

Università Della Calabria

Dipartimento di Ingegneria Informatica,
Modellistica, Elettronica e Sistemistica

Corso di Dottorato in “Ambiente, Salute e Processi
Ecosostenibili”

Scuola “Life Sciences”

XXVI CICLO

TESI DI DOTTORATO

SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI NUOVI
DERIVATI CICLICI DEL PIRAZOLO

DIRETTORE DELLA SCUOLA

Prof. Marcello Canonaco

CANDIDATO

Dott. Angela Maria Caputo

COORDINATORE

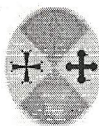
Prof. Bruno de Cindio

RELATORI

Prof.ssa Maria Stefania Sinicropi

Dott. Francesco Puoci

ANNO ACCADEMICO 2012-2013



UNICAEN
université de Caen



N.B. I titolari di borsa finanziata dal FSE devono obbligatoriamente riportare sulla tesi la seguente dicitura: "La presente tesi è cofinanziata con il sostegno della Commissione Europea, Fondo Sociale Europeo e della Regione Calabria. L'autore è il solo responsabile di questa tesi e la Commissione Europea e la Regione Calabria declinano ogni responsabilità sull'uso che potrà essere fatto delle informazioni in essa contenute"



Sommario

Capitolo 1	5
Premessa: Catecolamine e recettori adrenergici	5
1.1 . Le catecolamine endogene	5
1.2 Principali azioni delle catecolamine	7
1.3 . Classificazione dei recettori adrenergici	7
1.3.1. Basi molecolari della funzionalità dei recettori adrenergici	8
1.3.2. Struttura dei recettori adrenergici.....	8
1.4 . Recettori β -adrenergici	9
1.5 . Recettori α -adrenergici	9
1.6 . Il recettore β_1 adrenergico: target di farmaci antipertensivi	14
Capitolo 2.....	16
Gli antagonisti dei recettori adrenergici	16
2.1. Il sito di legame adrenergico	16
2.2. Relazioni struttura-attività.....	17
2.2.2. La selettività dei recettori adrenergici α o β	19
2.3. Gli antagonisti dei recettori adrenergici	22
2.3.1. Gli α -bloccanti.....	22
2.3.2. I β -bloccanti	23
2.3.2.1. I β -bloccanti di prima generazione.....	23
2.3.2.2. Relazioni struttura-attività delle arilossipropanolamine	26
2.3.2.3. Gli effetti clinici dei β -bloccanti di prima generazione	28
2.3.2.4. β -bloccanti di seconda generazione (bloccanti β_1 -selettivi).....	30
2.3.2.5. I β -bloccanti di terza generazione	32
2.3.2.6. Altre applicazioni dei β -bloccanti	34
Capitolo 3	37
Lo stato dell'arte	37



3.1. Derivati della 1,8-naftiridina.....	37
3.2. Derivati 3,4-diidro-1(2H)-benzoxazepine.....	39
3.3. Derivati 3-(benziliden)aminossipropanolamine.....	40
Capitolo 4.....	42
SCOPO DELLA RICERCA E RISULTATI OTTENUTI.....	42
4.1. Schema generale di reazione per la preparazione di nuovi indeno[1,2- <i>c</i>]pirazol derivati diversamente sostituiti	51
4.1.1. Sintesi del 2-dimetilaminometilen-indan-1,3-dione (XIV).....	52
4.1.2. Sintesi di 2-(<i>N'</i> -metil (o fenil)-idrazinometilen)indan-1,3-dione (XV).....	52
4.1.3. Sintesi di 1-metil(o fenil)-1 <i>H</i> -indeno[1,2]pirazol-4-one (XVI).....	53
4.1.4. Sintesi di (<i>Z/E</i>)-1-metil(o fenil)-1 <i>H</i> -indeno[1,2- <i>c</i>]pirazol-4-one ossima (XVII).....	53
4.1.5. Sintesi di (<i>Z/E</i>)-1-metil(o fenil)-1 <i>H</i> -indeno[1,2 <i>c</i>]pirazol-4-one <i>O</i> -ossiranilmetil-ossima (XVIII)	54
4.1.6. Sintesi dei derivati del indeno[1,2- <i>c</i>]pirazol-4(1 <i>H</i>)-one diversamente sostituiti (XIX)	55
4.2. Valutazione biologica dei derivati sintetizzati	56
Capitolo 5.....	60
PARTE SPERIMENTALE.....	60
5.1. Chimica	60
5.1.1. Materiali e metodi	60
5.1.2. Procedura di sintesi di: 2-dimetilaminometilen-indan-1,3-dione (XIV).	61
5.1.3. Procedura generale per la sintesi di: 2-(<i>N'</i> -metil (o fenil)-idrazinometilen)indan-1,3-dione (XV).	62
5.1.4. Procedura generale per la sintesi di 1-metil(o fenil)-1 <i>H</i> -indeno[1,2]pirazol-4-one (XVI)	64
5.1.5. Procedura generale per la sintesi di (<i>Z/E</i>)-1-metil(o fenil)-1 <i>H</i> -indeno[1,2- <i>c</i>]pirazol-4-one ossima (XVII).....	67
5.1.6. Procedura generale per la sintesi di (<i>Z/E</i>)-1-metil(o fenil)-1 <i>H</i> -indeno[1,2 <i>c</i>]pirazol-4-one <i>O</i> -ossiranilmetil-ossima (XVIII).....	70



