica e mantengo quella nicotinica. Al nicotinico non interessa che questo centro chirale sia S o R.

Se inseriamo un metile in β rispetto alla testa cationica ottengo la metacolina. Al muscarinico, verso cui la metacolina è molto attiva, invece interessa molto il centro chirale perché questo deve essere per forza S. E questo è

coincidente con i requisiti che devono avere tutti i derivati muscarinici, a partire dalla muscarina fino ad arrivare a questi derivati diossolanici, e cioè che il centro chirale in β rispetto alla testa ammonica quaternaria deve essere in S.



Es: cortisone e prednisone

Il cortisone è sia glucocorticoido che mineralcorticoide. Se inserisco un doppio legame ottengo il prednisone, spostando l'attività verso il glucocorticoido, perché questo anello assume una conformazione a barca e il carbonile va in uno spazio del recettore che rende selettiva la molecola verso i glucocorticoidi rispetto ai mineralcorticoidi.

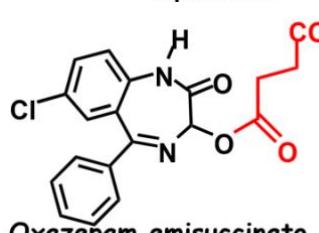
Derivatizzazione

Principalmente abbiamo visto l'esterificazione di gruppi carbossilici, l'esterificazione di gruppi OH oppure l'acilazione di gruppi amminici



Es: dipivefrina

La dipivefrina è un profarmaco dell'adrenalina che viene usato come collirio per il glaucoma. I due OH, che sono il punto labile del catecolo, sono stati derivatizzati con l'acido pivalico.

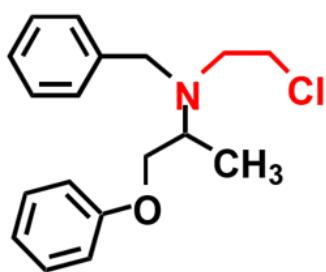


Es: oxazepam emisuccinato

Abbiamo esterificato con acido succinico l'OH dell'oxazepam. L'altra funzione acida, COOH, viene generalmente salificata in forma di sale sodico: si ha l'emisuccinato sodico. Questo rende la molecola solubile e quindi somministrabile anche in forma di gocce.

L'esterificazione si fa anche per avere dei preparati in deposito: per esempio negli antipsicotici la flufenazina viene esterificata in flufenazina decanoato che ha il vantaggio di poter essere somministrata in forma di infezioni settimanali.

Trasformazione di molecole ad azione competitiva in molecole ad azione irreversibile

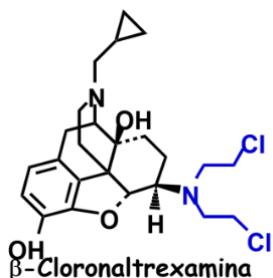


Es: fenossibenzamina

La fenossibenzamina è un antagonista pseudo-irreversibile (perché nel tempo si ripristina) del recettore adrenergico. Uno dei metodi con cui si può ottenere quest'azione irreversibile è l'inserimento di un gruppo cloro-ethylamminico, perché questo gruppo cloro-ethylamminico dà origine ad un anello aziridinico che può dare un attacco con l'aspartato del recettore. Difatti la fenossibenzamina viene utilizzata in caso di attacchi ipertensivi da feocromocitoma, ma non è un antipertensivo che si utilizza quotidianamente.

Fenossibenzamina

È pseudo-irreversibile perché comunque dall'attacco della fenossibenzamina sull'aspartato si ha la formazione di un addotto estereo, quindi nel tempo si idrolizza.



Es: β-chloronaltrexamina

Abbiamo introdotto in posizione 6 del naltrexone, che è un antagonista competitivo dei recettori oppioidi, due gruppi cloroethylamminici, in modo da renderlo un antagonista irreversibile.

Distribuzione elettronica e lipofilia

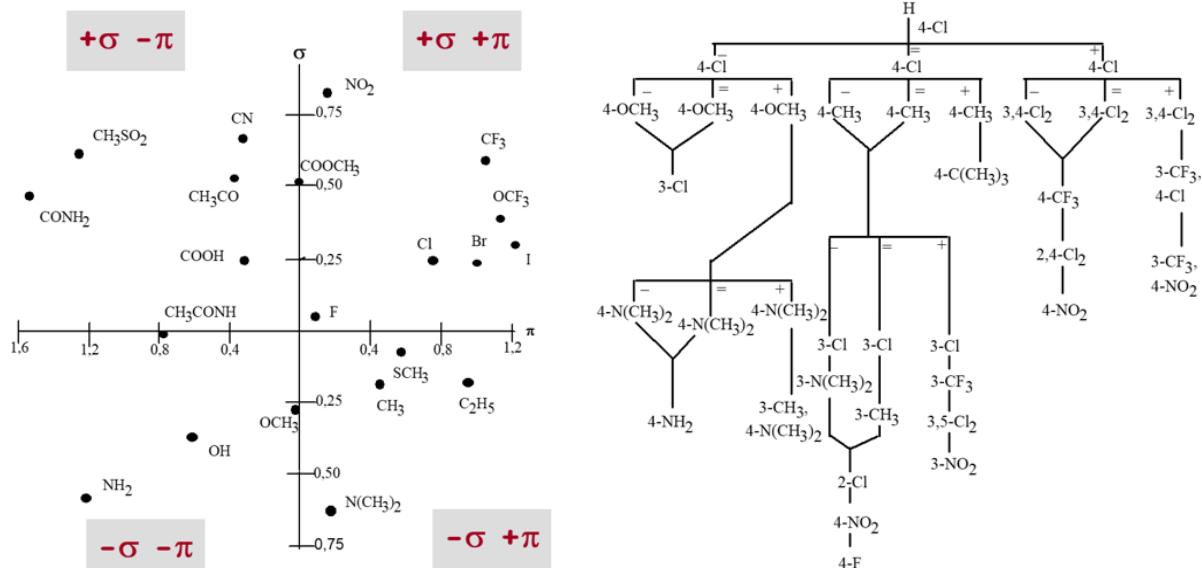
Un altro aspetto di cui occorre tenere conto quando si fanno delle modificazioni strutturali sono le caratteristiche dei gruppi che inserisco. Devo considerare sia il contributo di lipofilia (π) che mi dà quel sostituente sia le caratteristiche elettroniche (σ).

Qui sono rappresentati i vari sostituenti e il loro contributo in termini di lipofilia (dal metossile in giù è negativo) e le caratteristiche elettroniche, dove nella parte superiore troviamo i gruppi elettronattrattori, nella parte inferiore troviamo i gruppi elettronondonatori.

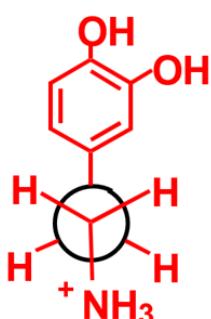
Es invece sono le caratteristiche steriche.

Sulla base di queste caratteristiche c'è un diagramma chiamato diagramma di Craig [craig] che divide i gruppi sulla base delle caratteristiche σ e π , e sulla base di questo diagramma c'è un modo sistematico per apportare delle sostituzioni sugli anelli aromatici secondo questo schema chiamato schema di Topliss.

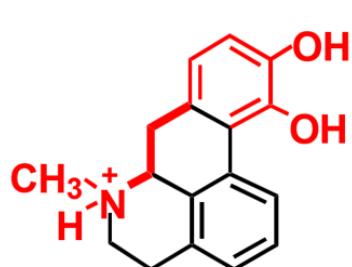
Sostituente	π	σ	Es
H	0.00	0.00	0.00
2-Cl	0.76	0.23	-0.97
3-Cl	0.76	0.37	-0.97
4-Cl	0.70	0.23	-0.97
3-Br	0.94	0.39	-1.16
4-Br	1.19	0.23	-1.16
4-F	0.15	0.06	-0.46
3-I	1.15	0.35	-1.40
4-I	1.43	0.28	-1.40
3-NO ₂	0.11	0.71	-1.02
4-NO ₂	0.24	0.78	-1.02
3-CF ₃	1.07	0.43	-2.40
4-CF ₃	1.07	0.54	-2.40
2-CH ₃	0.84	-0.17	-1.24
3-CH ₃	0.51	-0.07	-1.24
4-CH ₃	0.60	-0.17	-1.24
4-C(CH ₃) ₃	1.68	-0.20	-2.78
2-OCH ₃	-0.33	-0.27	-0.55
4-OCH ₃	-0.44	-0.27	-0.55
4-CN	-0.32	0.66	-0.51
3-N(CH ₃) ₂	0.18	-0.21	-
4-N(CH ₃) ₂	0.18	-0.83	-
4-NH ₂	-1.23	-0.66	-0.61
4-OH	-0.61	-0.37	-0.55



Analoghi rigidi



Dopamina nella conformazione antiperiplanare

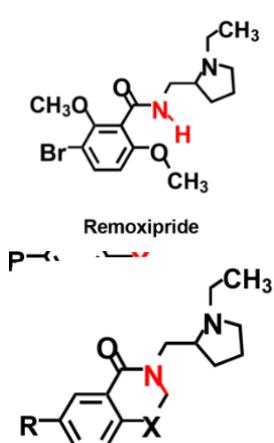


Apomorfina

si capisce chiaramente che la catena laterale della dopamina è coplanare all'anello catecolico, e dove si vede che i due OH sono più vicini alla catena laterale, cosa che corrisponde al rotamero α . Il rotamero β sarebbe quello in cui i due gruppi OH sono più lontani rispetto alla catena laterale.

Dallo studio delle conformazioni della dopamina sono state progettate molecole che hanno una struttura più rigida ma semplificata rispetto all'apomorfina, come le amminotetraline

Es: remoxipride



Nelle benzammidi andando ad inserire due gruppi metossilici adiacenti alla catena benzammidica impedisco la possibilità di dare un legame a H intramolecolare tra NH e uno dei due metossili. Se l'attività viene mantenuta significa che la conformazione attiva non risente di quel legame a H intramolecolare, mentre se l'attività viene persa significa che questo secondo metossile mi distorce la catena laterale. Nella remoxipride ho appurato che questo non è importante per il recettore dopaminergico, mentre invece per i 5-HTD4 ho appurato che invece questo legame intramolecolare è importante per l'attività serotoninergica, e che quindi questo legame in catena laterale CH₃ e NH ammidico è fondamentale.

Es: derivati della dopamina

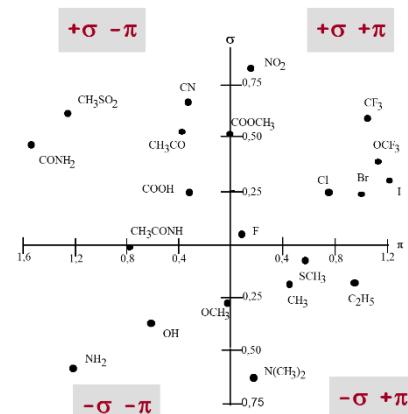
La dopamina è una molecola estremamente flessibile, che ha la possibilità di trovarsi in forma trans- α o trans- β . Prendiamo la trans- β , ovvero dove l'anello aromatico e la catena laterale sono coplanari. Questa può dare origine a due rotameri, il rotamero α e il rotamero β . Qual è la conformazione attiva delle due?

Per chiarire questa cosa ci ha aiutato l'apomorfina, una molecola naturale ciclica che è l'analogico rigido della dopamina in cui

Modificazione dei lead

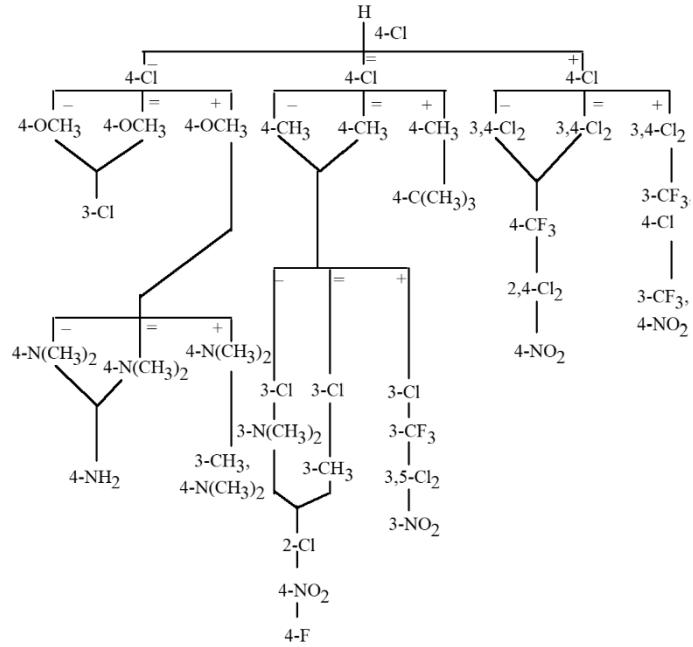
Diagramma di Craig

Ci dà le indicazioni su come procedere con le modificazioni di un anello aromatico in maniera schematica a seconda della distribuzione elettronica, lipofila e del carattere eletronattrattore o elettronondonatore dei vari sostituenti. Ad esempio per gruppi con maggiore idrofilia come OH, NH₂ o metossile, e dal lato opposto i sostituenti con maggiore lipofilia che hanno un comportamento più elettronattrattore. Vi è poi un gruppo di sostituenti con carattere misto (+sigma, -pi greco e -sigma, +pi greco) come il gruppo CH₃ che nonostante il carattere elettronondonatore aumenta la lipofilia del composto. Grazie a questo diagramma conosciamo le caratteristiche dei possibili sostituenti sull'anello aromatico.



Schema di Topliss

Prendendo un anello aromatico non sostituito e iniziandolo a modificare inserendo, per esempio, un gruppo 4-cloro, con l'obiettivo di aumentare la lipofilia della molecola ed un effetto +sigma. Posso avere come risultato la diminuzione o l'aumento dell'attività della molecola. Se l'attività è aumentata andrò ad inserire un nuovo gruppo cloro in meta, rendendo l'anello un 3,4-cloro derivato, se l'attività diminuisce posso prendere in considerazioni posizioni diverse, per esempio formando un 2,4-cloro derivato o inserire nuovi gruppi elettronattrattori con caratteristiche di lipofilia diverse. Se l'attività invece aumenta posso provare ad inserire un trifluoro metile in 3 o un nitro metile in 4 (gruppi con caratteristiche simili al cloro). Se l'inserimento del cloro in 4 diminuisce l'attività vuol dire che l'inserimento di un gruppo elettronattrattore con caratteristiche lipofile non va bene, andrò ad inserire, invece, ad aumentare gradualmente l'idrofilia. Si prova ad inserire un metossile (aumenta idrofilia), se dopo ciò l'attività aumenta andrò ad inserire gruppi ancora più idrofili e con carattere elettronondonatore, inserisco, quindi, dei gruppi dimetilamminici. se la nuova sostituzione avrà attività ridotta indago prima l'attività dei metili inserendo gruppi amminici, mentre, se l'attività rimane uguale si prova ad inserire altri gruppi elettronondonatori oltre al dimetilamminico, con gruppi metilici.

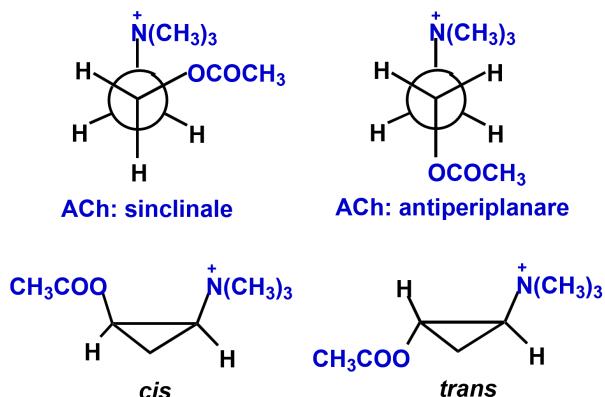


Strategie per la modificaione dei lead (analoghi rigidi)

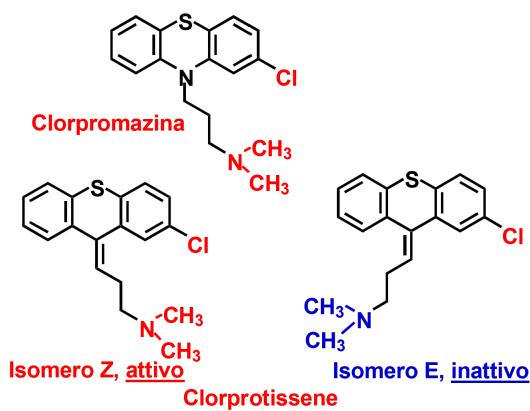
Vantaggi della restrizione conformazionale:

- definizione della conformazione attiva
- eventuale selettività per i recettori per i vari sottotipi
- definizione del modo di interazione con il recettore

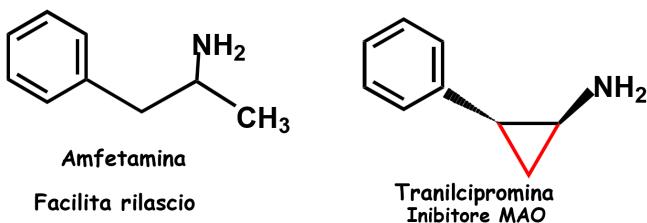
Sono stati svolti degli studi su analoghi rigidi dell'acetilcolina, per individuarne la conformazione attiva per i vari sottotipi recettoriale tra la conformazione gauche o la trans considerando che nella gauche il gruppo ammonico quaternario può formare legami con il gruppo acetossilico stabilizzandone la struttura. Si è notato per l'aceticolina che la conformazione trans (antiperiplanare) è la favorita per il recettore M3, per l'M2 non è accertato, gli studi sono ancora in corso.



Un approccio utile per evidenziare il posizionamento di una catena flessibile rispetto ad un anello aromatico, in questo caso quello delle fenotiazine è la sostituzione con tioxanteni, ovvero carboni sp², per avere una configurazione E o Z. La conformazione Z sarà l'attiva, la catena deve trovarsi dalla stessa parte dell'anello sostituito (conformazione cisoide, dalla stessa parte del cloro).



Altra restrizione conformazionale è l'irrigidimento dell'amfetamina, se inserisco la catena laterale dell'amfetamina in un ciclo ottengo una molecola che non ha più l'attività di facilitare il rilascio di catecolamine ma diventa un forte inibitore delle MAO (tranilcipromina, utilizzato per diversi anni come antidepressivo).



Modulazione chirale

L'abbiamo vista soprattutto nel sistema adrenergico. In alcuni casi un centro chirale è fondamentale per l'attività della molecola, in altri casi è poco importante a seconda delle caratteristiche del target biologico. Riguarda sia fattori farmacodinamici che farmacocinetici.

- EUTOMERO: enantiomero più attivo (EU)
- DISTOMERO: enantiomero meno attivo (DIS)
- RAPPORTO EUDISMICO: rapporto di potenza tra eutomero e distomero

Possono esistere enantiomeri con attività simili, di cui, però, bisogna valutarne la potenza sia in vitro che in vivo, o degli enantiomeri inattivi o che interagiscono con bersagli diversi o che hanno azione diversa sullo stesso target.

Prometazina - presenta un centro chirale sulla ramificazione ma i 2 enantiomeri hanno la stessa attività

Ibuprofene - l'enantiomero R ha attività minore rispetto ad S ma l'R in vivo viene convertito nell'S

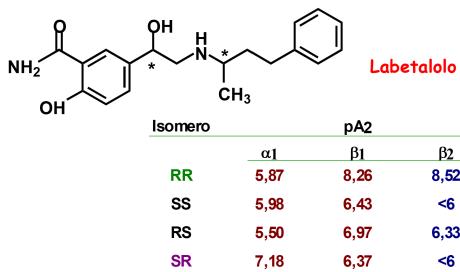
Warfarin - l'enantiomero R e S nell'uomo ha lo stesso effetto anticoagulante, quello usato come raticida deve essere l'enantiomero S, che ha maggiore attività come raticida, l'interazione dipende anche dalla specie.

Alfa metil dopa e propanololo - per essere riconosciuto dal target deve essere l'enantiomero S, l'R rappresenta impurezza che diminuisce l'attività della molecola

Bay K 8644 - l'enantiomero - è attivatore dei canali del calcio voltaggio dipendenti, l'enantiomero + è antagonista dei canali del calcio. Per la maggior parte delle diidriopiridine con un centro chirale, l'enantiomero + è quello che viene somministrato perché ha attività antagonista.