5.1.7. Procedura generale per la sintesi di (Z/E)-indeno[1,2-c]pirazol-4(1H)-one diversamente sostituiti.....	73
5.2. Biologia.....	78
5.2.1. Materiali e metodi per la valutazione biologica.....	78
5.3 Veicolazione.....	79
5.3.1. Membrana cutanea.....	79
5.3.2. Rilascio transdermico mediante celle di Franz.....	80
Capitolo 6.....	82
Il rilascio transdermico.....	82
6.1. Via transdermica.....	82
6.2. Forme farmaceutiche dermatologiche.....	83
6.3. Struttura della pelle.....	84
6.3.1. Epidermide.....	84
6.3.2. Derma.....	86
6.3.3. Ipoderma.....	87
6.3.4. Annessi cutanei.....	87
6.3.5. Mucose.....	88
6.4. Assorbimento percutaneo dei farmaci.....	88
6.5. Cinetiche di permeazione dei farmaci attraverso la pelle.....	89
6.6. Fattori che influenzano l'assorbimento percutaneo di farmaci.....	90
6.6.1. Fattori biologici.....	90
6.6.2. Fattori chimico-fisici.....	91
6.7. Somministrazione transdermica.....	91
6.8. Sistemi transdermici per il rilascio controllato del farmaco.....	92
Bibliografia.....	94

Capitolo 1

Premessa: Catecolamine e recettori adrenergici.

1.1. Le catecolamine endogene

Le catecolamine rilasciate dai neuroni simpatici e dalla midollare del surrene sono coinvolte nella regolazione di numerose funzioni fisiologiche e, in particolare, esse integrano risposte a numerosi stimoli che altrimenti finirebbero con l'alterare i meccanismi omeostatici [1,2].

La noradrenalina (figura 1.1) è il principale neurotrasmettitore del sistema nervoso simpatico periferico, mentre l'adrenalina (figura 1.2) nei mammiferi, costituisce l'ormone principale secreto dalla midollare del surrene. L'attivazione del sistema nervoso simpatico avviene in risposta a stimoli differenti, tra cui attività fisica, situazioni di tensione psicologica, emorragie e molti altri, derivanti da condizioni normali o patologiche.

Poiché le funzioni mediate o modificate dal sistema nervoso simpatico sono numerose, i farmaci che ne mimano, alterano o antagonizzano l'attività sono utili nel trattamento di molti disturbi clinici, tra cui ipertensione, shock cardiovascolare, aritmie, asma, emicrania e reazioni anafilattiche [3].

Nonostante ad oggi si siano studiati un numero elevato di farmaci in grado di modificare le risposte simpatiche, esiste ancora un considerevole interesse verso lo sviluppo di nuovi composti che trovino applicazioni cliniche e sperimentali. D'altronde lo studio attento di sottotipi recettoriali, come prodotto di trascrizione di geni differenti, ha alimentato la possibilità di sviluppo di nuovi farmaci non solo in grado di agire selettivamente sui sottotipi recettoriali in distretti particolari o in diverse regioni del Sistema Nervoso Centrale (SNC) ma anche aventi profili di sicurezza migliorati [4].

Le risposte fisiologiche e metaboliche che seguono la stimolazione dei neuroni simpatici nei mammiferi sono normalmente mediate dal neurotrasmettitore noradrenalina, nonostante cotrasmettitori come i peptidi possano contribuire agli effetti della stimolazione simpatica. Anche la midollare del surrene viene coinvolta nella



risposta allo stress, producendo un aumento delle concentrazioni plasmatiche di adrenalina, in grado di agire su siti distanti.

Le azioni di queste due catecolamine su alcuni distretti sono molto simili, mentre risultano significativamente differenti in altri. Per esempio, entrambe stimolano il tessuto miocardico; tuttavia l'adrenalina dilata i vasi della muscolatura scheletrica, mentre la noradrenalina causa costrizione dei vasi sanguigni dell'epidermide, delle mucose e del rene.

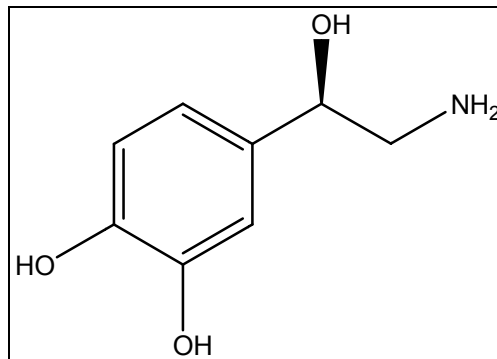


Figura 1.1: Noradrenalina

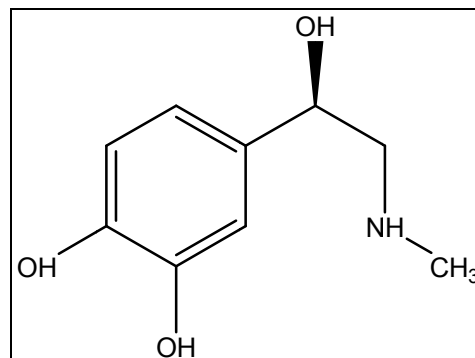


Figura 1.2: Adrenalina

La dopamina (figura 1.3) è la terza catecolamina endogena.