A-propossifene - analogo della morfina, l'enantiomero - ha attività antipulsiva, l'enantiomero + ha maggiore attività analgesica.

Labetolo - si tratta di un ibrido strutturale, ha due centri chirali, importante azione antagonista sul recettore beta1 e alfa1 adrenergico, viene somministrato come miscela dei vari diastereoisomeri, poiché l'enantiomero RR ha maggiore attività per i recettori beta, mentre SR per gli alfa.

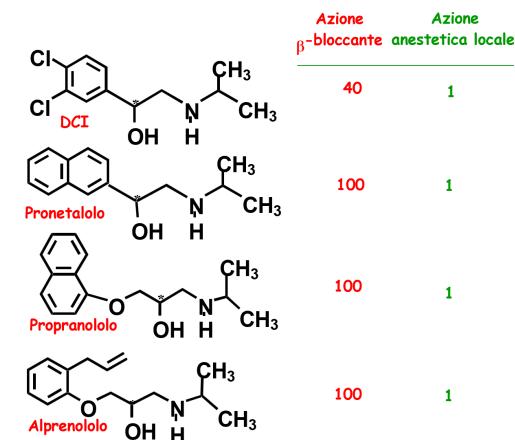


Talidomide - l'enantiomero S negli anni 60' ha causato effetti teratogeni su molti neonati dando il via ai controlli dell'attività teratogena nei farmaci. L'enantiomero R, invece, non da questa attività.

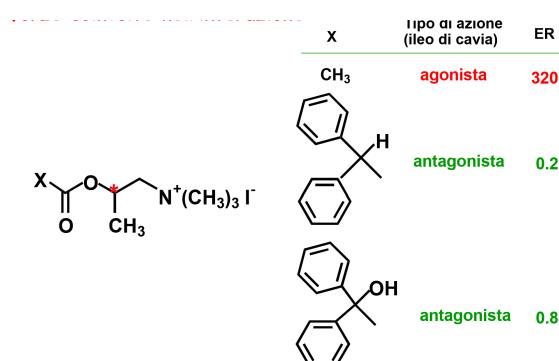
L'enantioselettività ci aiuta nello studio di:

- meccanismo d'azione dei farmaci
- sito d'interazione
- classificazione dei recettori
- forze coinvolte nell'interazione

è importante sottolineare che il rapporto eudismico non ha la stessa importanza per tutti i tipi di recettori, ci sono molecole che avendo un elevato rapporto eudismico per una determinata azione, possono essere ugualmente attive verso altre azioni biologiche, come nel caso degli antagonisti beta bloccanti. Queste molecole hanno un rapporto eudismico elevato per l'azione beta bloccante: in configurazione S sono 100 volte più attivi rispetto all'enantiomero R, mentre, per l'azione anestetica locale, l'enantiomero R e S sono ugualmente attivi. Questo ci fa capire quanto sia importante il target biologico. come bersaglio due recettori diversi avranno attività diversa per i due enantiomeri nei confronti di un primo bersaglio, mentre possono avere la stessa attività per il secondo bersaglio.



L'altro aspetto importante è che non sempre, in molecole che agiscono sullo stesso target, quando vado a complicare ulteriormente la struttura, mantengo lo stesso rapporto eudismico.



Se vado ad ingombrare il gruppo metile dell'acetylcolina in beta al gruppo ammonico quaternario con un secondo metile, ottengo una molecola chiamata metacolina che presenta una forte enantioselettività: l'enantiomero S è circa 300 volte più attivo dell'R. Se vado ad ingombrarlo ulteriormente con gruppi aromatici posso passare da attività agonista ad antagonista andando a diminuire l'importanza del rapporto eudismico. In questo caso viene aumentata l'interazione della molecola con il recettore grazie all'inserimento del gruppo ingombrante, viene aumentata l'affinità della molecola andando a diminuire l'importanza della stereochimica della molecola.

Ibridazione molecolare (o approccio simbiotico)

Vengono uniti 2 farmacofori con azione biologica complementare in maniera di avere un'unica entità molecolare, si può scegliere di utilizzare

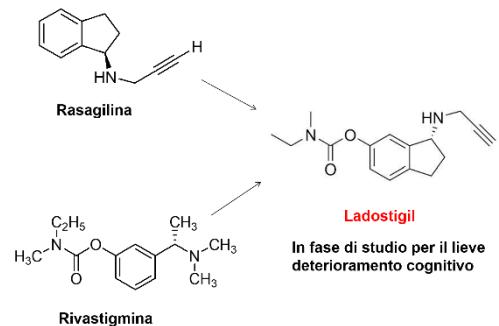
- tutta la struttura delle molecole da ibridare (ibrido integrale unito da un linker)
- solo delle porzioni farmacoforiche (in maggiore o minore presenza di elementi strutturali di una o dell'altra).

L'ibrido deve essere bilanciato, ovvero, agendo come unica molecola deve avere attività paragonabile sui 2 target, è evidente che, somministrando un'unica molecola, se su un target ha attività di 10^{-7} e sull'altro 10^{-9} sul secondo avrà attività maggiore e somministrando una quantità pari a 10^{-9} su uno dei due target avrà un'azione blanda, mentre, somministrando una quantità di 10^{-7} avrà tossicità su uno dei due target.

Ibidi strutturali

Abbiamo visto il leproterolo rispetto all'azione agonista per i beta2 ibridando orciprenalina (agonista beta2) e teofillina (inibitore delle fosfodiesterasi), i 2 farmacofori rappresentano un ibrido integrale ed hanno azione sinergica che si traduce in broncodilatazione stimolando la proteina GS che aumenta l'AMP ciclico grazie all'azione agonista, l'AMP ciclico viene aumentato ulteriormente inibendo le fosfodiesterasi. È un farmaco in fase3 di sperimentazione clinica.

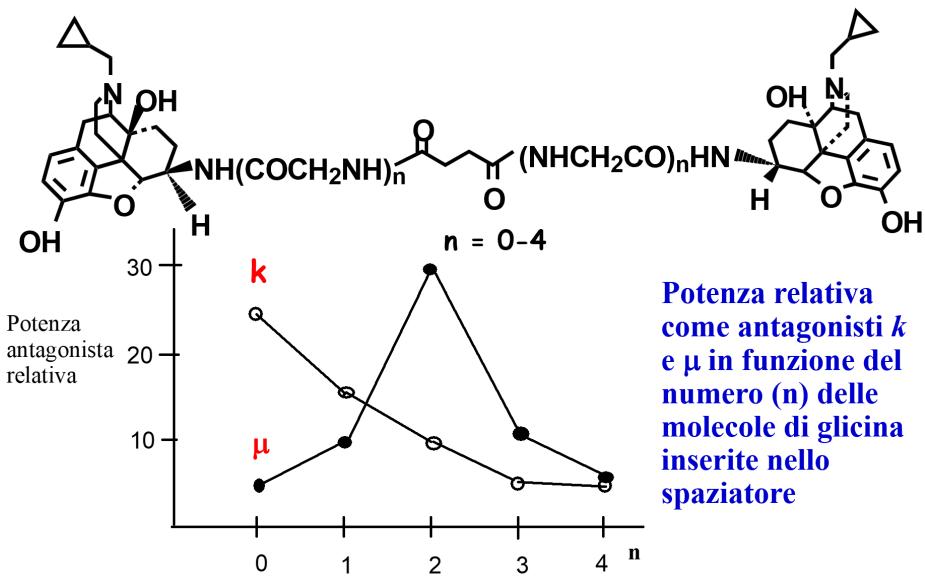
La rasagilina è inibitore selettivo delle MAO b grazie al gruppo propargilamminico derivante dalla rasagilina (irreversibile per interazione col FAD), da cui faccio un ibrido parziale con la rivastigmina, inibitore di ACE nella terapia per l'Alzheimer, formando il Ladostagil. Prevede la sovrapposizione degli anelli, il mantenimento del gruppo carbammato e del gruppo propargilammino, è in studio per la terapia contro il deterioramento cognitivo.



Ligandi bivalenti

Consistono in 2 farmacofori uniti da un linker con l'obiettivo di interagire con 2 siti dello stesso target biologico. Ad esempio la Bis-tacrina, che è anche un raddoppiamento molecolare (perché si è unito l'anello amminoacridinico con un linker di 7 metileni) va ad intercettare due siti dell'ACE aumentando l'attività e diminuendo gli effetti collaterali della tacrina, la quale non ha una farmacocinetica favorevole, quindi non è entrata in terapia.

Un altro studio è stato effettuato da Portoghese sui ligandi bivalenti del Naltrexone provando diversi linker sul raddoppiamento molecolare a lunghezze diverse di glicina legate ad un acido succinico tramite un legame ammidico. Per quanto riguarda il recettore MU l'azione agonista ottimale è stata ottenuta con una lunghezza del linker da attività ottimale con $n=2$, per quanto riguarda il recettore K, invece, l'attività ottimale è con $n=0$, cioè quando non è presente il linker glicinico ma con il Naltrexone legato con un legame ammidico direttamente all'acido succinico.

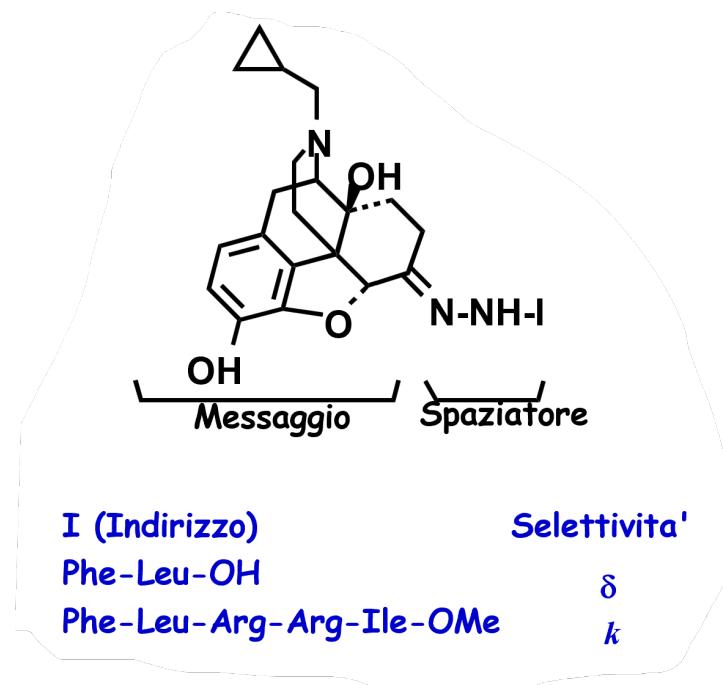


Teoria indirizzo-messaggio

È una teoria che scomponete la molecola in 2 parti:

- la prima chimica, quella coinvolta nel riconoscimento, che indirizza la molecola verso un determinato recettore
- la seconda è la porzione del messaggio, quella dell'attività sul recettore.

È stata applicata questa teoria sui derivati oppiacei, evidenziando le modifiche del Naltrexone in posizione 6, derivatizzando il carbonile con derivati idrazonici e due diverse sequenze amminoacidiche si ottengono molecole con diversa selettività per i sottotipi recettoriali. La seconda mostra una maggiore selettività per il sottotipo k , mentre la prima, mostra una maggiore selettività per il sottotipo delta. La catena amminoacidica indirizza la molecola prevalentemente verso uno dei due sottotipi dove la porzione del massaggio può dare origine all'attivazione del recettore

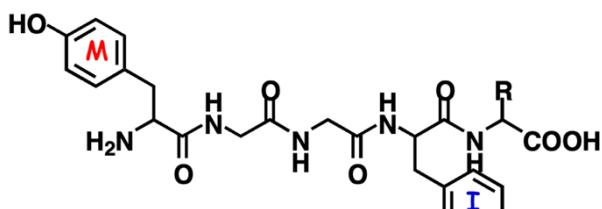


Conclusione del precedente argomento “teoria indirizzo-messaggio”

Portoghesi ha teorizzato anche sulla Leu-encefalina e Met-encefalina attribuendo alla porzione fenilalanina terminale della Leu-encefalina la porzione dell’indirizzo cioè quella che porta queste encefaline ai recettori oppioidi, mentre il messaggio è da attribuire alla porzione tirosinica, quella che andrà poi a interagire con il sito.

Strategie per la modifica del lead (teoria indirizzo-messaggio)

• applicazioni



R = $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ Leu-encefalina

R = $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$ Met-encefalina

STRATEGIE DI MODIFICAZIONE DI UN LEAD

Andiamo a capire come un Lead può essere modificato per interagire con i diversi sottotipi recettoriali, pur avendo una struttura di base analoga.

Questo è quanto è stato applicato alla struttura delle poliammine. La poliammina, infatti, può essere utilizzata come supporto universale perché è caratterizzata da tanti gruppi cationici che possono trovare delle controparti nei target biologici (gli stessi gruppi fosfato presenti nel DNA rappresentano dei controioni con cui possono andar a interagire le teste cationiche).

Oltre ad essere modulabili (andando ad inserire opportuni gruppi sugli atomi di azoto e avere delle distanze opportune fra le teste cationiche), le poliammine possono servire anche per creare dei coniugati e infatti è quello che molti gruppi di ricerca stanno facendo relativamente alla coniugazione di catene poliamminiche a dei gruppi/cicli ad attività antitumorale per due ragioni:

- La poliammina può aumentare l’interazione in quanto da la possibilità di creare ulteriori legami ionici con la molecola del DNA. Questo è importante per gli antitumorali che agiscono a livello del DNA o anche a livello di enzimi importanti per il DNA come le topoisomerasi;
- Siccome le poliammine endogene sono importanti per la crescita cellulare, una catena poliamminica serve per veicolare maggiormente la porzione antitumorale in maniera più selettiva nelle cellule cancerogene (perché le cellule tumorali per proliferare hanno bisogno una maggiore concentrazione di poliammine)

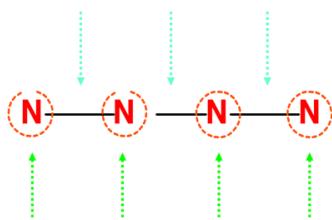
Quindi i due motivi per cui una poliammina è così importante sono sia l'evento di interazione sia la veicolazione all'interno delle cellule tumorali per trasferire la porzione antitumorale.

Le funzioni bersaglio di una poliammina sono:

- COOH
- NH₂
- OH
- SH
- SS
- R
- Ar

La specificità da azione la si può ottenere sia andando a comprendere la migliore distanza tra le teste cationiche, sia inserendo opportuni sostituenti sugli atomi di azoto in modo da modulare la specificità di un target biologico rispetto ad un altro

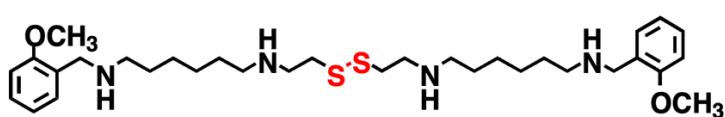
Opportune catene tra gli atomi d'azoto possono controllare il riconoscimento recettoriale



Opportuni sostituenti sugli atomi d'azoto possono controllare affinità e selettività

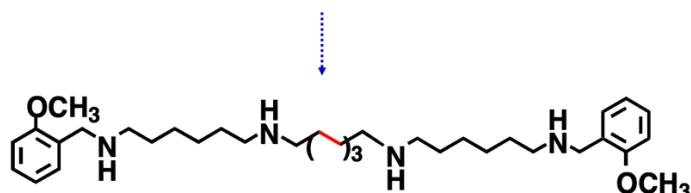
ESEMPIO

• Applicazioni



Benextramina:

- antagonista irreversibile α_1 -adrenergico
- antagonista competitivo del recettore muscarinico



Metoclopramide:

- antagonista M₂ muscarinico privo di attività α -adrenergica

La benextramina è un antagonista competitivo nei confronti del recettore muscarinico e antagonista irreversibile nei confronti del recettore alfa1-adrenergico. Questo perché la cisteina presente sull'alfa1-adrenergico può dare interazione con la cistamina centrale con un legame S-S portando a una reazione irreversibile, ma questo legame S-S manca nel recettore muscarinico facendo sì che il meccanismo sia

competitivo; quindi se vado a cambiare le distanze interne, cioè tolgo il disolfuro e allungo la catena interna, ottengono una diminuzione dell'attività alfa-antagonista, mentre aumento l'azione M2 antagonista.

Questo è quindi un esempio della modulazione dell'attività sulla base delle diverse distanze.

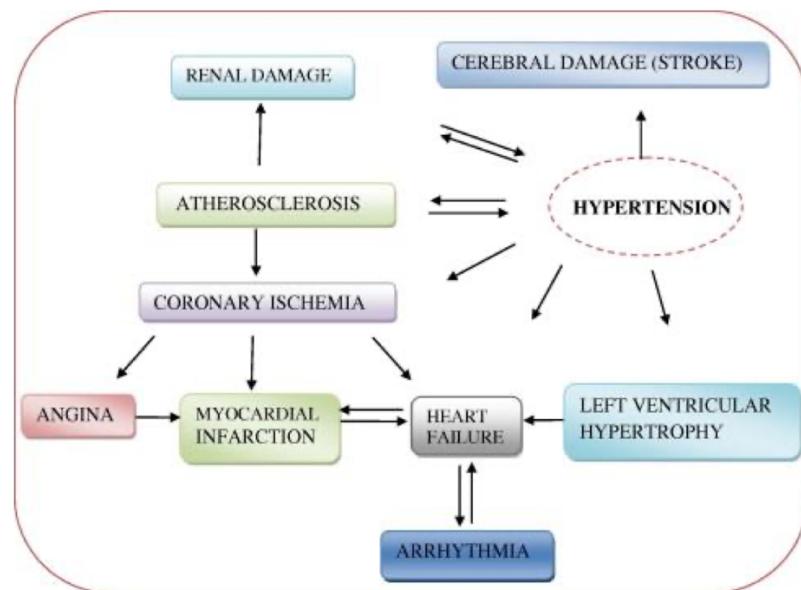
Infine, andando a fare un ibrido strutturale sulla metoctramnia, andando quindi ad inserire il nucleo piridobenzo diazepinonico (o in generale inserendo un opportuno sostituente sugli atomi di azoto di questo antagonista muscarinico appena trattato) otteniamo un potente antagonista del M2 muscarinico.

La tripitramina rappresenta il più potente antagonista muscarinico M2 selettivo anche verso tutti i sottotipi recettoriali M2

ANTIIPERTENSIVI

Con il termine ipertensione si intende un aumento stabile della pressione arteriosa nel grande circolo che deve corrispondere a valori superiori a 140 (massima) e 95 (minima) mmHg. È molto diffusa, circa il 25% della popolazione adulta nei paesi industrializzati ne soffre e ogni anno circa 2 milioni di persone sono riconosciute come ipertese.

Il 35% delle patologie cardiovascolari è attribuibile all'ipertensione e quest'ultima è connessa a una serie di patologie come ictus, danni renali, aterosclerosi, ischemia coronarica che di conseguenza può dare origine ad angina pectoris, infarto del miocardio, aritmie, difetti nella conduzione atrio-ventricolare, ipertrofia ventricolare sinistra. I farmaci usati come ACE inibitori e antagonisti del recettore dell'angiotensina del hanno anche un effetto ottimale sull'ipertrofia ventricolare.



Fattori neuronali: un eccessivo aumento del tono simpatico dovuto a stress o emozioni, hanno un ruolo importante nella patogenesi dell'ipertensione;

Fattori ormonali: il sistema renina-angiotensina-aldosterone ha un importante ruolo nella regolazione della pressione, infatti il passaggio da angiotensinogeno ad angiotensina 1 e 2 porta ad un aumento dell'aldosterone. Questo passaggio è sotto il controllo della **renina** e dell'enzima convertitore dell'angiotensina (**ACE**).

Nell'eziologia dell'ipertensione sono implicati anche altri ormoni come vasopressina (ADH) e prostaglandine.