Sebbene sia localizzata preferenzialmente nei gangli della base del SNC, le terminazioni dopaminergiche e i recettori per questa catecolamina sono stati identificati in altre parti del SNC e in periferia.

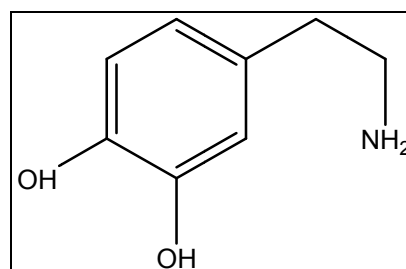


Figura 1.3: Dopamina



1.2 Principali azioni delle catecolamine

La maggior parte delle azioni delle catecolamine sono di seguito riassunte.

In particolare, azione:

- periferica eccitatoria su alcuni tipi di muscoli lisci, come quelli dei vasi che irrorano la pelle, rene e mucose, e sulle cellule ghiandolari, come quelle delle ghiandole salivari e delle ghiandole sudoripare;
- periferica inibitoria su altri tipi di muscoli lisci, come quelli della parete dell'intestino, dell'albero bronchiale e dei vasi sanguigni che irrorano i muscoli scheletrici;
- eccitatoria cardiaca, responsabile dell'aumento della frequenza e della forza contrattile cardiaca;
- metabolica, come aumento della velocità di glicogenolisi nel fegato e nel tessuto muscolare e la produzione di acidi grassi liberi dal tessuto adiposo;
- endocrina, come la modulazione della secrezione di insulina, di renina e ormoni ipofisari;
- sul SNC, come stimolazione della respirazione e aumento dell'attività di veglia, attività locomotoria e riduzione dell'appetito;
- presinaptica che risulta in una inibizione o facilitazione del rilascio di neurotrasmettitori come la noradrenalina e l'acetilcolina [5].

Dal punto di vista fisiologico, l'azione inibitoria risulta più importante dell'azione eccitatoria.

1.3. Classificazione dei recettori adrenergici

Per la comprensione degli effetti notevolmente diversi delle catecolamine e di vari agenti simpaticomimetici e simpaticolitici ad esse correlati, è importante la conoscenza della classificazione e delle proprietà dei diversi tipi di recettori adrenergici. Sebbene siano correlati strutturalmente, i diversi recettori adrenergici regolano processi fisiologici distinti controllando la sintesi o il rilascio di una serie di secondi messaggeri. Ahlquist (1948) propose per primo l'esistenza di più di un recettore adrenergico; egli basò la sua ipotesi sull'osservazione della capacità di adrenalina, noradrenalina e altri agonisti simili di regolare processi fisiologici diversi [6].



1.3.1. Basi molecolari della funzionalità dei recettori adrenergici

La risposta che segue l'attivazione di un recettore adrenergico sembra risultare dall'attivazione della produzione di secondi messaggeri attraverso la mediazione di una proteina G e dell'apertura di canali ionici. Questi sistemi coinvolgono l'interazione di tre diverse proteine: il recettore, la proteina G e gli enzimi o il canale ionico effettori.

1.3.2. Struttura dei recettori adrenergici

I recettori adrenergici costituiscono una famiglia di proteine strettamente correlate. Essi, inoltre, sono correlati sia strutturalmente che funzionalmente a recettori accoppiati a proteine G, per una gran varietà di ormoni e neurotrasmettitori. Studi di legame, marcatura sito-specifica e mutagenesi, hanno rilevato che le regioni transmembrana conservate hanno un importante coinvolgimento nel legame dei rispettivi ligandi. Queste regioni sembrerebbero creare delle tasche per l'allocatione del ligando.

Ahlquist propose la denominazione α e β per i recettori presenti sulla muscolatura liscia dove le catecolamine producono rispettivamente effetti eccitatori e inibitori. (Unica eccezione è data dall'intestino dove l'effetto è di rilassamento per attivazione dei recettori sia α che β).

I recettori β vennero in seguito suddivisi in β_1 (ad es. quelli del miocardio) e β_2 (nella muscolatura liscia e in molti altri siti), poiché l'adrenalina e la noradrenalina sono essenzialmente equivalenti sui primi, mentre l'adrenalina è da 10 a 50 volte più potente della noradrenalina sui secondi. In seguito vennero sviluppati antagonisti in grado di discriminare tra recettori β_1 e β_2 .

È stato recentemente identificato un gene umano che codifica per un terzo recettore β -adrenergico, designato β_3 , che potrebbe essere mediatore di risposte alle catecolamine in siti con caratteristiche farmacologiche "atipiche" per esempio il tessuto adiposo. Tuttavia rimane incerto il ruolo di questo recettore nella regolazione della lipolisi nell'uomo.



1.4. Recettori β -adrenergici

I tre recettori β -adrenergici hanno un'identità di sequenza aminoacidica del 60% all'interno dei presunti domini trans membrana dove sono localizzati i siti di legame per noradrenalina e adrenalina. Studi di mutagenesi hanno consentito di individuare gli aminoacidi responsabili delle interazioni con i gruppi funzionali strutturalmente presenti negli agonisti e negli antagonisti catecolaminergici. Particolare importanza è rivestita dal gruppo aminico protonato del ligando che sembra formare un ponte salino con il gruppo acido dell'Asp¹¹³ nel terzo dominio trans membrana. Questo residuo di Asp è conservato in tutti i sottotipi recettori adrenergici. Altri residui aminoacidici presenti nei domini trans membrana hanno rilevanza particolare nelle interazioni con gli antagonisti. Per esempio, l'Asn³¹² nella settima elica sembrerebbe interagire con l'ossigeno del gruppo fenossi presente in molti potenti antagonisti β -adrenergici.

Tutti i recettori β -adrenergici stimolano l'adenil ciclasi attraverso interazione con una proteina G stimolante G_s. La stimolazione del recettore porta all'accumulo di AMP ciclico, all'attivazione della chinasi AMP ciclico dipendente, e ad alterata funzione di molte proteine cellulari come risultato della loro fosforilazione. In aggiunta la proteina G_s può incrementare direttamente l'attivazione di canali del Ca²⁺ voltaggio- dipendenti nella membrana plasmatica dei muscoli scheletrico e cardiaco [7]; quest'azione costituisce un ulteriore mezzo di regolazione dell'attività di questi tessuti.

1.5. Recettori α -adrenergici

Viene oggi riconosciuta anche l'eterogeneità dei recettori α -adrenergici. La distinzione iniziale fu basata su considerazioni anatomiche e funzionali mentre col tempo divenne chiaro che la noradrenalina e gli altri agonisti α -adrenergici erano in grado di inibire fortemente il rilascio di noradrenalina dai neuroni. Questo fenomeno inibitorio retrogrado della noradrenalina sul suo stesso rilascio è mediato da recettori α -adrenergici presinaptici farmacologicamente distinti dai classici recettori α -postsinaptici.

In accordo con questa distinzione funzionale i recettori presinaptici vennero designati come α_2 mentre i recettori post-sinaptici "eccitatori" furono designati come α_1 .



Sei distinti recettori α -adrenergici sono stati clonati: tre geni α_1 e tre geni α_2 . Tutte le sequenze aminoacidiche dedotte sono conformi al paradigma dei recettori α -adrenergici accoppiati alle proteine G con sette domini trans membrana. Sebbene non siano stati studiati approfonditamente come i recettori β -adrenergici, le caratteristiche strutturali generali e la loro relazione con le funzioni del legame con il ligando sono in accordo con quelle per i recettori β -adrenergici. All'interno del dominio trans membrana, i tre recettori α_1 -adrenergici possiedono un'omologia del 75% nella sequenza aminoacidica, come anche i tre recettori α_2 , ma i sottotipi α_1 e α_2 non sono più simili di quanto lo siano i sottotipi α e β (circa del 30-40%). La tabella 1.1 elenca le principali risposte degli organi effettori agli impulsi nervosi autonomi [4].

Organi effettori	TIPO DI RECETTORE	Impulsi adrenergici	Impulsi colinergici
OCCHIO Muscolo radiale, Muscolo sfintere dell'iride, Muscolo ciliare	Alfa-1 Beta-2	Contrazione (midriasi) ++ - Rilassamento per la visione lontana +	- Contrazione (miosi)+++ Contrazione per la visione vicina +++
CUORE Nodo SA Atri Nodo AV Sistema di His-Purkinje	Beta-1, Beta-2 Beta-1, Beta-2 Beta-1, Beta-2 Beta-1, Beta-2	Aumento della frequenza cardiaca ++ Aumento della contrattilità e della velocità di conduzione ++ Aumento dell'automaticità e della velocità di conduzione ++ Aumento dell'automaticità e della velocità di conduzione +++	Diminuzione della frequenza cardiaca; Arresto vagale +++ Diminuzione della contrattilità e del potenziale d'azione ++ Diminuzione della velocità di conduzione; Blocco AV +++ Effetto lieve



Ventricoli	Beta-1, Beta-2	Aumento della contrattilità, della velocità di conduzione, dell'automaticità e della frequenza dei pacemaker idioventricolari +++	Leggera diminuzione della contrattilità
ARTERIOLE			
Coronarie	Alfa-1, Alfa-2; Beta-2	Costrizione +; Dilatazione ++	Costrizione +
Cute e mucose		Costrizione +++	Dilatazione
Muscolo scheletrico	Alfa-1, Alfa-2 Alfa, Beta-2	Costrizione ++; Dilatazione ++	Dilatazione +
Cerebrali	Alfa-1	Costrizione (lieve) Costrizione +; Dilatazione	Dilatazione
Polmonari	Alfa-1; Beta-2	Costrizione +++;	-
Visceri addominali	Alfa-1; Beta-2	Dilatazione +	Dilatazione ++
Ghiandole salivari	Alfa-1, Alfa-2 Alfa-1, Alfa-2, Beta-1, Beta-2	Costrizione +++; Dilatazione +	-
Renali			
VERNE (sistemiche)	Alfa-1, Alfa-2; Beta-2	Costrizione ++; Dilatazione ++	-
POLMONE			
Fibre muscolari della trachea e dei bronchi	Beta-2 Alfa-1; Beta-2	Rilassamento + Diminuzione della secrezione; aumento della secrezione	Contrazione ++ Stimolazione +++
Ghiandole bronchiali			
STOMACO			
Motilità e tono	Alfa-1, Alfa-2; Beta-2	Diminuzione (generalmente) +	Aumento +++