Classificazione generale:

- Anti-adrenergici ad azione periferica (come i ganglioplegici - non più usati a causa degli effetti collaterali, antagonisti dei recettori alfa e beta-adrenergici)
- Anti-adrenergici ad azione centrale (come clonidina, α -metildopa)
- Vasodilatatori diretti che agiscono sulle arteriole (a livello prevalentemente arteriolare: idralazina, diazossido, minoxidil; a livello arterolare e venoso: nitroprussiato sodico e calcio antagonisti tipo diidropiridine)
- Diuretici (tiazidi, spironolattone, diuretici dell'ansa)
- Inibitori dell'ACE (come captopril, enalapril)
- Antagonisti recettoriali dell'angiotensina 2 chiamati Sartani (o ARB)

Farmaci che agiscono sul sistema renina- angiotensina:

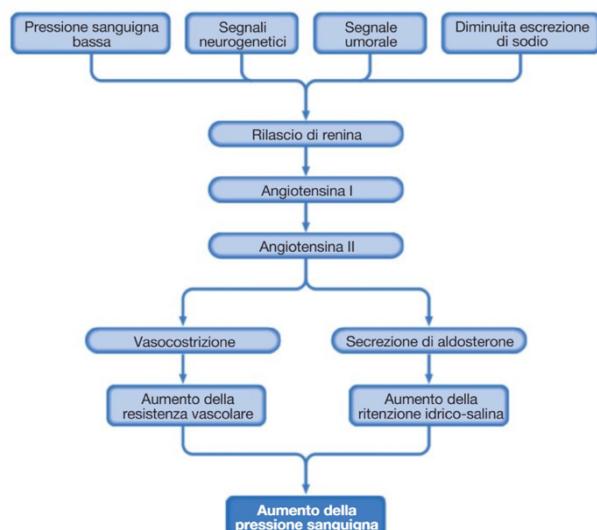
- Inibitori ACE
- Antagonisti del recettore dell'angiotensina 2
- Inibitori della renina

Il sistema renina angiotensina è un importante sistema per il mantenimento dell'omeostasi cardiovascolare agendo in particolare sulla pressione arteriosa, sul volume ematico e sull'equilibrio elettrolitico. Un'eccessiva produzione di renina e soprattutto di angiotensina 2 causa ipertensione e insufficienza cardiaca.

Inoltre, l'eccesso di angiotensina 2 provoca effetti come:

- Vasocostrizione diretta
- Aumento del riassorbimento del sodio dal tubulo prossimale
- Stimolazione del rilascio di aldosterone
- Ipertrofia e rimodellamento delle cellule vascolari e cardiache

Ci sono vari elementi provocano il rilascio di renina, come per esempio la pressione sanguigna bassa, segnali neurogenetici, riduzione della concentrazione di sodio nel sangue; il rilascio di renina provoca di conseguenza la trasformazione dell'angiotensinogeno in angiotensina 1 che poi viene convertita in angiotensina 2 dall'ACE, causando vasocostrizione, secrezione di aldosterone



e aumento della ritenzione idrico-salina con aumento della pressione sanguigna.

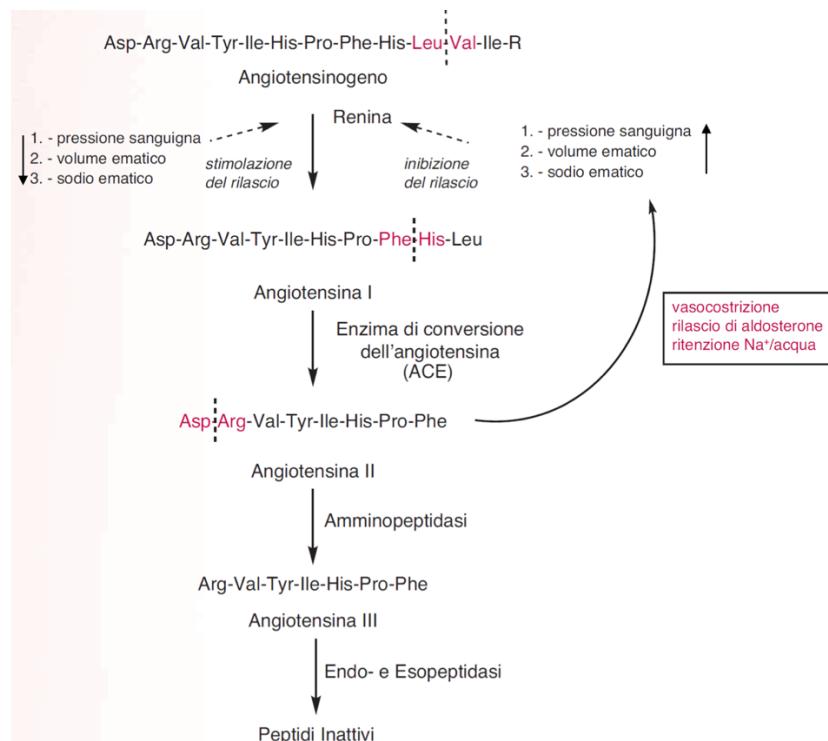
FORMAZIONE DI ANGIOTENSINA 1 E 2

Il precursore di tutto è l'**angiotensinogeno**, che:

- È una catena peptidica di 452 AA (l'ultima parte è caratterizzata da leucina-valina-isoleucina)
- È un'alfa2-globulina, presente nel plasma e viene sintetizzato e secreto a livello epatico.
- Viene idrolizzato nel legame peptidico tra leucina e valina. L'enzima che provoca questa scissione è la **renina**, che appartiene alla classe delle aspartato-proteasi (significa che la scissione avviene grazie alla presenza di due aspartati). La renina è controllata da vari segnali come vasocostrizione, rilascio di aldosterone e ritenzione di sodio e acqua. In pratica è regolata dall'aumento o dalla diminuzione della pressione arteriosa: quando la pressione arteriosa, il volume ematico e sodio ematico si alzano, il segnale che arriva alla renina è quello di inibirne il rilascio; quando invece diminuiscono, il segnale è quello di stimolare il rilascio di renina sempre per mantenere un equilibrio.

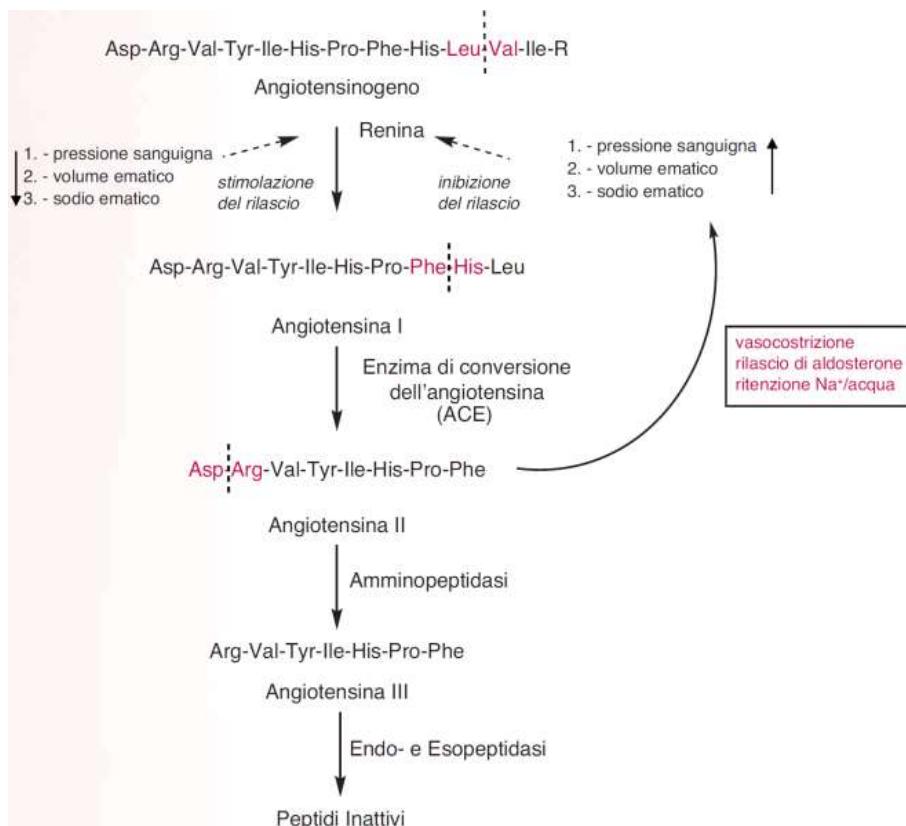
La renina agendo sull'angiotensinogeno produce l'angiotensina 1, la quale subisce poi l'azione dell'enzima di conversione dell'angiotensina che rompe il legame fenilalanina-istidina per ottenere l'angiotensina 2, la quale è uno dei principali responsabili della vasocostrizione e rilascio di aldosterone e ritenzione di sodio e acqua. Quando si ha un aumento di questi fattori il segnale va alla renina per inibirne il rilascio ed evitare quindi un'ulteriore formazione di angiotensina 2.

L'angiotensina 2 subisce poi un'ulteriore idrolisi da parte di altri enzimi come amminopeptidasi e endo-eso-peptidasi che portano a peptidi non attivi.

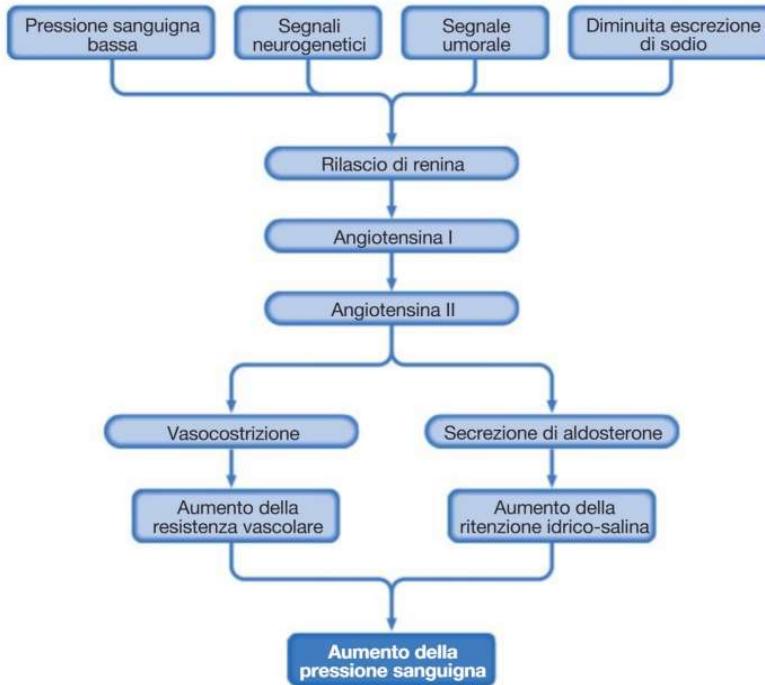


La renina è **estremamente specifica** per l'angiotensinogeno, mentre l'ACE (che è una zinco-carbossipeptidasi) non è specifica e quindi provoca la proteolisi anche di altri peptidi tra cui la bradichinina.

SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA



La scorsa lezione si è iniziata a vedere la strada con cui viene a formarsi, tramite l'operazione di due enzimi successivi, l'angiotensina II a partire dall'angiotensinogeno. L'angiotensinogeno è una proteina abbastanza grande, di 452 aminoacidi, che viene processata a livello del legame leucina-valina da parte della renina formando l'angiotensina I che a sua volta viene processato nel legame peptidico fenilalanina-istidina, portando alla formazione dell'angiotensina II. Questo secondo passaggio è a carico dell'altro enzima coinvolto nella formazione dell'angiotensina, l'ACE, il quale è una zinco-dipeptidil carbosipeptidasi ed è uno dei principali target sulla via di inibizione della formazione dell'angiotensina, anche perché l'intervento di altre peptidasi sull'angiotensina porta alla formazione di peptidi inattivi. Questo octapeptide, l'angiotensina II, fa sì che ci siano delle risposte vasocostrittorie, rilascio di aldosterone e ritenzione di sodio, quindi ha azione ipertensiva.



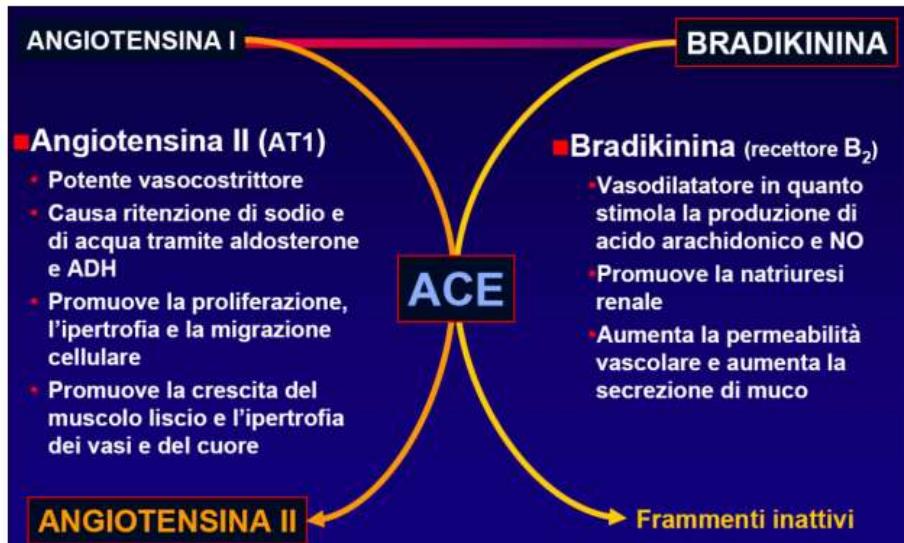
L'angiotensina agisce su due tipi diversi di recettori (in realtà sono quattro, ma l'AT1 e l'AT2 sono i più studiati), principalmente è il recettore AT1 quello con cui l'angiotensina interagisce originando la cascata di eventi. I due enzimi, renina e ACE, sono diversi, la prima è una proteasi aspartica molto specifica per il suo substrato, l'angiotensinogeno, mentre l'ACE non è così specifico, ma ha diversi substrati, non solo l'angiotensina I, questa in parte è la causa di alcuni effetti positivi degli ACE inibitori, ma anche di effetti negativi. La renina è substrato specifica, c'è una specificità nell'interazione dell'angiotensinogeno su siti specifici della renina, tale che il riconoscimento da parte della renina è molto selettivo. Questo enzima si chiama renina perché è secreto principalmente dalle cellule iuxtaglomerulari del rene e, poiché è così specifica, rappresenta il fattore limitante di tutta la cascata di formazione di angiotensina II. Queste cellule iuxtaglomerulari hanno recettori specifici che fanno sì che la renina venga inibita o rilasciata in seguito a dei segnali umorali ben precisi: l'aumento di pressione sanguigna, l'aumento del volume ematico, l'aumento del sodio ematico causano un'inibizione del rilascio di renina, se invece si ha un calo pressorio, diminuzione del volume ematico e del sodio ematico si ha un aumento del rilascio di renina.

L'ACE, invece, è una glicoproteina localizzata prevalentemente sull'endotelio, è distribuita in tutti gli organi più importanti, ma in particolare è presente a livello dell'endotelio capillare polmonare, che è la principale fonte di ACE. Differentemente dalla renina l'ACE è un enzima non così specifico e somiglia ad altre carbosipeptidasi, in particolare alla carbosipeptidasi A, e per agire richiede prevalentemente una sequenza tripeptidica come substrato. È una dipeptidasi, perché nella scissione da decapeptide a octapeptide rilascia un dipeptide, rompe la catena amminoacidica rilasciando un doppio amminoacido. Un altro substrato su cui questo enzima ha azione proteolitica è la bradichinina, che è liberata anche durante la reazione allergica, la bradichinina ha azioni in qualche modo opposte a quelle dell'angiotensina: ha azione vasodilatatrice, uno dei motivi per cui crea edema nella reazione allergica, è broncocostrittore (peggiora l'asma), stimola la sintesi di prostaglandine aumentando la risposta, stimola l'escrezione di sodio attraverso le urine e aumenta la permeabilità vascolare. Questi effetti della bradichinina vanno tenuti presenti quando si parla di ACE inibitori, perché alcuni di essi con l'inibizione dell'ACE diventano dei fattori positivi, se si inibisce l'ACE si inibisce la degradazione della bradichinina e questo porta a vasodilatazione sommata all'effetto di interruzione dell'angiotensina 2.

Quindi alcuni di questi effetti sono positivi per l'azione antiipertensiva, altri no, come l'effetto broncocostrittore che porta la comparsa di tosse che ne limita l'utilizzo.

Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu

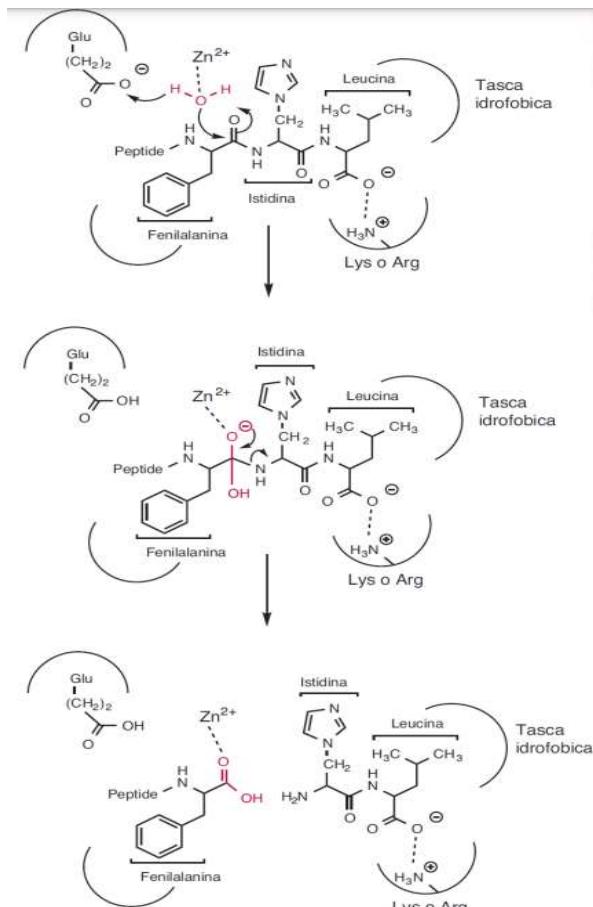
Arg - Pro - Pro - Gly - Phe - Ser - Pro - Phe - Arg



Le differenze tra questi due substrati dell'ACE sono diverse. L'angiotensina I è un decapeptide che viene processato a livello del legame fenilalanina-istidina, mentre la bradichinina è un nonapeptide con una sequenza un po' diversa. Quando l'ACE agisce sulla bradichinina porta a peptidi inattivi, mentre agendo sull'angiotensina I produce l'angiotensina II, un peptide attivo. L'angiotensina II esercita gli effetti vasocostrittori attivando i recettori AT1-2-3-4, sono 4 sottotipi recettoriali, l'1 e 2 sono più studiati, il 3 e il 4 sono di più recente scoperta e sono meno studiati. Per certi aspetti gli AT2 evocano effetti quasi opposti a quelli del recettore AT1. I principali effetti dell'angiotensina II sono mediati dagli AT1: la vasocostrizione, la ritenzione di sodio, la liberazione di aldosterone e ADH, promuove la proliferazione e l'ipertrofia (che si ha anche a livello delle cellule cardiache, il cosiddetto rimodellamento cardiaco, nocivo ai fini delle patologie cardiovascolari). La bradichinina agisce sui recettori B2 e le sue azioni in alcuni aspetti sono opposte a quelle dell'angiotensina: è un vasodilatatore, stimola la produzione di acido arachidonico e di ossido nitrico (un potente vasodilatatore), aumenta l'escrezione di sodio e aumenta la permeabilità vascolare.

Meccanismo di proteolisi di Angiotensina I svolto da ACE

Il meccanismo di proteolisi dell'angiotensina I a carico dell'enzima ACE è stato il punto di partenza nella progettazione degli ACE-inibitori. Sono rappresentati i frammenti attaccati dalla zinco carbossipeptidasi: leucina, istidina e fenilalanina. Bisogna rompere con l'ACE il legame tra istidina e fenilalanina per originare l'angiotensina II. Lo **zinco** ha un ruolo molto importante, perché nel sito catalitico complessa una molecola d'acqua, che è il nucleofilo che attacca il legame peptidico che l'enzima deve idrolizzare sull'angiotensina I, cioè attacca il legame tra fenilalanina e istidina. Questo attacco è coadiuvato ulteriormente da un glutammato dell'enzima, che interagendo con l'H dell'acqua rende ancora più nucleofilo l'ossigeno per l'attacco sul carbonile che deve idrolizzare. Lo zinco del sito catalitico è molto importante anche perché stabilizza la carica negativa che si forma nell'intermedio tetraedrico dopo che si ha avuto l'attacco nucleofilo da parte dell'acqua. Molto importante per il riconoscimento da parte dell'enzima è il **sito cationico** (residuo di Arg o Lys): c'è un primo attacco importante, in questo caso un legame elettrostatico, che posiziona il gruppo carbossilato della leucina



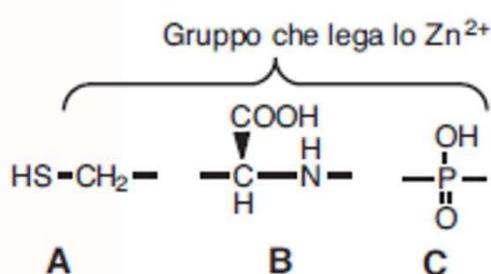
in modo che interagisca con un amminoacido basico, carico positivamente, che viene definito **sito cationico**. Il motivo per cui è scritto lisina o arginina è dovuto al fatto che in questa zona ci sono entrambi gli amminoacidi e inizialmente si pensava che l'attacco avvenisse su un'arginina, che ha un gruppo amminico carico a pH fisiologico, nel momento in cui si è avuta la cristallizzazione di una di queste molecole si è visto che invece l'amminoacido con cui interagisce è una lisina, quindi genericamente si dice **sito cationico**. Dunque il carbossilato della leucina interagisce con questo **sito cationico** di un amminoacido basico protonato a pH fisiologico. Inoltre la catena laterale della leucina viene accomodata in una **tasca idrofobica** che conferisce una certa specificità a questo residuo di leucina carbossiterminale. La leucina è considerata un amminoacido non polare, ha infatti una catena idrocarburica importante. Nell'enzima è presente una **seconda tasca idrofobica** dove viene accomodato il fenile della fenilalanina del substrato. Al termine della reazione si ha la scissione a livello del legame fenilalanil-istidina

con la perdita del dipeptide istidina-leucina e con la fenilalanina che rimane legata al resto del peptide formando angiotensina II. Da un decapeptide si ottiene un octapeptide che termina con una fenilalanina.

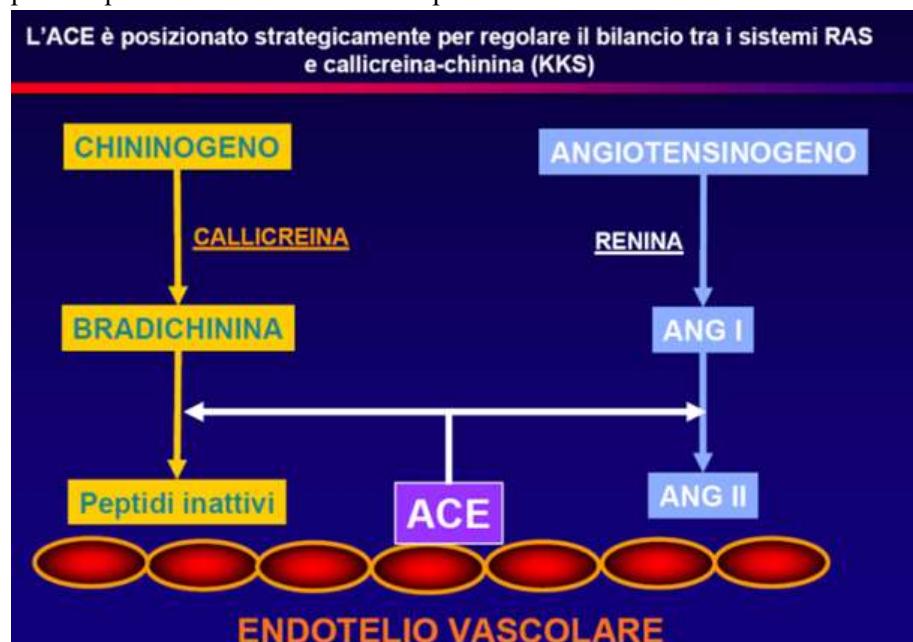
ACE-inibitori

Gli ACE I sono farmaci che agiscono sull'enzima, portano a un blocco dell'enzima riducendo la formazione di angiotensina II e dando un effetto ipotensivo. Sono i farmaci più utilizzati insieme ai sartani nel controllo dell'ipertensione arteriosa, attualmente in Italia sono approvati 14 farmaci ACE-inibitori. In generale questi farmaci mimano lo stato di transizione che si ha in seguito all'idrolisi dell'angiotensina I, principalmente legando lo zinco, che è l'elemento fondamentale con cui vanno ad interagire tutte e tre le classi di inibitori dell'ACE. Sulla base del gruppo chimico che dà il legame con lo zinco, inibendo l'enzima, si definiscono tre classi di ACE inibitori:

- Gruppo -SH (sulfidrilico). Il capostipite degli ACE inibitori sulfidrilici è il captopril. L'SH dà l'interazione più forte con lo zinco.
- Gruppo carbossilico. La maggior parte di essi ha il gruppo carbossilico esterificato e questo ne cambia anche la terminologia, quando si ha il gruppo carbossilato libero il suffisso è -aprilato, per esempio enalaprilato è quello in cui il gruppo COOH è libero, mentre quando è esterificato il suffisso è -april. L'isinopril fa razza per conto suo perché ha più gruppi carbossilato e più gruppi amminici, è un discorso a parte perché non ha bisogno di essere esterificato.
- Gruppo fosfinato dell'acido fosfinico. Il rappresentante di questa classe è il fosinopril, anche lui esterificato.

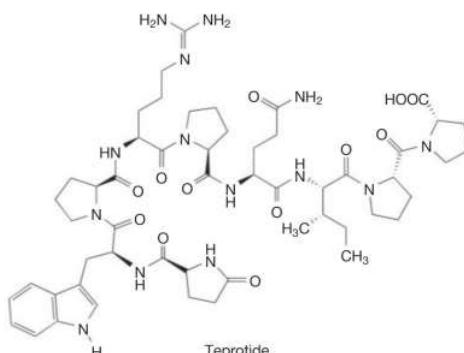


Come detto in precedenza l'ACE non è estremamente specifica, ha altri substrati, è stata vista la bradichinina e le sue azioni che a volte sono opposte a quelle dell'angiotensina II. La bradichinina deriva da un peptide, il chininogeno, che subisce una prima rottura proteolitica da parte della callicreina, che è il corrispettivo della renina sull'angiotensinogeno. Una volta formata, la bradichinina subisce una rottura proteolitica ulteriore da parte dell'ACE. Quando si blocca l'ACE aumenta la concentrazione di bradichinina, che non viene più idrolizzata, questa diminuzione del catabolismo della bradichinina a carico dell'inibizione dell'ACE produce un ulteriore vasodilatazione potenziando l'azione degli ACE inibitori e dando però broncocostrizione che si manifesta, soprattutto per chi ha problemi di asma e per chi deve aumentare il dosaggio, con tosse secca, che è il principale effetto collaterale di questo farmaco. Un altro effetto collaterale è l'aumento della sintesi di prostaglandine, che da una lato sono protettive a livello della mucosa gastrointestinale e controllano la vasodilatazione, ma sono anche mediatori del dolore e dell'infiammazione. I due sistemi sono strettamente correlati e bloccare l'enzima che li degrada ha degli effetti collaterali importanti, anche perché queste molecole sono molto potenti.



Quando si parla di peptidi si parla di molecole enormi, non dobbiamo sapere tutte e 14 le molecole in terapia, ma solo i meccanismi con cui agiscono, le relazioni gruppi-attività e da dove deriva la progettazione di queste molecole. Sono da sapere le strutture dei principali ACE inibitori: il captopril, l'isinopril, l'enalapril.

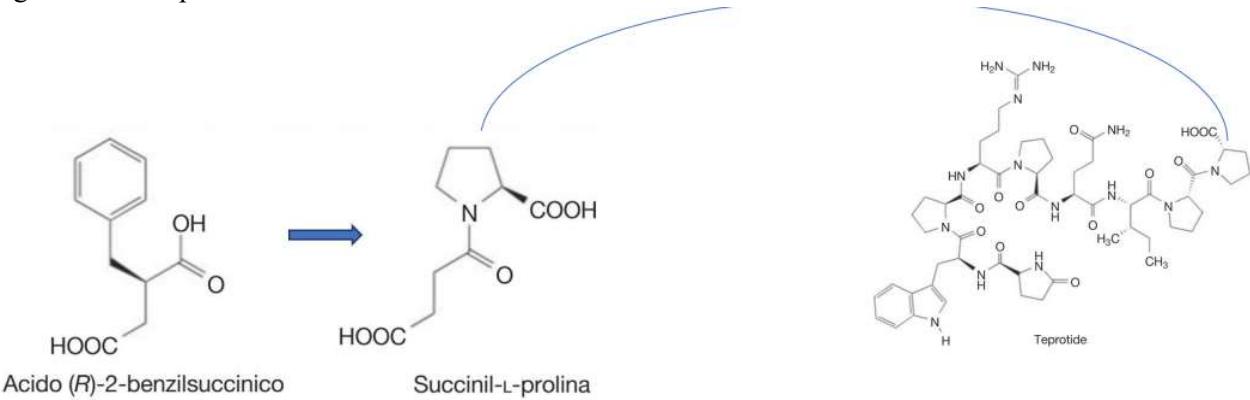
Progettazione del Captopril



5-oxo-Pro-Trp-Pro-Arg-Pro-Glu-Ile-Pro-Pro

Il Captopril è il primo ACE inibitore ad essere entrato in terapia, è una molecola semplice caratterizzata da un gruppo -SH e deriva dalla prolina. La progettazione risale agli anni '60, quando è stato isolato un peptide, il **teprotide**, estratto dal veleno di una vipera. Questo peptide è caratterizzato da degli aminoacidi particolari, per esempio una prolina che presenta un gruppo chetonico, ha quindi degli aminoacidi non classici, derivatizzati. La sua sequenza amminoacidica prevede la presenza nel terminale di alcune proline. Si è scoperto che questo teprotide potenziava l'azione della bradichinina andando a inibire l'enzima ACE attraverso un meccanismo di inibizione competitiva. Furono infatti isolati i principi attivi nel veleno e ci si accorse che l'azione di amplificazione dell'azione della bradichinina, quindi l'effetto ipotensivo, era mediata proprio da questo teprotide, una catena di 9 aminoacidi dove i due terminali sono delle proline. Nonostante la sua azione ipotensiva, come tutti i peptidi, non può essere usato come farmaco, le molecole con catene peptidiche hanno una scarsa biodisponibilità, quindi non è seguito un suo utilizzo in terapia (in più doveva per forza essere somministrato per via intramuscolare). Parallelamente alla scoperta di questo teprotide si stavano studiando anche le caratteristiche di un'altra carbossipeptidasi molto simile all'ACE, ma che ha la capacità di rompere il legame liberando un solo peptide, non un dipeptide come fa l'ACE, se un enzima deve liberare un unico frammento peptidico e l'altro invece un frammento peptidico più grande chiaramente il sito di interazione dell'idrolisi sarà diverso, perché uno deve accomodare i due peptidi terminali, mentre nell'altro caso solo un aminoacido. Sono due enzimi che agiscono in maniera analoga, ma che scindono catene peptidiche dando residui diversi. In particolare si stavano studiando dei substrati sulla carbossipeptidasi A e si è visto che l'acido (R)-2-benzilsuccinico era un buon substrato per la carbossipeptidasi A, mentre non lo era per l'ACE. Sulla base della struttura di questo acido benzilsuccinico si sono andati a vedere quali erano gli elementi strutturali importanti che invece davano l'inibizione dell'ACE, che in parte si conoscevano (era nota la presenza nel teprotide di due proline nell'ultima porzione). E' stata derivatizzata dall'acido benzilsuccinico un ibrido andando a inserire il gruppo della prolina e dando origine a un derivato ammidico, è stato eliminato il benzile e sull'acido è stato fatto l'ammide con la L-prolina ottenendo succinil-L-prolina, da qui si iniziava a vedere un miglioramento dell'azione ACE inibitoria. La succinil-L-prolina è molto semplice e molto meno potente del teprotide, però non è inattivo come l'acido benzilsuccinico. Si inizia a vedere, anche se debole, un'inibizione verso l'enzima che ci interessa, significa che la prolina ha contribuito alla inibizione dell'ACE.

meccanismo di inibizione competitiva. Furono infatti isolati i principi attivi nel veleno e ci si accorse che l'azione di amplificazione dell'azione della bradichinina, quindi l'effetto ipotensivo, era mediata proprio da questo teprotide, una catena di 9 aminoacidi dove i due terminali sono delle proline. Nonostante la sua azione ipotensiva, come tutti i peptidi, non può essere usato come farmaco, le molecole con catene peptidiche hanno una scarsa biodisponibilità, quindi non è seguito un suo utilizzo in terapia (in più doveva per forza essere somministrato per via intramuscolare). Parallelamente alla scoperta di questo teprotide si stavano studiando anche le caratteristiche di un'altra carbossipeptidasi molto simile all'ACE, ma che ha la capacità di rompere il legame liberando un solo peptide, non un dipeptide come fa l'ACE, se un enzima deve liberare un unico frammento peptidico e l'altro invece un frammento peptidico più grande chiaramente il sito di interazione dell'idrolisi sarà diverso, perché uno deve accomodare i due peptidi terminali, mentre nell'altro caso solo un aminoacido. Sono due enzimi che agiscono in maniera analoga, ma che scindono catene peptidiche dando residui diversi. In particolare si stavano studiando dei substrati sulla carbossipeptidasi A e si è visto che l'acido (R)-2-benzilsuccinico era un buon substrato per la carbossipeptidasi A, mentre non lo era per l'ACE. Sulla base della struttura di questo acido benzilsuccinico si sono andati a vedere quali erano gli elementi strutturali importanti che invece davano l'inibizione dell'ACE, che in parte si conoscevano (era nota la presenza nel teprotide di due proline nell'ultima porzione). E' stata derivatizzata dall'acido benzilsuccinico un ibrido andando a inserire il gruppo della prolina e dando origine a un derivato ammidico, è stato eliminato il benzile e sull'acido è stato fatto l'ammide con la L-prolina ottenendo succinil-L-prolina, da qui si iniziava a vedere un miglioramento dell'azione ACE inibitoria. La succinil-L-prolina è molto semplice e molto meno potente del teprotide, però non è inattivo come l'acido benzilsuccinico. Si inizia a vedere, anche se debole, un'inibizione verso l'enzima che ci interessa, significa che la prolina ha contribuito alla inibizione dell'ACE.

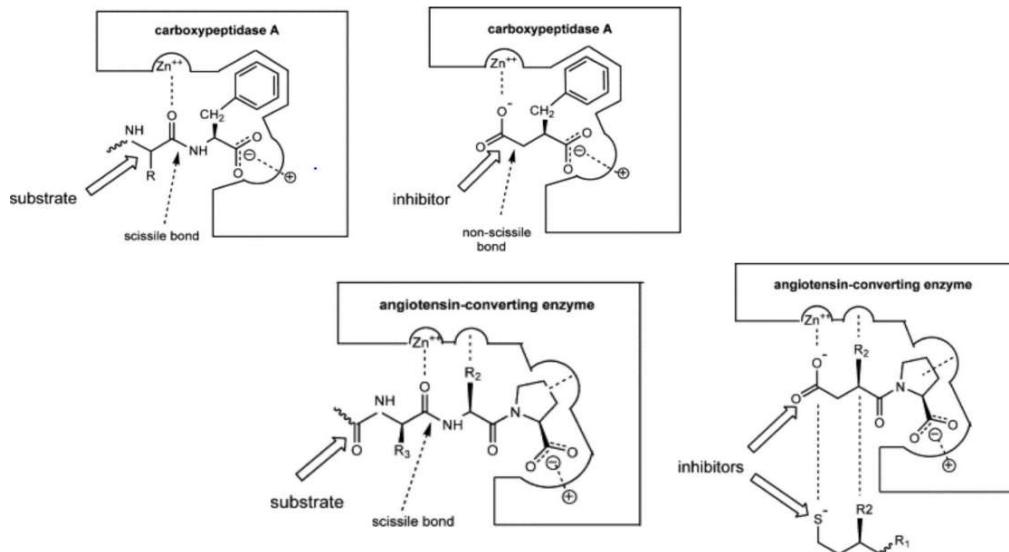


Acido (R)-2-benzilsuccinico

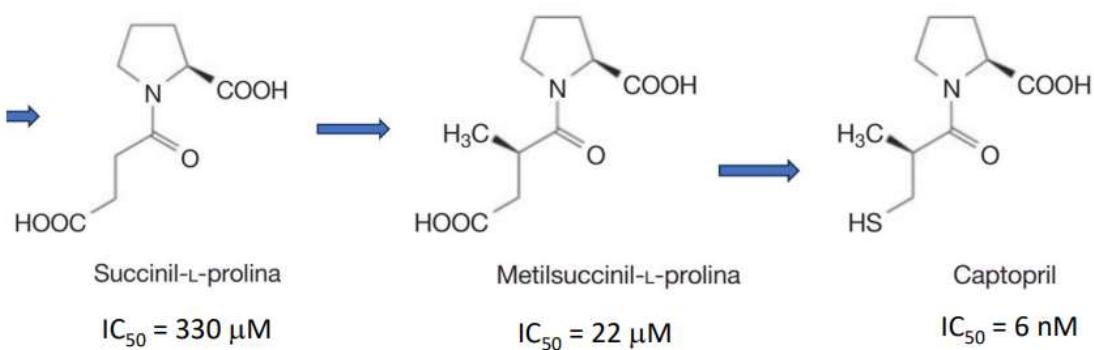
Succinil-L-prolina

Tutte e due le peptidasi, carbossipeptidasi A e ACE, sono caratterizzate da un sito importante per il legame con lo zinco e analogamente il carbossilato nell'amminoacido terminale viene accomodato in un sito cationico, in entrambi i casi si ha una tasca idrofobica che alloggia la fenilalanina. L'acido benzilsuccinico ha azione inibitoria verso la carbossipeptidasi A, ma non verso l'ACE, perché la distanza tra lo zinco e il sito anionico ovviamente è molto inferiore nella carbossipeptidasi rispetto all'ACE, perché uno scinde il legame con la fenilalanina, mentre l'altro scinde il legame peptidico rilasciando due gruppi amminoacidici, le distanze sono diverse. L'acido benzilsuccinico non ha alcuna azione inibitoria sull'ACE, mentre andando ad aumentare la distanza con la succinil prolina si inizia a vedere un miglioramento dell'attività.

Carbossipeptidasi A e ACE a confronto



Un miglioramento ulteriore dell'attività è stato dovuto all'inserimento sulla succinil-L-prolina di un metile in catena laterale, si ottiene metilsuccinil-L-prolina e si inizia ad avere un grande miglioramento dell'attività inibitoria, la potenza dell'inibitore è aumentata perché questo metile fa un'interazione ulteriore con un sito idrofobico. In questa molecola è presente un gruppo COOH terminale, che sicuramente può dare interazione con lo zinco, ma il migliore gruppo chelante per lo zinco è il gruppo sulfidrilico, il gruppo COOH è stato quindi sostituito con un gruppo sulfidrilico, ottenendo il captoril, il quale abbassa notevolmente l' IC_{50} ed è potentissimo, ha un IC_{50} nell'ordine del nano molare.



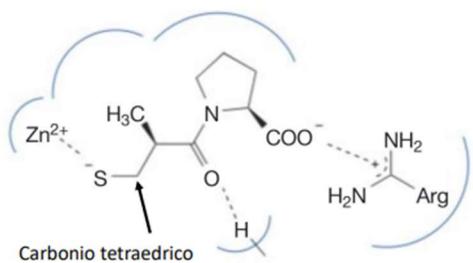
Riassumendo:

- La prolina è essenziale per l'attività e l'idea è nata dal veleno di una vipera.
- Il metile in catena laterale (che genera un ulteriore centro chirale) aumenta notevolmente la potenza inibitoria.
- L'inserimento di un gruppo -SH aumenta ulteriormente la potenza inibitoria, perché i tioli sono ottimi chelanti dello zinco.