Sfinteri	Alfa-1	Contrazione (generalmente) +	Rilassamento (generalmente) +
Secrezione		Inibizione (?)	Stimolazione +++
INTESTINO			
Motilità e tono	Alfa-1, Alfa-2, Beta-1, Beta-2	Diminuzione +	Aumento +++
Sfinteri	Alfa-1	Contrazione (generalmente) +	Rilassamento (generalmente) +
Secrezione	Alfa-2	Inibizione	Stimolazione ++
COLECISTI E DOTTI BILIARI	Beta-2	Rilassamento +	Contrazione +
RENE			
Secrezione renina	Alfa-1, Beta-1	Diminuzione +; Aumento ++	-
VESCICA URINARIA			
Detrusore	Beta-2	Rilassamento (generalmente) +	Contrazione +++
Trigono e sfintere	Alfa-1	Contrazione ++	Rilassamento ++
URETERE			
Motilità e tono	Alfa-1	Aumento	Aumento (?)
UTERO	Alfa-1, Beta-2	Gravidanza: contrazione (Alfa-1); Rilassamento (Beta-2) Non in gravidanza: Rilassamento (Beta-2)	Variabile
ORGANI GENITALI MASCHILI		Eiaculazione ++	Erezione +++
CUTE			
Muscoli pilomotori	Alfa-1 Alfa-1	Contrazione ++ Secrezione locale +	- Secrezione



Ghiandole sudoripare			generalizzata +++
CAPSULA DELLA MILZA	Alfa-1, Beta-2	Contrazione +++; Rilassamento +	–
MIDOLLARE SURRENALE		–	Secrezione di adrenalina e noradrenalina (principalmente nicotinic e secondariamente muscarinica)
MUSCOLO SCHELETRICO	Beta-2	Aumento della contrattilità; glicogenolisi; captazione K ⁺	–
FEGATO	Alfa-1, Beta-2	Glicogenolisi e gluconeogenesi +++	–
PANCREAS			
Acini	Alfa	Diminuzione della secrezione +	Secrezione ++
Isole di Langerhans (cellule beta)	Alfa-2 Beta-2	Diminuzione della secrezione +++ Aumento della secrezione +	–
CELLULE ADIPOSE	Alfa-2; Beta-1; (Beta-3)	Lipolisi +++ (termogenesi)	–
GHIANDOLE SALIVARI	Alfa-1 Beta	Secrezione di K ⁺ e acqua + Secrezione di amilasi +	Secrezione di K ⁺ e acqua +++
IPOFISI POSTERIORE	Beta-1	Secrezione del'ormone antidiuretico	–

Tabella 1.1: Risposte degli organi effettori agli impulsi nervosi autonomi



1.6. Il recettore β_1 adrenergico: target di farmaci antipertensivi

Il recettore β -1 adrenergico è localizzato a livello del tessuto cardiaco, e delle cellule dell'apparato juxta-glomerulare e media effetti ipertensivi esercitando attività inotropica, cromotropica e dromotropica positive a livello del cuore e direttamente sulla muscolatura liscia arteriolare grazie a stimolazione del sistema renina-angiotensina [8]. Il sistema renina-angiotensina agisce da un lato incrementando il volume di sangue attraverso lo stimolo della sintesi e del rilascio dell'aldosterone, dall'altro inducendo vasocostrizione ovvero riduzione del lume dei vasi sanguigni. L'aldosterone agisce infatti sulla parte distale dei nefroni (unità funzionali del rene) dove determina una riduzione dell'escrezione di sodio e di acqua ed un aumento dell'escrezione di potassio e di protoni. La riduzione di sodio e di acqua da parte del rene aumenta il volume plasmatico e la pressione arteriosa. Il centro del controllo primario del sistema renina-angiotensina si trova a livello renale e più precisamente nelle cellule dell'apparato juxta-glomerulare dove viene prodotto ed immagazzinato l'ormone proteolitico renina (figura 1.5) capace di agire su una proteina plasmatica, l'angiotensinogeno sintetizzata dal fegato, trasformandola nel decapeptide angiotensina I. Questa proteina viene a sua volta trasformata da un enzima di conversione (ACE= angiotensin converting enzyme) nell'octapeptide angiotensina II che è tra le sostanze vasocostrittrici più potenti dell'organismo umano. Essa subisce un'ulteriore lisi enzimatica per trasformarsi in angiotensina III e in altri metaboliti.

L'angiotensina III, in misura minore dell'angiotensina I ed in modo particolare l'angiotensina II, sono responsabili dei già citati effetti biologici del sistema renina-angiotensina, espletati tramite interazioni con specifici recettori (AT1 e AT2) [9].

Tra i due sottotipi recettoriali, i più rappresentati sono gli AT1, che quando stimolati, favoriscono da una parte la contrazione della muscolatura liscia arteriolare e della muscolatura striata del miocardio, dall'altra stimolano il centro della sete, con conseguente produzione di aldosterone.