Il captopril ha due centri chirali in configurazione S ed è circa venti volte più attivo del taptopride di partenza, è stato il primo ad entrare in terapia, ma non è il più utilizzato.

Come interagisce il Captopril con i residui importanti per l'interazione dell'angiotensina 1 con l'enzima ACE?

Meccanismo di Captopril



Gli ACE inibitori mimano lo stato di transizione tetraedrico dell'idrolisi peptidica e sono resistenti all'idrolisi.

Interazione del captopril con il sito catalitico di ACE:

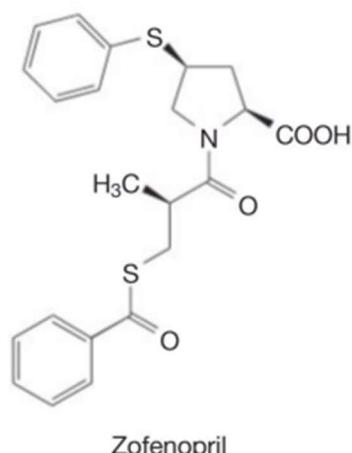
- legame ionico del carbossilato prolinico con il sito cationico (Arg o Lys),
- l'interazione idrofobica del nucleo prolinico con una tasca lipofila,
- l'interazione idrofobica del metile con una seconda tasca lipofila,
- un legame H del carbonile propionico con un donatore di legame H
- l'interazione del gruppo SH con lo ione Zn²⁺.

- Il gruppo carbossilato (in configurazione S) della prolina è uno dei legami più importanti del sito attivo.
- Un gruppo CH₃ in catena laterale dà un ulteriore interazione idrofobica con una seconda tasca lipofila. Per questo l'enzima deve essere di configurazione S e deve intercettare quella tasca che si trova in quella posizione.
- Infine, l'interazione del gruppo ionico solfidrilico con lo zinco del sito catalitico.

Effetti collaterali

Gli **effetti collaterali** principali sono rash cutanei e la perdita del senso del gusto. Entrambi sono effetti collaterali associati alla presenza del gruppo sulfidrilico. Quindi si è cercato di mascherare il gruppo sulfidrilico andando a derivatizzare il Captopril con un gruppo tioestere inserendo un gruppo benzoilico, cioè il gruppo rachidobenzoico.

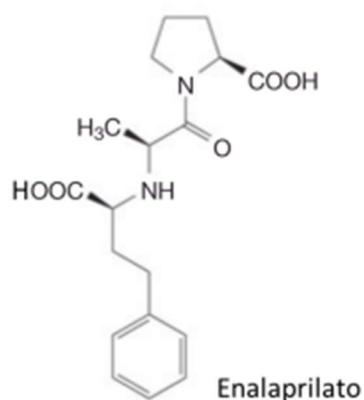
Il derivato è il **Zofenopril**, che non è attivo, è un profarmaco. In vivo il tioetere viene idrolizzato e si ripristina il gruppo sulfidrilico, che è importante per l'azione di complessazione con lo zinco. Questa non è l'unica modifica effettuata sul Zofenopril, poiché è stato introdotto in questa posizione un ulteriore tioetere legato ad un anello aromatico.



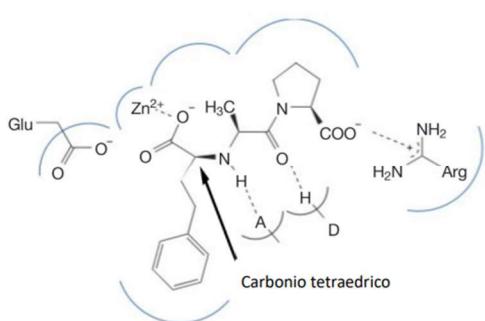
1) DERIVATI CARBOSSILICI

Come abbiamo visto nei derivati sulfidrilici, il gruppo SH è caratterizzato nel dare la maggiore potenza a questi derivati.

I derivati carbossilici sono stati ideati per gli effetti collaterali visti in presenza dei gruppi sulfidrilici. Per evitare questi effetti collaterali del Captopril si è pensato di reintrodurre il gruppo COOH, anch'esso chelante dello zinco, seppur meno del gruppo sulfidrilico. Il gruppo COOH però è meno potente nel tirare lo zinco. Quindi bisognava sopperire questa inferiore potenza chelante con altri gruppi in grado di interagire in altri siti dell'enzima e quindi bilanciare la minore potenza attraverso altre interazioni presenti nella molecola.



È stata progettata la molecola del **Enalaprilato**. Il suffisso *-prilato* si usa quando c'è un gruppo carbossilico non esterificato. Quando si esterifica questo gruppo carbossilico, e si fa un profarmaco questo si chiamerà *Enalapril*. Nonostante la minore efficacia chelante del gruppo -COOH rispetto al gruppo -SH nei confronti dello Zn²⁺, l'introduzione di altre porzioni molecolari in grado di interagire con siti dell'ACE, compensa questa minore efficacia chelante, e risulta 10 volte più potente del **Captopril** nell'inibire l'ACE.



Le interazioni dell'enalaprilato con ACE:

- legame ionico del -COO⁻ prolinico con il sito cationico (Arg),
- interazione idrofobica del nucleo prolinico con una tasca lipofila,
- interazione idrofobica del Me con una seconda tasca lipofila,
- un legame H del carbonile propionico con un donatore di legami H,
- interazione del gruppo -COO⁻ con lo ione Zn²⁺
- legame H tra l'NH e un accettore
- interazione lipofila del fenile con una tasca idrofobica che normalmente accoglie il fenile della Phe del substrato

Il gruppo -NH amminico dà un'ulteriore interazione con un accettore del legame H. Questa è un'interazione che non era presente nel Captopril.

In più c'è anche l'interazione del fenile nella tasca idrofobica, che normalmente alloggia il fenile della fenilalanina dell'angiotensina 1.

Il gruppo metile viene mantenuto, e ha la stessa importanza citata nel Captopril per l'interazione con una seconda tasca lipofila.

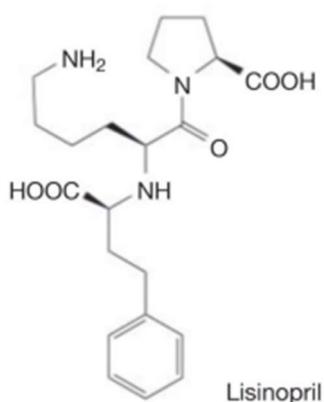
L'inserimento di questi ulteriori gruppi (-NH e fenetile) aumenta le interazioni con l'enzima e rende la potenza inibitoria più elevata.

L'enalaprilato (farmaco attivo) non si usa perché ha una bassa biodisponibilità, ma si usa il suo profarmaco etilesterile, l'**Enalapril**. In quest'ultimo ci sono 3 centri chirali, tutti di configurazione S (altrimenti non sarebbe possibile l'interazione con i vari siti del recettore): sulla prolina, in catena laterale e quello dato dall'inserimento del gruppo COOH.

I derivati carbossilici (Enalaprilato) hanno una durata d'azione più lunga e non hanno gli effetti collaterali legati al gruppo sulfidrilico. Dalla scoperta dell'Enalapril c'è stata una apertura verso la progettazione di molti inibitori ACE; infatti, ora in commercio sono ben 14 ACE-inibitori.

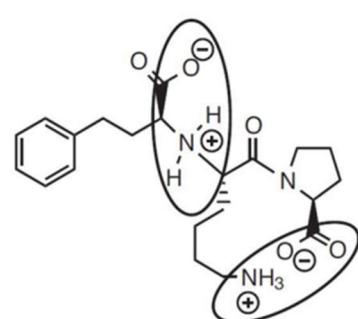
Dal punto di vista della biodisponibilità un risultato importante si è ottenuto con **Lisinopril** (uno degli antiipertensivi più prescritti).

Questo è identico all'Enalaprilato ma al posto del sostituente metilico c'è una butilammina.



Questo è l'unico caso in cui non abbiamo una derivatizzazione del -COOH (non si ha il lisinoprilato, il gruppo carbossilico è libero), perché la molecola contiene due gruppi amminici e due gruppi carbossilici. La contemporanea presenza di due gruppi COOH e di due centri basici amminici favorisce la formazione di un legame ionico intramolecolare (la catena butilamminica è flessibile), formando un **doppio zwitterione** (uno tra butilammina e -COOH della prolina e l'altro con l'altro gruppo amminico e il carbossilico adiacente), che è molto idrofilo, ma globalmente neutro (la formazione dello zwitterione è come se si coprissero i gruppi idrofili) ed è assorbito a livello gastrointestinale poiché attraversa facilmente il doppio strato lipidico.

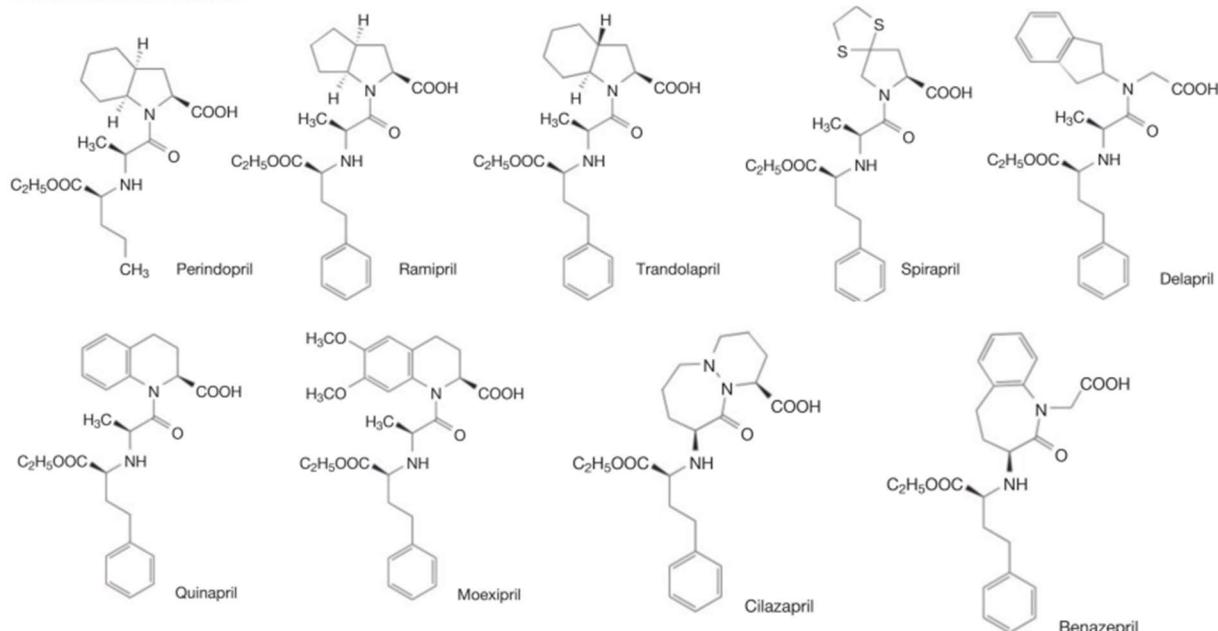
In termini di solubilità il Lisinopril è molto idrofilo ma, nonostante ciò, è attivo per via orale al contrario dell'Enalaprilato.



Quindi il secondo gruppo carbossilico non si può derivatizzare perché si andrebbe a perdere il secondo zwitterione. Si avrebbe una carica positiva che cambierebbe le caratteristiche di assorbimento.

Questi sono tutti derivati carbossilici esterificati (in forma di etilestere). Sono tutti profarmaci (-pril).

ACEI Carbossilici

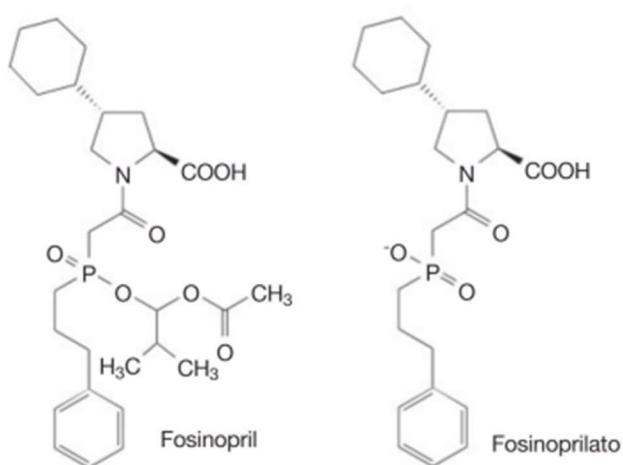


Dal punto di vista del sostituente prolinico, non è indispensabile che ci sia una prolina. È fondamentale che ci sia il -COOH, ma la pirrolidina può essere fusa con vari anelli, oppure non necessariamente il -COOH è legato a un anello:

- (a) **pirrolidine fuse con un altro anello** (per es. *perindopril*, *ramipril*, *trandolapril* e *spirapril*, nel quale è presente un anello spiranico sulla pirrolidina)
- (b) **cicli non pirrolidinici** (per es. *moexipril*, *quinapril*, *benazepril*, *delapril* e *cilazapril*).

2) DERIVATI FOSFINICI

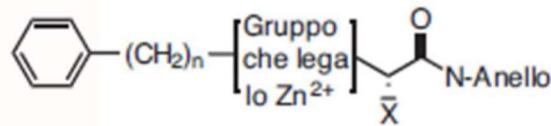
Al posto del gruppo -COOH si può avere un gruppo fosfinico, derivato del fosforo. Anche in questo caso il fosfinato non viene utilizzato come tale ma viene derivatizzato come profarmaco. Quindi il **Fosinoprilato**, cioè il derivato fosfinico di terapia, viene derivatizzato per essere somministrato ed avere una buona biodisponibilità in forma di **Fosinopril**. In vivo si ripristina il Fosinoprilato. Per rendere la molecola più lipofila sulla pirrolidina è stato inserito un ciclosile.



Ricapitoliamo in generale la struttura degli ACEI inibitori, individuando le varie zone importanti per l'interazione con l'enzima ACE.

SAR degli ACEI

- Il gruppo legante lo zinco può essere: (A) **sulfidrilico**, (B) **carbossilico** o (C) **fosfinico**.
- L'anello azotato deve contenere un acido carbossilico per il legame al sito cationico di ACE. Di solito è la prolina ma può essere vario.
- Grandi anelli eterociclici nella porzione eterociclica azotata aumentano la potenza e alterano la farmacocinetica
- Il gruppo -SH mostra superiore affinità di legame per Zn^{2+} .
- Composti contenenti -SH producono una elevata incidenza di eruzioni cutanee e perdita del gusto. Essi possono anche formare disolfuri e dimeri che possono abbreviare la durata d'azione.
- Il legame di Zn^{2+} con un carbossilato o fosfinato ($O = P-OH$) mima lo stato di transizione dell'idrolisi del peptide.
- X è di solito un gruppo metile.
- L'esterificazione del carbossilato o fosfinato produce profarmaci biodisponibili per via orale. In questo caso la nomenclatura indica con il suffisso **-pril** l'estere profarmaco e con **-prilat** il farmaco attivo.



Nel 2003 la cristallografia a raggi X ha permesso di vedere direttamente il legame tra ACE e Lisinopril. Si è scoperto che in realtà c'è una lisina invece di un'arginina; quindi, si ha un nuovo legame tra il COOH sulla prolina e tra l'arginina.

Proprietà chimico-fisiche e farmacocinetiche

- Tutti gli ACEI sono anfoteri tranne Captopril e Fosinopril che sono acidi. Questo significa che sono solubili sia in acidi che in basi.
- L'acido carbossilico legato all'anello azotato ha un intervallo di $pK_a = 2.5-3.5$ ed è ionizzato a pH fisiologico.
- Il secondo gruppo carbossilico presente nella classe dei dicarbossilati è ionizzato solo nella forma attiva, ma non quando il carbossile è derivatizzato in forma di estere nel profarmaco.
- Tutti possiedono una buona liposolubilità., tranne Lisonopril, che sembra il più idrofilo di tutti i composti, ma la formazione dei due zwitterioni maschera i due gruppi ionizzanti.

Metabolismo

- Per la presenza nel Captopril del gruppo sulfidrilico la molecola può dare dimerizzazione, cioè forma un legame disolfuro tra due gruppi sulfidrilici. Il legame disolfuro si può ottenere per coniugazioine del gruppo sulfidrilico con una cisteina, formando **Captopril- Cisteina disolfuro**. Sia in forma di dimero che con la cisteina il composto si inattiva.
- L'isinopril e l'acido ACE non subiscono metabolismo, sono escreti come tali.
- Alcune di queste molecole, come il Fosinopril, subiscono glucurononconjugazione a livello dell'acido carbossilico.
- Alcune molecole, come il Ramipril, per la presenza sia del gruppo carbossilico che amminico, possono subire ciclizzazione intramolecolare trasformandosi in **dichetopiperazine**, metaboliti inattivi.

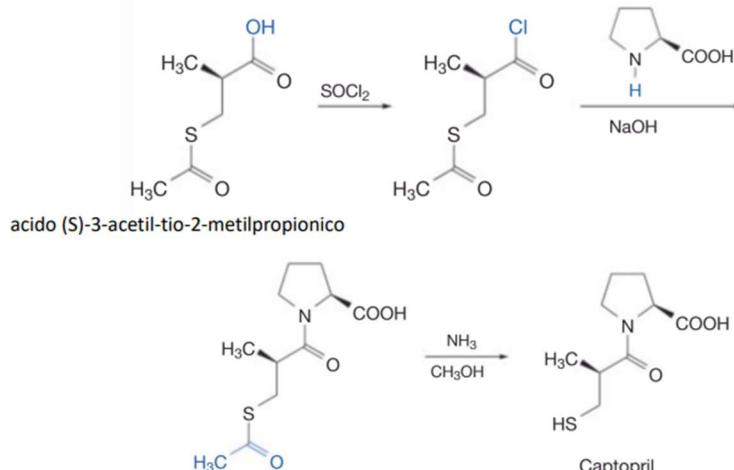
Quindi a parte l'idrolisi degli esteri da Pril a Prilat, che porta a composti attivi, tutto il resto del metabolismo porta a composti inattivi.

ACE INIBITORI

Sintesi Captopril

Si parte dall'acido acetiltiometilpropionico (tio perché è presente un gruppo SH che viene esterificato con l'acetile). Deve essere attivato con cloruro di tionile: si fa, quindi, il corrispondente cloruro acilico che viene fatto reagire con la L-prolina. Si utilizza una base che serve a spostare la reazione verso destra per la formazione dell'HCl. Questo acetile viene messo sul sulfidrile per proteggerlo, perché non dia reazioni collaterali nel momento in cui si forma il cloruro acilico, che potrebbe reagire con il tiolo per dare il tioestere.

Sintesi del CAPTOPRIL



Poi l'acetile deve essere eliminato. La deacetilazione viene fatta in ambiente di ammoniaca metanolica. Si ottiene così il Captopril.

ANTAGONISTI DEL RECETTORE DELL'ANGIOTENSINA II: SARTANI

Essi sono la seconda classe di composti che agiscono sul sistema renina-angiotensina. Sono gli antagonisti competitivi dei recettori attivati dall'angiotensina II. Vengono anche chiamati **Sartani** (tutte queste molecole hanno, infatti, il nome che termina con il suffisso -sartan). Oppure vengono definiti con l'acronimo ARB (Angiotensin Receptor Blockers).

Attualmente sono stati individuati 4 sottotipi recettoriali che hanno la capacità di legare l'angiotensina II. Dei vari sottotipi recettoriali, AT₁ e AT₂ sono quelli maggiormente studiati. In particolare, l'AT₁ è quello su cui vanno selettivamente ad agire i Sartani. Il recettore AT₁ è accoppiato a proteina Gq. Questi recettori AT₁ sono diffusi a livello cerebrale, vascolare (dove mediano la vasocostrizione), a livello renale, neuronale (perché c'è la mediazione del sistema simpatico), a livello epatico, a livello surrenale e sono anche a livello cardiaco. Li troviamo in tutti gli organi su cui l'angiotensina II esplica degli effetti.

Recettori AT₁

Quando l'**angiotensina II** interagisce con il **recettore AT₁**, questa interazione è quella che media maggiormente la **vasocostrizione**. L'angiotensina II ha un effetto di **aumentare la secrezione di aldosterone**; non è l'unico ormone su cui va ad agire, ma va ad agire anche sulla **secrezione dell'ormone peptidico vasopressina (ADH)**. L'angiotensina II, inoltre, è importante nel mediare il **riassorbimento del Na⁺ dal tubulo prossimale**, il **rilascio di catecolammime a livello neuronale**. Ha anche un **effetto negativo nel rimodellamento del ventricolo sinistro** in seguito ad averti quali l'infarto.