Ad oggi molti farmaci β -bloccanti presentano scarsa selettività recettoriale in quanto affini anche nei confronti dei recettori β -2 adrenergici, localizzati sulla muscolatura liscia bronchiale [10,11], e quindi dotati conseguentemente di numerosi effetti collaterali.

L'ottenimento perciò di composti selettivi nei confronti dei recettori β -1 è un'esigenza sentita e attuale [12].

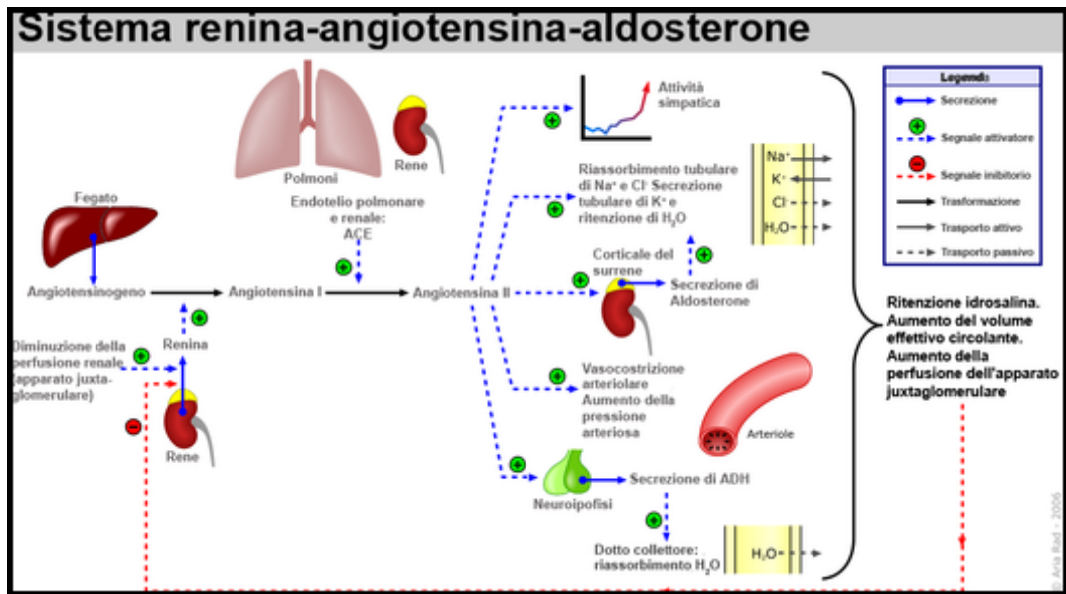


Figura 1.5: Sistema renina-angiotensina-aldosterone



Capitolo 2.

Gli antagonisti dei recettori adrenergici

2.1. Il sito di legame adrenergico

I recettori adrenergici sono dei recettori accoppiati alle proteine G e come tali presentano 7 domini transmembrana, tre dei quali (TM3, TM5 e TM6) prendono parte al sito di legame adrenergico rappresentato schematicamente in figura 2.1 e 2.2. Diversi studi di mutagenesi hanno permesso di evidenziare l'importanza di particolari residui in grado di stabilire legami con i ligandi endogeni (ovvero adrenalina e noradrenalina). Rivestono particolare importanza: un residuo di acido aspartico (Asp-113), uno di fenilalanina (Phe-290) e due residui di serina (Ser-207 e Ser-204) a livello del sito attivo. I residui di serina, interagiscono con i gruppi ossidrilici dell'anello fenolico delle catecolammine attraverso interazioni di tipo idrogeno, il nucleo aromatico della fenilalanina interagisce con la porzione aromatica delle catecolammine attraverso interazioni di Van der Waals e l'aspartato stabilisce un legame ionico con l'azoto protonato della catena aminica. Un'ulteriore interazione ad idrogeno si stabilisce tra il recettore e la funzione alcolica che è presente sulla catena alchilica di adrenalina e noradrenalina [13].

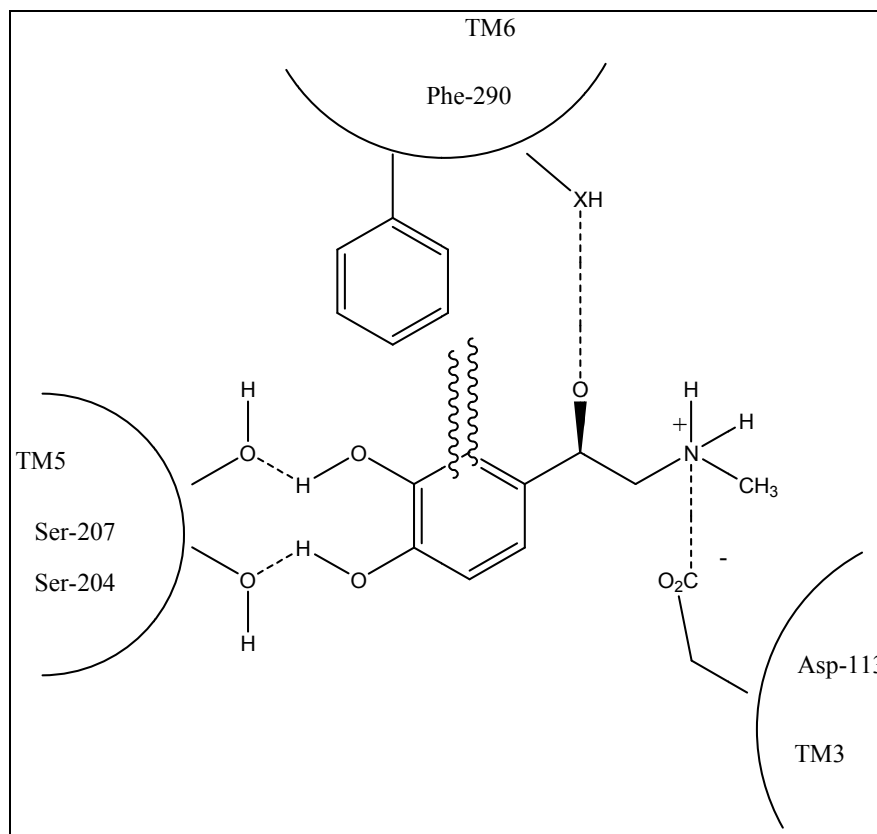


Figura 2.1: Sito di legame adrenergico

esterno

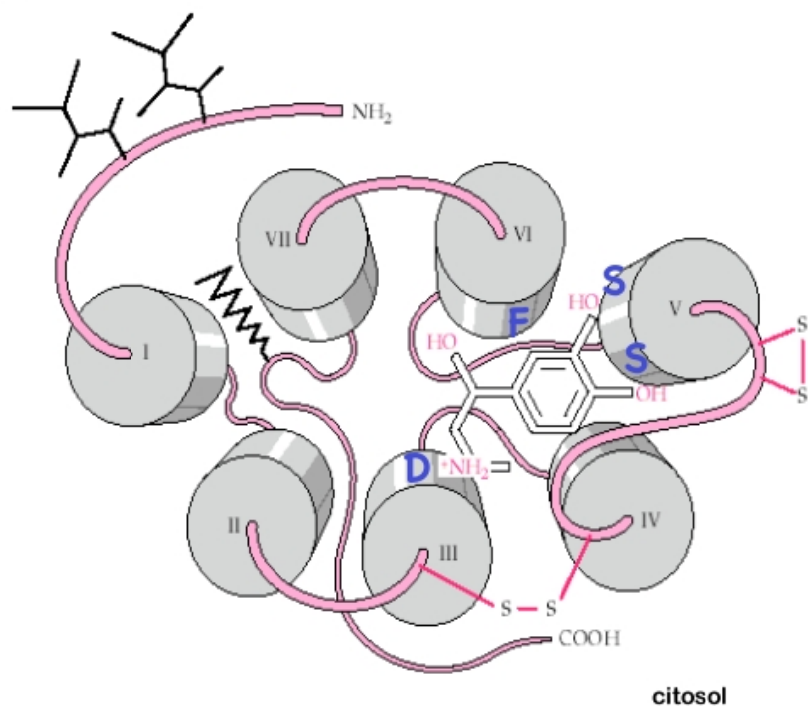


Figura 2.2: Sito di legame adrenergico

2.2. Relazioni struttura-attività

L'importanza delle interazioni sopra descritte vengono fornite da studi di relazione struttura-attività. Tutti i composti sono dei derivati fenilici dell'aminoetanolo nei quali generalmente viene mantenuto l'ossidrilico del prototipo noradrenalina. La struttura base della feniletanolamina è essenziale per l'azione sul recettore α_1 . Gli analoghi che non contengono il gruppo OH benzilico si comportano soltanto da simpaticomimetici indiretti. Il margine di variabilità di questo tipo di composti è perciò particolarmente ristretto, in quanto non sono, inoltre, possibili modificazioni sostanziali dei sostituenti sull'atomo di azoto. Di seguito verranno messe in evidenza l'importanza della funzione alcolica, del sistema catecolico e del gruppo amminico protonato (figura 2.3).

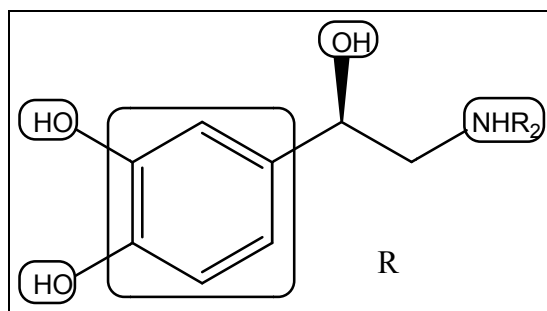


Figura 2.3: Gruppi liganti le catecolamine

La funzione alcolica.

La noradrenelina e l'adrenalina presenti a livello fisiologico sono nella forma (R) (o forma D-(-)). L'attività biologica è quasi esclusivamente dovuta a questo enantiometro. Le forme (S) non naturali sono 20-50 volte meno attive e anche per gli analoghi di sintesi si hanno gli stessi rapporti, cioè l'attività risiede quasi esclusivamente nell'isomero, con la stessa configurazione del gruppo OH presente nella noradrenalina o nell'adrenalina. Il gruppo alcolico secondario è implicato in un'interazione di tipo legame idrogeno, quindi la funzione alcolica è indispensabile per l'attività tanto è vero che composti analoghi privi di questo gruppo o con gruppi OH metilati nella stessa posizione sono inattivi.