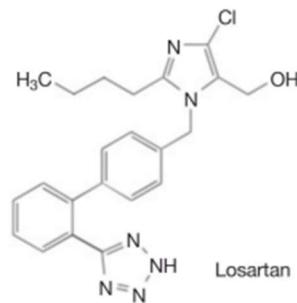
Recettori AT₂

Accanto ai recettori AT₁ ci sono i **recettori AT₂** che svolgono un **effetto più protettivo**: mediane principalmente **cardioprotezione, vasodilatazione, rilascio di ossido nitrico** (che è un vasodilatatore), hanno un effetto protettivo a livello cardiaco, cioè portano ad una **regressione dell'ipertrofia in seguito a infarto del miocardio**.

Quindi la cosa importante nella progettazione degli antagonisti del recettore dell'angiotensina II è avere degli antagonisti selettivi nei confronti del recettore AT₁ in modo da mantenere gli effetti protettivi, soprattutto a livello cardiaco, mediati dal recettore AT₂.

Tutti i farmaci che verranno trattati sono degli antagonisti competitivi.

Il primo farmaco che è entrato in terapia come antagonista competitivo dei recettori AT₁ dell'angiotensina II è stato il **LOSARTAN**, ancora ampiamente usato in terapia (forse il più usato). È in terapia dal 1995. È caratterizzato da un anello imidazolico, legato a un difenile, legato ad un tetrazolo. Tutte queste componenti della struttura non sono indispensabili e possono essere sostituite.



Progettazione di queste molecole

Siccome l'angiotensina II è un peptide (in particolare ha 8 amminoacidi) la prima cosa che si è fatta è stata quella di andare a studiare la ricaduta che ha la sostituzione di alcuni di questi amminoacidi.

In particolare, la molecola che aveva dato origine ai migliori risultati come derivato peptidico è stata la **SARALASINA**. “Sar” viene da Sarcosina: al primo amminoacido della catena dell'angiotensina II (un Asp) è stata sostituita la sarcosina, che è una glicina metilata.

Asp¹—Arg—Val—Tyr⁴—Ile⁵—His⁶—Pro—Phe⁸
Angiotensina II

Sar—Arg—Val—Tyr—Ile—His—Pro—Ala
Saralasina

All'ultimo amminoacido dell'angiotensina II (che è la Phe) è stata sostituita una Ala. Il nome della molecola è, quindi, dato da Sar + Ala + sina, perché ho sostituito la sarcosina e l'alanina.

Questa molecola è un octapeptide.

Facendo queste modifiche si è osservata una diminuzione dell'azione dell'angiotensina II, però rimane sempre una debole azione. Quindi è un agonista parziale, seppure con un'attività intrinseca bassa. C'è poi un altro problema: come tutti i peptidi, ha una bassissima biodisponibilità; la somministrazione doveva avvenire per via intravenosa. Quindi non poteva essere un farmaco.

Dalla Saralasina sono stati sviluppati vari peptido-mimetici. Da tutti questi studi di SAR su molecole che non peptidiche ma peptido-mimetiche è emerso un residuo molto interessante: un benzilimidazolo sostituito sul benzile con un gruppo elettron-attrattore (un gruppo nitro), con un gruppo acetile e un Cl sull'imidazolo e con una catena butilica. Questa è stata la struttura lead. Non è mai diventato un farmaco, ha ancora una sigla come nome (S-8308).

Questo peptido-mimetico aveva la caratteristica di avere, seppure debole, un antagonismo. Era, quindi, privo di agonismo parziale.

Questo è stato il punto di partenza per due diverse strade:

1. la progettazione dei derivati analoghi al Losartan, caratterizzati sempre dall'anello imidazolico sostituito e legato ad un difeniltetrazolo;
2. la progettazione di derivati che mantengono un unico anello aromatico sostituito con gruppi quali ad esempio il gruppo carbossilico.

Il **residuo minimo** importante per la progettazione di queste due classi (tutte e due chiamate Sartani) è il **residuo benzilacetilimidazolico**.

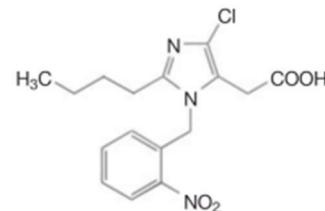
Tale residuo benzilacetilimidazolico deve avere dei gruppi che mimano l'interazione di alcuni amminoacidi dell'angiotensina con il recettore AT₁. Questo è il **farmacoforo minimo**, che poi viene decorato con le due differenti strade.

Precisamente questo residuo minimo 5-acetil-1-benzilimidazolico cosa mima?

L'angiotensina II ha questi gruppi: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe.

- La catena butilica (quindi idrofobica) mima la catena laterale dell'isoleucina, che è in posizione 5 del peptide.
- L'anello aromatico mima l'anello aromatico della tirosina (il fenolo), in posizione 4 della catena peptidica.
- L'anello imidazolico mima l'anello imidazolico dell'His in posizione 6 dell'angiotensina.
- Infine, ho un gruppo acetile che deve mimare il terminale carbossilato dell'angiotensina, che appartiene all'amminoacido Phe.

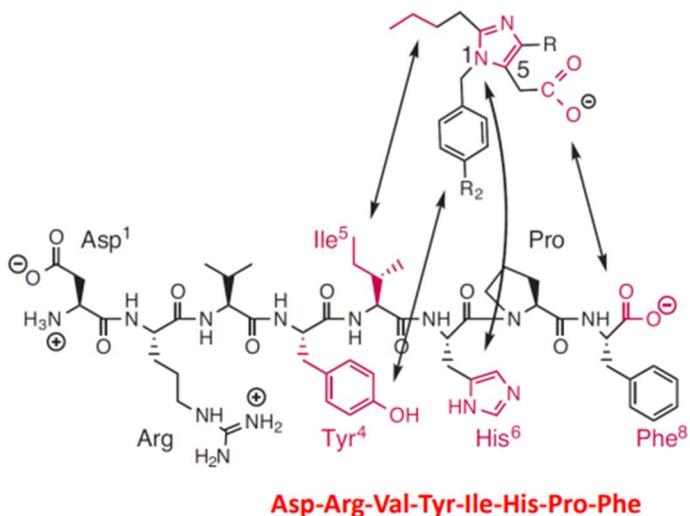
Quindi i residui amminoacidici importanti mimati da questo residuo minimo benzil-5-acetilimidazolico sono: Tyr 4, Ile 5, His 6, Phe 8.



Debole antagonista AT1

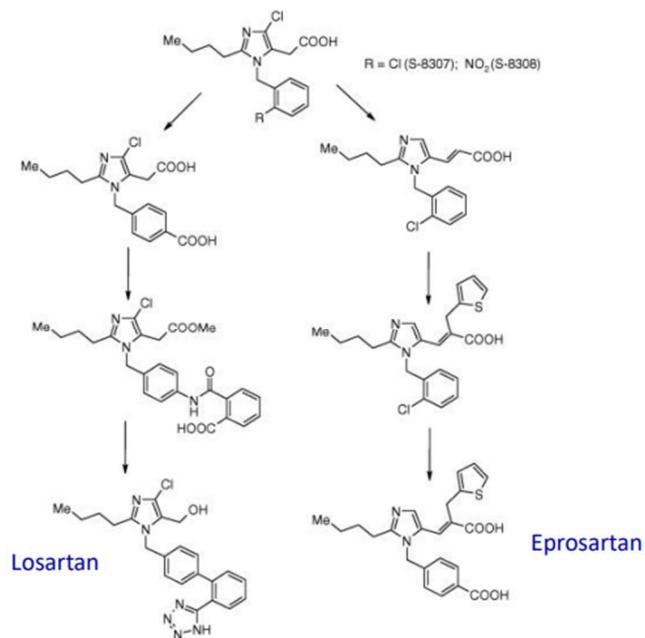
S-8308

Farmacoforo 1-benzil-5-acetyl imidazolo



Dal precursore, che è stato il lead ma non è mai stato usato come farmaco, si sono separate due strade. Un'azienda farmaceutica ha lavorato su dei derivati difenilici portando al Losartan; un'altra azienda (giapponese), invece, si è concentrata maggiormente sull'anello aromatico e sui sostituenti della posizione 2 dell'anello imidazolico.

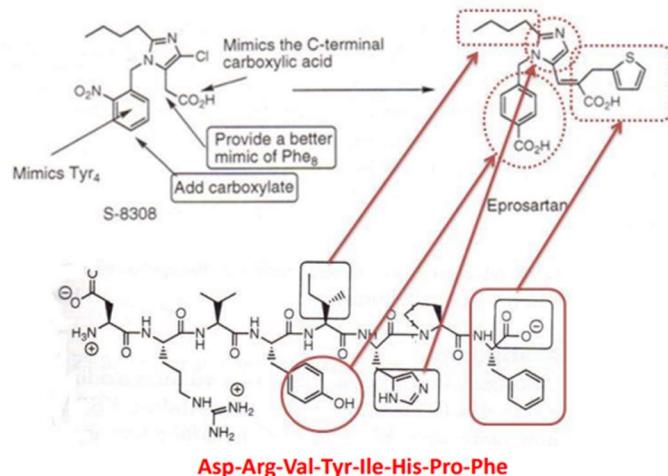
In particolare, da questi studi su questo residuo minimo sono stati progettati, attraverso una serie di cascate di modifiche strutturali, il Losartan e l'Eprosartan. Nel primo caso vengono mantenuti l'imidazolo, la catena butilamminica, il sostitutente aromatico ma c'è un fenile con un tetrazolo; invece nell'Eprosartan non c'è il secondo fenile del difenile ma abbiamo soltanto un anello aromatlico sostituito con un gruppo carbossilico. Viene modificata la catena che sostituisce l'imidazolo in posizione 2 con un gruppo carbossilico (che è α,β -insaturo) che termina con un tiofene.



Confronto tra le due molecole

L'attività dell'Eprosartan fa capire che non è indispensabile la struttura difenile-tetrazolica. È importante, però, in questi derivati l'imidazolo sostituito con un benzile e con una catena butilica, propilica o eterea.

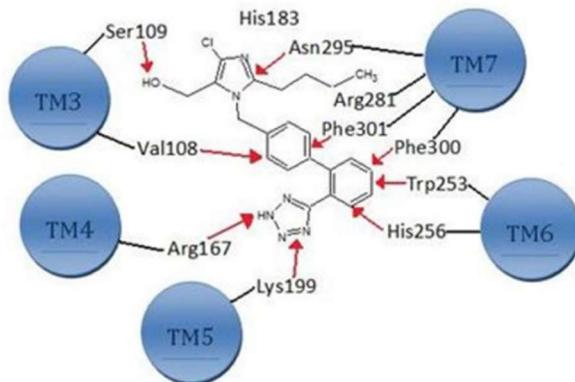
Anche l'Eprosartan, analogamente a quanto visto prima, dà le interazioni analoghe a quelle dell'Ile, della Tyr, della Pro e della Phe terminale dell'angiotensina II. Ritrovo tutti i gruppi presenti che mimano l'interazione di questa porzione dell'angiotensina II con il suo recettore.



Tutto sempre a partire da quel precursore S-8308 che contiene il farmacoforo minimo per questo antagonismo.

Il Losartan ha un gruppo alcolico sull'imidazolo che dà un'interazione con una Ser. Il tetrazolo, che è un gruppo acido, dà interazione con un'Arg e una Lys. Uno dei due difenili dà interazioni π - π con degli amminoacidi aromatici, in particolare Phe, Trp e His. La stessa cosa vale per l'altro residuo aromatico, che interagisce con una Phe. Il principale amminoacido con cui interagirebbe l'anello imidazolico è un'asparagina.

È un recettore accoppiato a proteina G, quindi nell'immagine sono rappresentati i domini transmembrana che contengono gli amminoacidi principali per l'interazione.



SAR

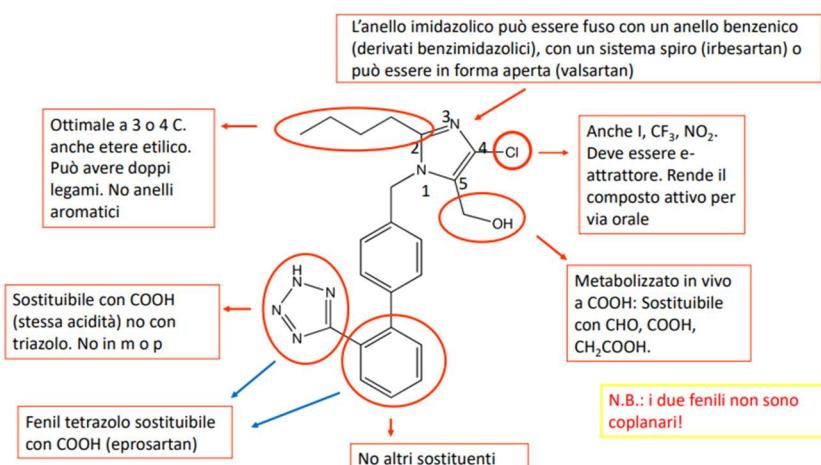
Le SAR vengono analizzate sul Losartan, ma anche i derivati non difenil-tetrazolici hanno ugualmente attività.

L'atomo di Cl presente sul Losartan può essere sostituito con altri alogeni, ad esempio I, CF_3 o altri gruppi elettron-attrattori tipo il gruppo nitro.

La presenza di questi sostituenti aumenta la biodisponibilità del farmaco e quindi permettono l'assunzione per via orale.

L'anello imidazolico è molto importante, può essere fuso con altri anelli: per esempio posso sostituirlo con un benzoimidazolo. Lo posso anche aprire. L'unico derivato aperto è il Valsartan.

Nel caso specifico del Losartan è presente in posizione 5 dell'imidazolo un CH_2OH . Esso è metabolizzato in vivo: viene ossidato a gruppo carbossilico. Però è attivo anche come gruppo OH, quindi non è tanto corretto dire che il Losartan è un profarmaco. È più



corretto dire che ha un metabolita carbossilato attivo. Può essere sostituito con un'aldeide che a sua volta viene ossidata, oppure con un gruppo carbossilico perché anche il carbossilico è attivo.

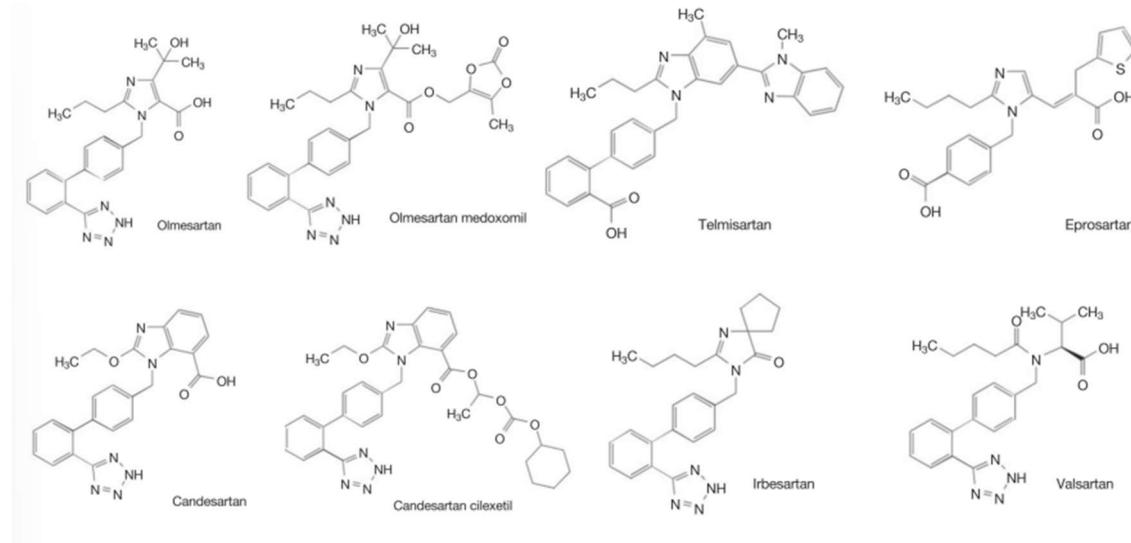
La catena a 3 e a 4 è la migliore, quindi propilica e butilica. Ci sono dei casi in cui abbiamo una catena di etere etilico. È una catena idrofobica che può contenere anche dei doppi legami, non possono essere inseriti degli anelli aromatici perché creerebbero troppo ingombro sterico. Quindi deve essere una catena lineare.

Il difenile non può essere sostituito con altri gruppi aromatici bioisosteri; non può avere altri sostituenti sull'anello. L'unico sostituente in orto è il tetrazolo, che non si può sostituire con un triazolo ma si può fare una sostituzione bioisosterica del tetrazolo con un gruppo COOH. Tetrazolo e gruppo COOH sono, infatti, due gruppi acidi: ovviamente l'acido carbossilico è più acido, ma funziona anche il tetrazolo pur avendo un'acidità inferiore.

Infine, il feniltetrazolo non è indispensabile. Questo è evidente nell'Eprosartan perché al posto dei due anelli in questa posizione c'è semplicemente un gruppo carbossilico. Quindi si ha una classe di difeniltetrazoli e una di fenili sostituiti con un COOH.

La presenza di sostuenti in orto, sia che sia un tetrazolo sia che sia un gruppo carbossilico, fa sì che i due anelli aromatici non siano complanari ma siano ripiegati.

Le molecole principali (da sapere) sono il Losartan e l'Eposartan, ma esistono in terapia tantissimi antiipertensivi. Sono stati fatti dei profarmaci in cui si è derivatizzato il gruppo carbossilico con acidi grassi in modo da rendere la molecola più lipofila e più disponibile. Quello che ha l'anello imidazolico aperto è il Valsartsan, mentre tutti gli altri contengono degli imidazoli o dei benzoimidazoli.



Proprietà chimico-fisiche e farmacocinetiche

L'anello tetrazolico è acido, quindi può essere sostituito bioisostericamente con un gruppo carbossilico. L'anello tetrazolico ha chiaramente una pK_a più alta rispetto al gruppo carbossilico ($pK_a = 6$).

Sono ionizzati a pH fisiologico, questo è un aspetto importante per l'attività.

In generale i derivati con il tetrazolo hanno una maggiore affinità nei confronti del recettore AT₁ e sono più lipofili rispetto ai derivati carbossilati.

Quelli che hanno una migliore biodisponibilità sono l'Irbesartan e il Telmisartan.

Questi farmaci sono eliminati prevalentemente con le feci, eccetto l'Olmesartan.

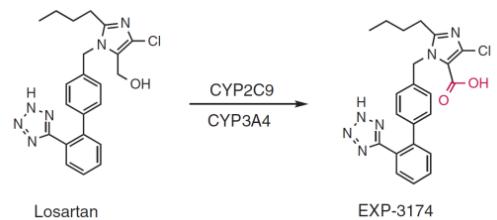
Piccolo recap dei SAR:

E' corretto chiamare i bloccanti del recettore AT1 antagonisti competitivi del recettore AT1. Il bioisosterismo di tetrazolo e acido carbossilico non è classico, ma particolare, ed è dipendente dal fatto che tutti e due i gruppi hanno caratteristiche acide. L'anello tetrazolico che può essere sostituito ha una pKa intorno a 6, e i gruppi carbossilici hanno una pKa più bassa. L'anello tetrazolico rende ragione di una maggiore attività per il sito recettoriale. Il gruppo COOH rende conto di una maggior idrofilia rispetto al tetrazolo, ma il bilanciamento lipofilia-idrofilia permette ugualmente un'accettabile farmacocinetica anche di quelli che non possiedono il tetrazolo stesso.

I migliori come biodisponibilità sono Irbesartan e Telmisartan. Il farmaco maggiormente usato è rappresentato dal prototipo, il Losartan, e normalmente vengono assunti con una/due dosi giornaliere. Sono escreti attraverso le feci.

Metabolismo sartani

Il metabolismo è di tipo ossidativo. Losartan ha un gruppo CH₂OH in catena come sostituente dell'imidazolo, e subisce un'ossidazione metabolica a carico di enzimi del gruppo del citocromo. Non si può dire che sia un profarmaco, poiché sia con il gruppo idrossi che COOH i farmaci sono ugualmente attivi, cioè in seguito a metabolismo ossidativo si ottiene un farmaco ugualmente attivo a Losartan, ma siccome quest'ultimo è già attivo non si può dire che si tratti solo di un profarmaco. La metabolizzazione non porta a metaboliti inattivi, ma attivi.



Quelli derivatizzati come esteri invece sono sia il Candesartan che Olmesartan e come tali non sono attivi, ma aumentano la lipofilia e l'assorbimento, e sono derivatizzati anche con gruppi carbossilici piuttosto ingombranti e lipofili, e devono essere idrolizzati per rendere poi il farmaco attivo. Questo avviene principalmente tramite esterasi della parete intestinale.

Tutti gli altri ARB (Irbesartan, Telmisartan ed Eprosartan) per la maggior parte vengono eliminati senza grossi interventi metabolici. L'Eprosartan ha una delle caratteristiche diverse dal Losartan, ovvero possiede solo un gruppo dell'acido benzoico. In questo caso vengono escreti e trasformati in glucuronidi.

Impieghi terapeutici antagonisti AT1

Gli antagonisti AT1 vengono somministrati anche da soli, ma possono essere somministrati anche in presenza di:

- inibitori ACE, quindi ottenendo un effetto sinergico
- beta bloccanti, in generale con bisoprololo
- diuretici (es. furosemide)
- calcio-antagonisti.

Che vantaggio hanno rispetto ai derivati pril e prilat?

I derivati pril e prilat andando ad avere un'azione sull'ACE avevano effetti collaterali dovuti alla non degradazione della bradichinina. Questi antagonisti AT1 invece, non agendo su quel percorso, perché sono diretti già all'azione dell'angiotensina II, hanno il vantaggio di notare la broncocostrizione, che è l'effetto collaterale prevalente visto per l'altra classe.

Infine, alcuni di essi sono usati anche in via preventiva sia per ridurre l'infarto del miocardio e l'ictus in pazienti a rischio (Telmisartan), e anche per l'ipertrofia ventricolare sinistra (Losartan), perché diminuiscono anche l'azione di rimodellamento delle cellule cardiache prodotta dall'angiotensina II. Questo effetto sul sistema renina-angiotensina è usato anche nelle nefropatie genetiche e nel diabete di tipo 2 (Irbesartan e Iosartan), quindi hanno anche un ampio impiego terapeutico.

Inibitori della renina

La renina agisce degradando l'angiotensinogeno e formando il betapeptide angiotensina I, e agisce a livello del legame ammidico tra leucina e valina nella catena dell'angiotensinogeno. Nel caso specifico la leucina diventa l'amminoacido carbossiterminale dell'angiotensina I. Questo primo step è lo step limitante nella via di informazione dell'angiotensina II, ed è anche molto specifico come passaggio, poiché la renina ha come substrato solo l'angiotensinogeno. Essa viene regolata sia dalla concentrazione di sodio, ma anche dall'aumento pressorio. Avere prime ricerche sono state focalizzate sulla modificazione del peptide angiotensinogeno per trovare il più corto peptide che fa sì che la renina riconosca l'angiotensinogeno come substrato. Il peptide minimo è rappresentato dalla porzione 6-13 dell'angiotensinogeno, la quale comprende l'amminoacido 6. E' stato sviluppato un ottapeptide in cui sono stati modificati i due aminoacidi terminali dell'angiotensinogeno, in particolare la parte terminale con una leucina—l'ottapeptide è stato ulteriormente modificato andando ad inserire dei gruppi di aminoacidi nel posto del residuo leucina-leucina. Andando a fare questa ulteriore modifica si è ottenuto il primo inibitore della renina, il quale si chiama pepstatina.

La pepstatina è un derivato medico un po' più stabile rispetto al prototipo iniziale, ma anche in questo caso non è somministrabile per os, ma la sua efficacia si vede solo mediante somministrazione per via parenterale. È stato però il punto di partenza per molte industrie farmaceutiche, le quali hanno prodotto tanti peptidomimetici sulla base di un residuo

peptidomimetico identificato come cruciale per l'inibizione della renina. Questo tempiato peptidomimetico cruciale ha varie caratteristiche: un legame ammidico legato a una catena butilica, 4 centri chirali, un gruppo basico amminico e un gruppo alcolico sulla catena. Questo è stato il punto di partenza per la progettazione di tutti questi inibitori della renina a struttura non peptidica, ma peptidomimetica, come l'Enalkiren, Remikiren e Zankiren. Questi non sono più usati in terapia. L'unico che è usato in terapia, ed è basato su questo tempiato non peptidico è l'Aliskiren, il quale ha una buona biodisponibilità, ed è un farmaco molto recente che è stato introdotto nel 2007.

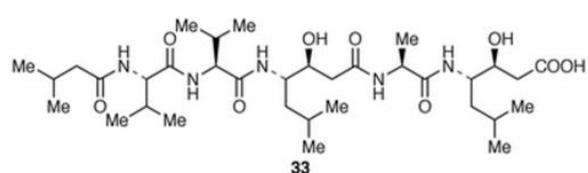
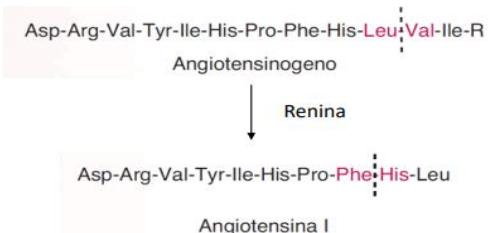
Nella foto a destra si vede cosa è stato fatto per ottenere un aumento di biodisponibilità.

La cosa più importante è stata il sostituente X. I centri chirali sono tutti in configurazione S, il gruppo X è rappresentato da un anello aromatico sostituito da due gruppi eterei, e

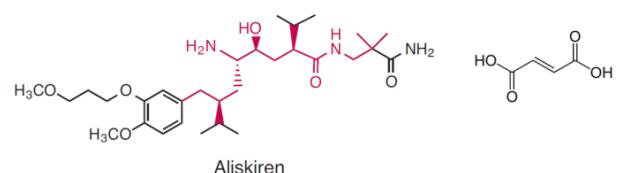
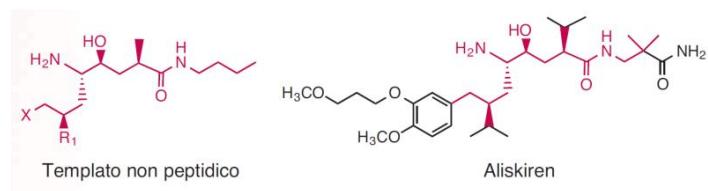
cioè un gruppo metossilico e un etere a più lunga catena. Un altro aspetto importante è l'inserimento nella posizione R1 di un gruppo isopropile, il quale è inserito anche per ragioni sintetiche sull'altro centro chirale vicino al carbonile, e infine si vede la catena butilica legata al gruppo ammidico che presenta un ulteriore gruppo ammidico.

L'Aliskiren viene somministrato in forma di emifumarato, poiché ha un gruppo amminico, il quale viene salificato con l'acido fumarico. L'acido fumarico è bicarbossilico, e quindi emifumarato perché viene salificato solo con uno dei gruppi carbossilici. Contiene quattro centri chirali ($2S$, $4S$, $5S$, $7S$) tutti in configurazione S.

L'Aliskiren normalmente viene somministrato con un diuretico, e rispetto agli altri ACE inibitori e ai blocanti del recettore dell'angiotensina II, non causa un aumento compensatorio di renina nel plasma. Le



PEPSTATINA



altre due classi invece abbassando la pressione arteriosa e non essendo inibitori della renina danno spesso un effetto compensatorio, cioè di aumento della produzione di renina che potrebbe essere a livello renale negativo. L'A lisikren invece essendo già un inibitore della renina non dà questo effetto collaterale.

Proprietà chimico-fisiche e farmacocinetiche

Metabolismo

L'A lisikren viene escreto per la maggior parte inalterato. I principali metaboliti derivano dalla demetilazione del metossile in posizione para, per ossidrila zione della catena laterale alchilica, e successiva ossidazione dell'alcol fino ad acido carbossilico.

Applicazioni cliniche

Rientra tra i farmaci ipertensivi, di solito viene somministrato da solo, ma anche in combinazione con idroclorotiazide, ma anche con il calcio-antagonista, oppure con sartano. Anche in questo caso è indicato per ridurre l'ipertrofia ventricolare sinistra, e ha un effetto protettivo sulla funzionalità renale e tra gli impieghi terapeutici è indicato anche per pazienti con diabete di tipo 2. La biodisponibilità con tutte queste modifiche che sono state effettuate è migliorata, oltretutto viene somministrato come sale emifumarato, e anche questo migliora la solubilità e biodisponibilità.

Calcio antagonisti (bloccanti dei canali del calcio voltaggio dipendenti)

I calcio antagonisti o bloccanti dei canali del calcio sono due sinonimi, e sono antagonisti di tipo competitivo. Nel corso delle lezioni precedenti sono stati visti dei canali operati da ligandi, cioè canali recettoriali. Il canale in questo caso si apriva e si chiudeva in funzione dell'interazione del ligando sulla porzione extracellulare che porta a una modifica delle varie subunità, e quindi all'apertura del porocanale. Uno dei canali del calcio descritti operati dal ligando è stato il recettore canale dell'NMA (N-metilaspartato), che è diverso dal recettore canale nicotinico.

I canali del calcio voltaggio dipendenti non sono operati da un ligando, ma bensì si aprono e si chiudono, sono modulati nella loro attività in seguito a una variazione del voltaggio, e quindi del potenziale di membrana. Questi canali vengono chiamati VOC (voltage operated channels). I VOC, come gli altri canali del calcio visti in precedenza, sono importanti per l'ingresso di calcio all'interno della cellula, e portano a vari effetti biologici, come la contrazione dei vasi, e oltre ad avere effetto sulla contrazione della muscolatura liscia vasale hanno effetto sulla contrazione del muscolo cardiaco. L'azione principale delle molecole che agiscono sui canali calcio antagonisti si può identificare in un'azione antiaritmica, poiché regolano la frequenza cardiaca, rallentano l'automatismo del nodo senoatriale, prolungano la conduzione a livello atrioventricolare, e in generale sono inibitori della contrazione del muscolo cardiaco. Quelli che agiscono prevalentemente sulla muscolatura vasale hanno un effetto di rilassamento su di essa, sempre dipendente dall'ingresso di calcio, e sono prevalentemente usati come ipotensivi per l'azione vasodilatatoria. Un altro importante utilizzo di queste molecole è quella di avere un'azione nell'angina pectoris (antianginosa), e cioè diminuiscono la contrazione che viene chiamata contrazione ischemica dolorosa a carico delle arterie coronarie.

Farmaci calcio antagonisti

I farmaci calcio antagonisti agiscono prevalentemente andando ad inibire i canali del calcio voltaggio dipendenti del sottotipo L, e hanno un sito di interazione che risiede nella subunità alpha 1. Appartengono a questi 3 classi strutturali completamente diverse tra di loro:

- **1,4 diidropiridine:** Dal punto di vista farmacologico e farmaceutico sono le più rappresentate. Ce ne sono circa 12 in terapia. La prima ad essere stata progettata è la nifedipina.
- **Benzodiazepine:** Il prototipo della classe è il diltiazem.
- **Fenilalchilamine:** Rappresentata dal verapamil.

Mentre la classe delle diidropiridine ha molti farmaci in terapia, le benzodiazepine e fenilalchilamine sono rappresentate da un numero minore di farmaci. Nel loro impiego queste molecole hanno diversità, poiché le 1-4 diidropiridine sono usate prevalentemente come vasodilatatori, mentre invece il diltiazem e verapamil

sono usati soprattutto come farmaci cardiaci. In particolare, le 1-4 diidropiridine per il loro minore effetto a livello cardiaco danno, nella prima fase di utilizzo, un aumento del battito cardiaco per compensazione all'effetto vasodilatatorio. Questo effetto non si riscontra nelle altre due classi che agiscono prevalentemente come antiaritmici.

Lezione di Chimica Farmaceutica II #31 del 15/12/2023

Docente: Anna Minarini

Sbordinatore: Chiara De Benedetto

Revisore: Rayane Trabelsi

Canali

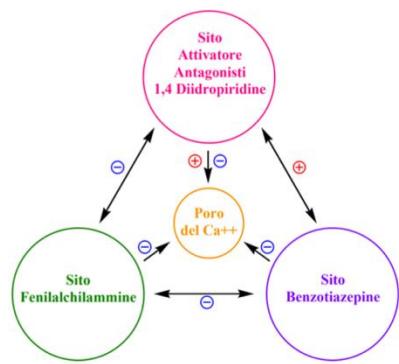
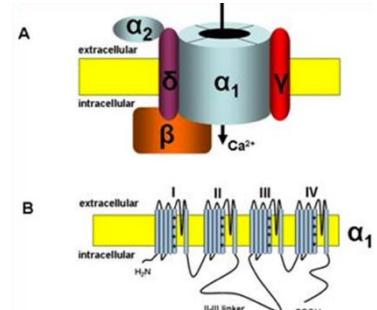
I canali del calcio-voltaggio dipendenti sono regolati dal potenziale di membrana sia nell'apertura che nella chiusura. A questa classe appartengono 4 sottotipi che vengono classificati in:

- L (*long lasting*) presentano una corrente più duratura nel tempo
- T (*transient*) hanno una corrente transitoria
- N (*neuronal*) sono localizzati a livello neuronali e hanno caratteristiche strutturali differenti dalle altre classi. Sono oggetto di studio per il miglioramento delle malattie neurodegenerative.
- P (*Purkinje*), mediano il rilascio di neurotrasmettitori

I calcio antagonisti che approfondiremo agiscono prevalentemente sui canali del calcio di tipo L. Questi canali si attivano e si inattivano lentamente in seguito ad una depolarizzazione e vengono denominati canali lenti del calcio.

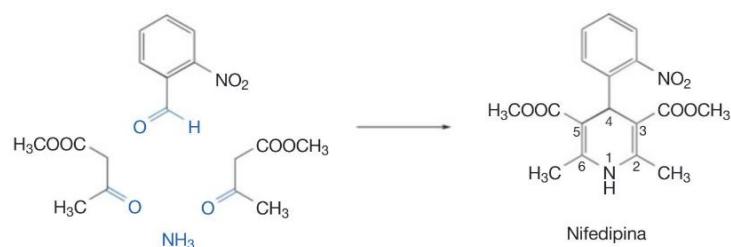
I canali del calcio-voltaggio dipendenti hanno delle caratteristiche diverse da quelli visti finora, l'unica cosa in comune è quella di essere transmembrana e caratterizzati da un poro canale attraverso il quale passa il calcio. Sono degli eteropentameri, formati da 5 subunità: α_1 , α_2 , β , γ , δ . La subunità dove vanno ad agire gli antagonisti è l' α_1 , che rappresenta un tetramero. I domini del tetramero sono uguali tra loro e attraversano la membrana con 6 domini transmembrana. Le porzioni che vengono definite S5,S6 di ciascuno di questi tetrameri vanno a delimitare il poro canale. Le altre subunità del canale, invece, svolgono un ruolo strutturale: mantengono la corretta inserzione della subunità α_1 nella membrana. La subunità β è importante per l'apertura e la chiusura del canale (meccanismo di gating). Sia il gruppo amminico che il carbossiterminale del canale sono intracellulari e sono caratterizzazioni dal loop di congiunzione che unisce le porzioni transmembrana tra di loro.

Sulla subunità α_1 esistono dei siti differenti per i 3 sottogruppi di antagonisti. In particolare, il sito di legame delle 1,4-diidropiridine è nella porzione più extracellulare, mentre quello delle fenilalchilammine nella porzione intracellulare. I tre siti di legame sono interconnessi tra di loro e si modulano vicendevolmente, nello specifico l'interazione delle diidropiridine con il loro sito di legame sono modulate in maniera opposta dalle fenilalchilammine e delle benzotiazepine. Le fenilalchilammine riducono l'interazione delle diidropiridine con il loro sito, mentre le benzotiazepine l'aumentano. Le fenilalchilammine e le benzotiazepine si modulano tra di loro in maniera negativa. Quest'ultime hanno azione bloccante del canale, mentre le diidropiridine possono comportarsi sia da antagonisti che da agonisti.

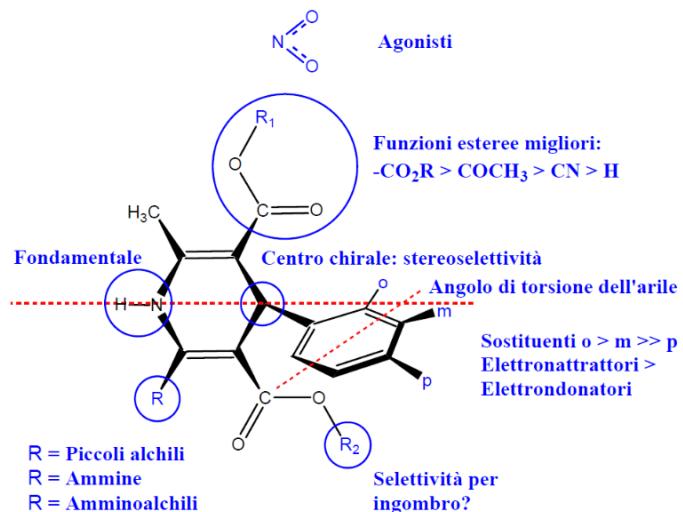


1,4-diidropiridine

Il nome deriva dal fatto che sono caratterizzate da un nucleo diidropiridinico, ovvero una piridina in cui uno dei due doppi legame è stato saturato, e 1,4 in quanto l'azoto è in posizione 1 e il sostituente aromatico è in posizione 4. Queste molecole sono note da molti anni, prima ancora del loro utilizzo in terapia, in quanto il chimico Hantzsch scoprì la loro sintesi one-pot, detta sintesi di Hantzsch. Questa vede una benzaldeide reagire con due gruppi aceto-acetati e ammoniaca. Dalla combinazione di una benzaldeide con due molecole di aceto-acetato e ammoniaca si ottiene una diidropiridina simmetrica, in quanto tutti i gruppi sono identici. Se, invece, la benzaldeide va a reagire con due aceto-acetati diversi (come un metilacetato e un etilacetato) si da origine alla possibilità di 3 diversi composti: uno in cui ho tutti e tre i gruppi uguali (metilici o etilici) e un composto che presenta un estere etilico da una parte e uno metilico dall'altra. In quest'ultimo caso la molecola non è più simmetrica e il carbonio in posizione 4 diventa chirale. A seconda dell'acetoacetato utilizzato, si ottengono diversi sostituenti in posizione 3,5. La numerazione parte dall'azoto dell'anello diidropiridinico e poi nel sostituente aromatico parte la numerazione 1', 2' ecc.



Il prototipo di questa classe è la nifedipina, entrata in terapia come ipertensivo negli anni 60, è simmetrica e quindi priva di centri chirali. Questa molecola ha dato il via a vari studi struttura-attività portando alla classificazione delle diidropiridine (DHP) in tre generazioni, le quali si distinguono per la diversa biodisponibilità e durata di azione.



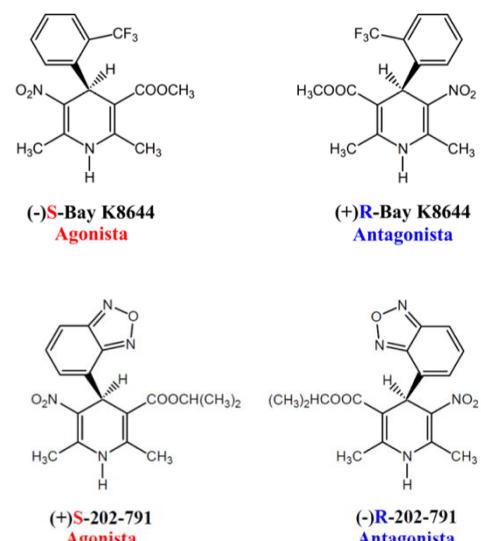
La caratteristica strutturale importante ai fini delle interazioni con i canali calcio-voltaggio è che l'anello 1,4-didiropiridinico e l'anello fenilico in posizione 4 siano tra loro ortogonali.

Le condizioni essenziali per avere antagonismo sono:

- Il gruppo NH non deve essere sostituito. Le benzotiazepine e le fenilalchilamine presentano azoti basici a differenza delle DHP che presentano un azoto molto poco basico. La sostituzione dell'azoto porta a perdita dell'attività.
- La riduzione dell'anello diidiropiridinico a tetraidiropiridina o piperidina porta a perdita di attività. L'ossidazione a piridina porta a riduzione dell'attività.
- Nella posizione 2 e 6 normalmente sono presenti dei gruppi alchilici piccoli. È necessario che almeno uno dei due rimanga di piccole dimensioni e possono essere inseriti anche gruppi amminoalchilici, come per esempio nella amlodipina (la quale appartiene alla seconda generazione). Nel caso in cui uno dei due gruppi 2 o 6 sia diverso il C4 diventa chirale.
- Il carbonio 4 è sempre monosostituito con un anello aromatico e non si possono inserire altri sostituenti in questa posizione. Normalmente presenta un fenile che si dispone perpendicolarmente all'anello 1,4-diidiropiridinico ed è sostituito in posizione orto (più frequentemente) o meta (meno frequentemente). I gruppi sostituenti sono elettron-atrattori, ad esempio nella nifedipirina è presente un gruppo nitro, che permette di mantenere la perpendicolarità per ingombro sterico. Meglio sostituenti in orto che in meta, mentre i sostituenti in para portano a perdita di attività.
- I gruppi in 3 e 5 normalmente sono gruppi esteri e possono essere diversi tra di loro (molecole asimmetriche che non vengono sintetizzate tramite reazione one-pot). Possono essere modificati con gruppi nitrilici o con nitrogruppi, ma uno dei due deve restare un estere. La rimozione dei sostituenti in queste posizioni porta a perdita dell'attività. Su uno dei due esteri possono essere presenti anche gruppi molto ingombranti (ultima generazione).

Stereochimica

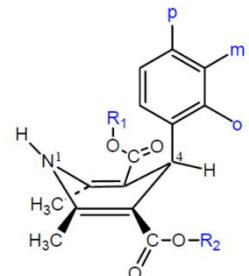
Se è presente un estere da una parte e un nitro dall'altra si ottengono due enantiomeri, in quanto il C4 diventa un centro chirale. Queste DHP progettate dalla Bayer sono stata la prima evidenza che il composto con configurazione R mantiene l'attività calcio antagonista, mentre l'S è un attivatore dei canali del calcio. Questo è stato confermato anche con altre molecole (ad esempio S202791). Quindi quando c'è un centro di simmetria nei derivati con un nitrogruppo si da origine a due enantiomeri con effetti opposti (questo si osserva solo in presenza del nitrogruppo). Quindi in tutte le altre diidiropiridine in cui si ha un centro di simmetria e due esteri diversi è sempre l'enantiomero R ad avere attività agonista.



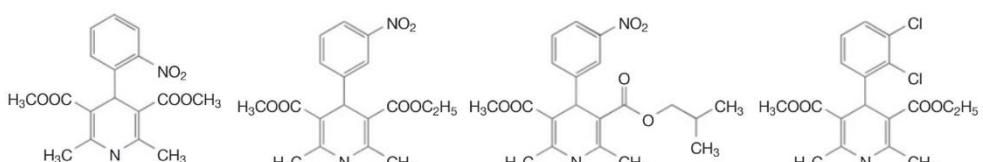
Ad esempio, nella nitrendipina se si mette un sostituente in meta' al posto che in orto, questo deve essere un nitrogruppo. Alla seconda generazione appartiene la amlodipina, che presenta una maggiore biodisponibilità che si è ottenuta sostituendo il gruppo CH₃ in posizione 2 con una catena amminoeterica. Anche catene di dimensioni maggiori sono accettate. L'anello diidiropiridinico si dispone a barca ed è perpendicolare all'anello fenilico.

Interazione con recettore

Le diidropiridine interagiscono con il loro sito sui canali del calcio voltaggio dipendenti, in particolare esiste una tasca idrofobica (ad elevata lipofilia) che accoglie l'anello fenilico con i suoi sostituenti (alogeni,nitro,trifluoronitrile) e questa rappresenta l'interazione principale. Il resto della molecola viene orientato per dare le interazioni con gli altri gruppi. Il motivo per cui la sostituzione in orto è migliore rispetto a quella in meta e in para è per via della reciproca posizione che deve avere l'anello fenilico rispetto all'anello 1,4-diidropiridinico. La sostituzione in para è svantaggiosa anche ai fini dell'interazione con la tasca idrofobica. L'aspetto più importante dei sostituenti sull'anello aromatico è l'effetto dell'ingombro sterico, più degli effetti elettronici sebbene la maggior parte di essi siano degli elettron-atrattori.



Sono riportate tutte le 1,4-didiopiridine in terapia (non vanno imparate). Si nota che l'anello fenilico può essere disostituito in orto e in meta, anche se la maggior parte è monosostituita. Uno dei due esteri può avere ampie dimensioni. È frequente l'inserimento dei gruppi N, in quanto vanno a migliorare la biodisponibilità e la durata d'azione delle molecole. Quindi quando sono presenti dei gruppi più ingombranti sono sempre presenti anche dei gruppi basici.

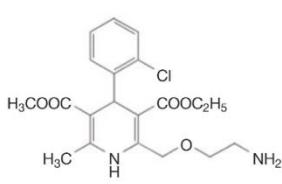


Nifedipine

Nitroandine

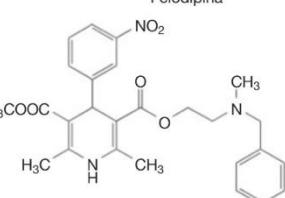
Nicoldinina

Elastomeric

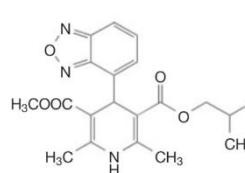


Amlodipina

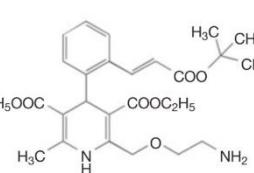
Nimodipina



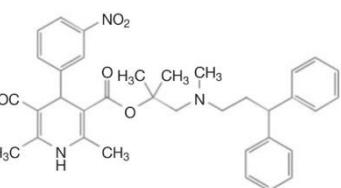
Nicardipina



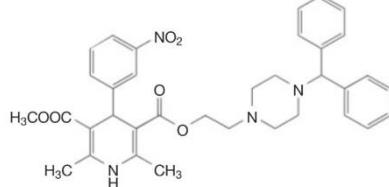
Isradipina



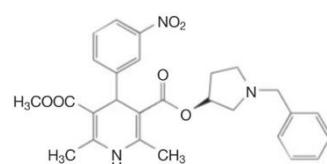
J acidipina



Lercanidipina



Manidipina



Barnidipina

Nella prima generazione rientrano nitrendipina, nicardipina, felodipina, nisoldipina, nimodipina (derivati della nifepidina) che hanno una durata d'azione breve e necessitano di somministrazioni giornaliere multiple.

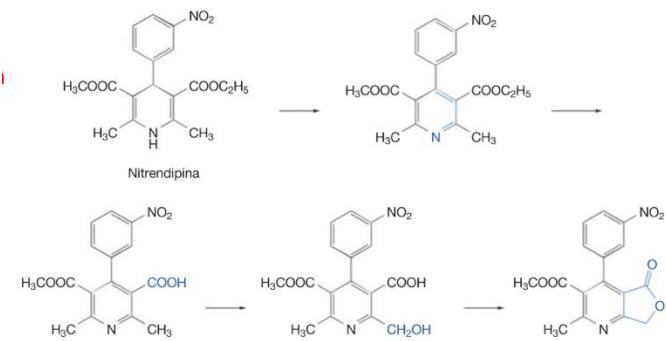
Alla seconda generazione appartengono amlodipina e istradipina, le quali hanno un'emivita più lunga.

Infine, le molecole della terza generazione presentano una lunga durata d'azione e una maggiore lipofilia per controbilanciare la funzione amminica che renderebbe troppo idrofila la molecola.

Metabolismo

Il metabolismo delle diidropiridine porta a composti inattivi. Osservando quello della nitrendipina vediamo che si ha:

- Ossidazione dell'anello 1,4-diidropiridinico ad anello piridinico.
- Idrolisi degli esteri da parte delle esterasi in posizione 3 e 5.
- Ossidazione dei metili in posizione 2 a gruppi alcolici. Questo porta ad avere un gruppo alcolico e uno carbossilico vicini, i quali possono dare origine alla lattonizzazione, ovvero la formazione dell'estere ciclico.



Tutti questi metaboliti sono inattivi in quanto non rispettano più i requisiti per avere l'azione calcio antagonisti.

Lezione di Chimica Farmaceutica II #31 del 15/12/2023

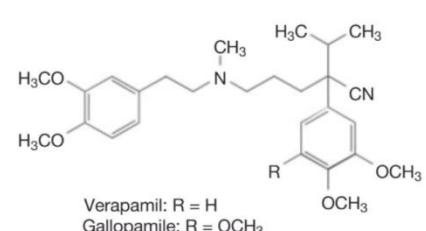
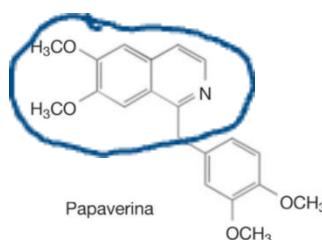
Docente: Anna Minarini

Sbobinatore: Raissa Rainauro

Revisore: Rosalba Forenza

FENILALCHILAMMINE

Il verapamil, che è il prototipo di questa classe, è stato progettato come analogo flessibile della papaverina, che è caratterizzata da **anelli 6,7 dimetossi isochinolinici**: se si apre l'anello isochinolinico si ottiene un atomo di azoto in catena laterale legato poi ad un altro gruppo aromatico con due metossili. La papaverina è uno degli alcaloidi presenti anche nell'oppio e in effetti ha un'azione prevalentemente miorilassante.

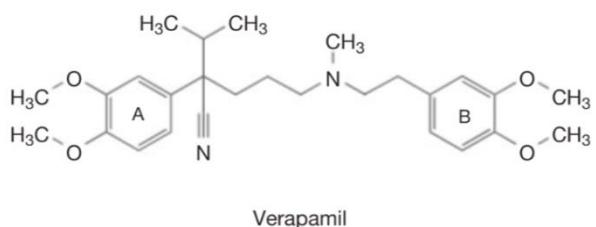


La modificazione dalla struttura rigida a quella aperta è stata la base per la scoperta di questi calcio antagonisti, che agiscono con un meccanismo completamente diverso. Il verapamil fra i calcio antagonisti è

quello che ha i maggiori effetti aritmici, quindi che agisce preferenzialmente sui canali del calcio voltaggio dipendenti sempre L a livello cardiaco.

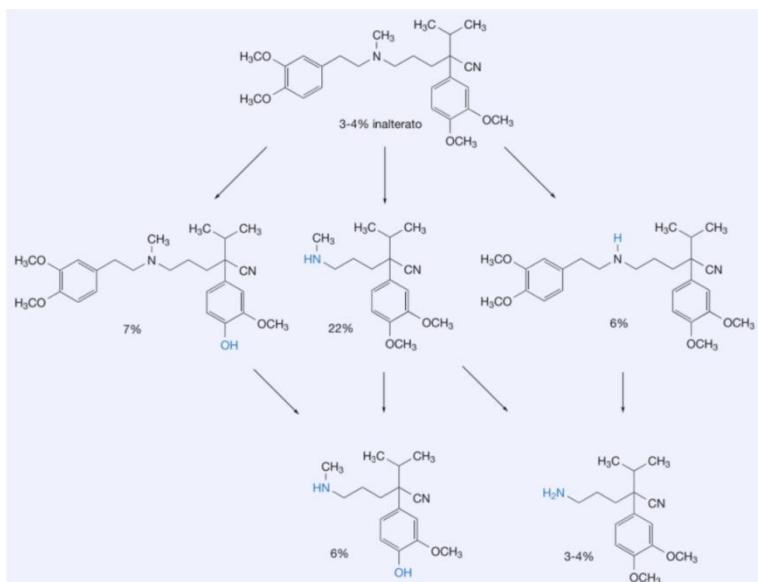
Caratteristiche: due anelli aromatici sostituiti ugualmente con due metossili, perché deriva dalla papaverina, ha un N basico (pK_a intorno a 8/9) e quindi è detto derivato fenilalchilamminico; in catena laterale c'è un C sostituito con quattro sostituenti diversi: isopropile, nitrile, fenile e poi tutta la catena, quindi è uno stereocentro. L'enantiomero (S)-(-) è quello più attivo.

Requisiti fondamentali: è caratterizzato da un gruppo amminico terziario basico, normalmente sostituito da un metile (non accetta sostituenti tanto più ingombranti) e deve essere terziario; altro elemento importante è il carbonio tetrasostituito. Si può modificare l'isopropile, ma il nitrile è importante. Gli anelli, che possiamo chiamare A e B, hanno relazioni struttura attività leggermente diverse; le migliori sostituzioni sono con i metossili (sia per A che per B) e non possono essere eliminati perché sono un punto di interazione con il canale del calcio. Anche la distanza della catena alchilamminica non può essere variata perché ci deve essere una corretta distanza fra i due anelli per un ottimale interazione con i recettori. Sull'anello A non si possono mettere sostituenti in orto perché danno fastidio per ingombro sterico con il nitrile adiacente; l'isopropile può essere sostituito con altri gruppi, quindi non è essenziale come il nitrile. L'anello B normalmente ha i due gruppi metossilici, nell'anello A si può inserire un altro gruppo metossilico: per esempio il gallopamile (analogo del Verapamil) ha un altro gruppo in posizione meta, sempre un metossile (si chiama gallopamile perché l'acido gallico è quello con i tre gruppi OH).



Si possono inserire sostituenti elettron attrattori in meta di entrambi gli anelli, non sono deleteri per l'attività, e solo sull'anello B si possono inserire gruppi di maggiori dimensioni in posizione para.

Fra i farmaci in terapia ci sono solo il verapamil e il gallopamile. La molecola di verapamil è stata oggetto di studio anche per un altro effetto che ha, proprio per questa sua capacità di interagire con i canali transmembrana nella multi drug resistance da chemioterapici, perché si è dimostrato essere un inibitore della glicoproteina P (si dice proteina MDR1), che è una glicoproteina coinvolta nell'esclusione dalle cellule dei chemioterapici considerati sostanze estranee, è una sorta di meccanismo di difesa della cellula. Questo però purtroppo comporta che con il procedere della chemioterapia i chemioterapici che inizialmente sono efficaci ma mano diventano meno efficaci. Nella molecola del Verapamil è stata riconosciuta questa attività di inibizione della glicoproteina P e sono stati fatti molti studi di associazione insieme ai chemioterapici nel momento in cui c'è la comparsa di una minore efficacia. In realtà non sono ancora assunti in combinazione però c'è un'ampia ricerca.



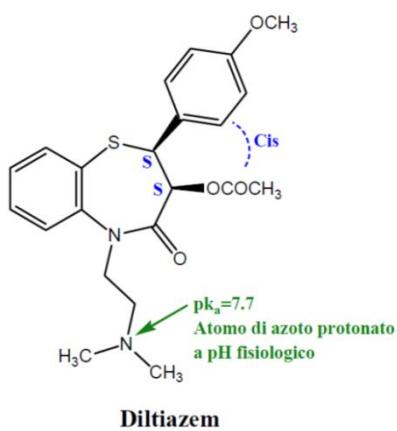
Metabolismo verapamil

Ha molti gruppi funzionali quindi molti metaboliti, che riguardano sia la N demetilazione, che porta composti meno attivi, che la O demetilazione sui metossili degli anelli aromatici, che la N dealchilazione, che comporta non solo la perdita del metile ma la dealchilazione anche delle altre catene. Si ha anche una

combinazione di tutto questo metabolismo che porta a frammenti più piccoli.

Dal metabolismo quindi sì ha sia rottura della molecola che trasformazione in ammina prima secondaria poi primaria per rottura di un ulteriore legame alchilico.

BENZOTIAZEPINE



Questa classe è definita benzotiazepinica però più correttamente dovrebbe essere chiamata benzotiazepinonica perché nell'anello benzotiazepinico (a 7 termini) c'è anche un carbonile, quindi l'anello è lattamico, perché c'è un'ammide ciclica. Il diltiazem oltre ad avere questi due anelli fusi che danno il benzotiazepinone, ha anche un sostituente fenilico, e un altro sostituente estereo sull'anello. La numerazione parte da S, la presenza dei due sostituenti (metossifenile e acetossi) fanno sì che il 2 e il 3 siano due centri chirali, ambedue devono avere configurazione S e sono posizionati tra loro in cis.

Esso è stato progettato in Giappone poi è stato anche approvato per uso antiaritmico e anti anginoso, ha scarsa attività come antipertensivo. È

stato approvato dall'FDA e dall'EMA quindi è in terapia anche in Europa e in America.

SAR

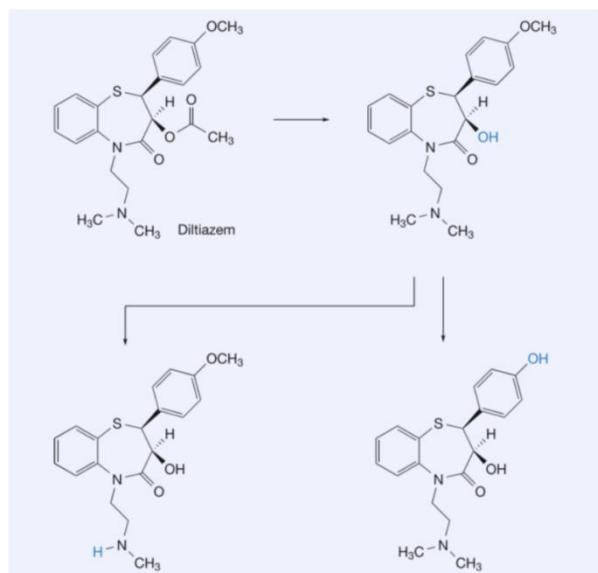
È importante che gli stereo centri siano in configurazione S, i due gruppi 2 e 3 devono stare in cis, lo zolfo non è così fondamentale: si può rimuovere e sostituire con un CH₂, però di fatto questo analogo non c'è in terapia. Il metossile in para dell'anello in posizione 2 non si può rimuovere perché è un centro accettore di legami ad idrogeno nel sito di interazione col canale del calcio. Sull'azoto lattamico, che quindi non è basico, c'è una catena N dimetiletilo, che può essere sostituita, quindi ramificata, ed è importante che l'N basico sia sostituito, quindi sia terziario, ma la sostituzione deve prevedere piccoli gruppi (quindi i metili sono i migliori). La pKa di questo azoto è 7,7, quindi è protonato a pH fisiologico, e questo è importante per l'interazione con i canali del calcio.

L'anello aromatico dell'anello benzotiazepinonico non deve essere sostituito.

Metabolismo diltiazem

Ha un gruppo estero che è importante per l'attività perché è il primo centro di degradazione enzimatica: questo trasforma la molecola nel suo derivato alcolico. L'altra metabolizzazione prevede la demetilazione dell'azoto che rende molto meno attiva la molecola perché l'azoto deve essere terziario. L'altro metabolita prevede la demetilazione del metossile; questi metaboliti fenolici poi possono dare ulteriore coniugazione e quindi essere escreti come glucuronidi.

Il composto deacetilato perde la maggior parte dell'attività, ed è l'evento primario nella metabolizzazione del farmaco.



I canali normalmente si trovano in tre stati: chiuso, aperto e inattivo o refrattario, andiamo quindi a vedere se queste molecole hanno diversa affinità per questi tre stati. Lo stato aperto è quello che consente al catione di transitare attraverso il canale, il resting state (stato di riposo) è quello che può essere stimolato a seguito di depolarizzazione e poi c'è lo stato inattivo, che invece anche in seguito a depolarizzazione non risponde, detto anche desensitizzato.

Sappiamo che l'azoto è un punto importante perché rende la basicità tale da rendere diltiazem e verapamil protonati a pH fisiologico: questi due legano il canale prevalentemente nella sua forma aperta, quindi hanno la possibilità di interagire all'interno del canale; non lo legano invece nello stato di riposo. Le diidropiridine invece, che sono composti più neutri, legano il canale sia nello stato aperto che nello stato inattivo.