La funzione amminica.

Normalmente, l'ammina è protonata a pH fisiologico e la presenza della carica positiva risulta importante, tant'è vero che una sostituzione dell'atomo di azoto con un atomo di carbonio si traduce in una spiccata riduzione dell'attività. Essa è altresì influenzata dal numero dei sostituenti presenti sull'atomo di azoto stesso: le amine primarie e secondarie danno luogo ad una buona attività adrenergica, mentre le amine terziarie e i sali d'ammonio quaternari sono inattivi.

Gli ossidrilici fenolici.

I gruppi ossidrilici fenolici sono estremamente importanti per l'attività. E' per questo motivo che molecole quali ad esempio la tiramina, l'amfetamina [14] e l'efedrina non presentano alcuna affinità per i recettori adrenergici (fig. 2.4). D'altra parte i gruppi idrossilici fenolici possono essere rimpiazzati da altri gruppi, gruppi capaci di dare vita a legami idrogeno con il sito di legame. In particolare l'idrossile catecolico situato in meta, può essere rimpiazzato da diversi gruppi come: CH_2OH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, NH_2 , NHMe , NHCOR o NHSO_2R .



La presenza dei sostituenti alchilici.

La presenza di sostituenti alchilici sulla catena laterale che connette il nucleo aromatico all'amina, riduce l'attività adrenergica tanto sui recettori α quanto su quelli β . Ciò potrebbe essere giustificato dall'ingombro sterico degli eventuali sostituenti che ostacolerebbe il legame idrogeno tra il residuo alcolico ed il residuo amminoacidico sul sito attivo impedendo alla molecola di assumere la conformazione attiva nello spazio [15]. In figura 2.4 alcuni esempi di sostanze la cui azione adrenergica è dovuta ad un meccanismo indiretto piuttosto che all'azione diretta sul recettore.

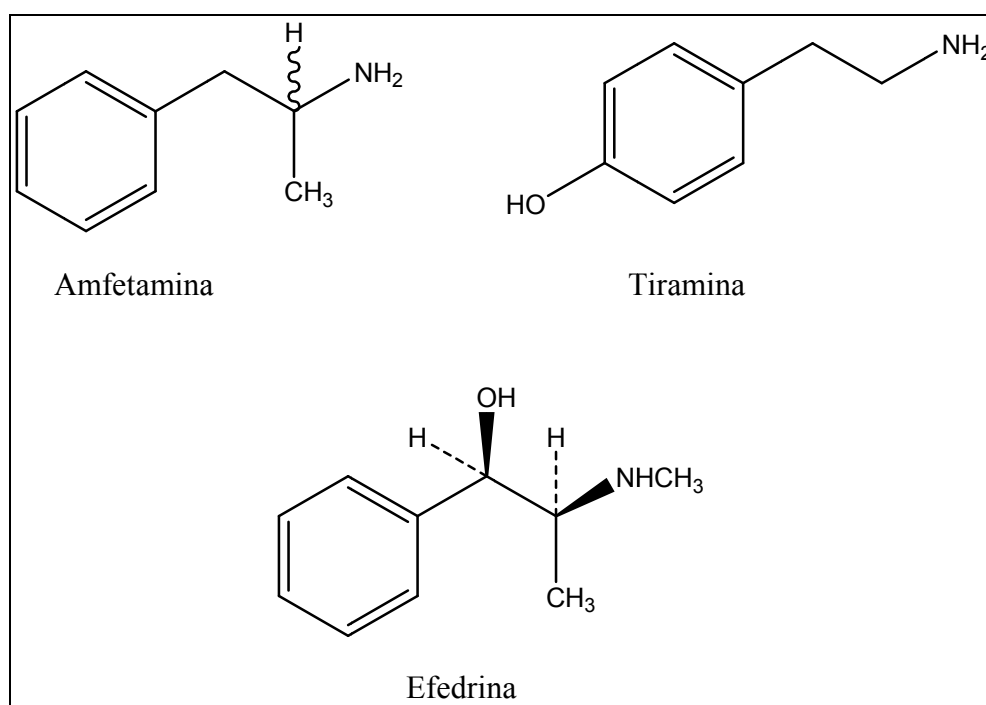


Figura 2.4: Tiramina, Amfetamina, Efedrina

2.2.2. La selettività dei recettori adrenergici α o β

La presenza di un sostituito N-alchile.

Numerosi studi di letteratura hanno dimostrato che, mentre l'adrenelina è in grado di esercitare un'attività sui recettori α e β comparabile, la noradrenalina lega preferibilmente i recettori α ed è meno attiva sui β . Questa osservazione permette di concludere che la presenza di un sostituito N-alchilico sul gruppo amminico gioca un ruolo importante sulla selettività recettoriale. Studi successivi più approfonditi hanno dimostrato che l'aumentare delle dimensioni del sostituito N-alchilico, si traduce in una riduzione dell'attività sui recettori α e parallelamente in un'esaltazione dell'attività dei recettori β . Infatti, l'isoprenalina (o isoprotenerolo) [13] (fig. 2.5) è dotata di



maggior affinità nei confronti dei recettori β ed è completamente priva di affinità su quelli α .

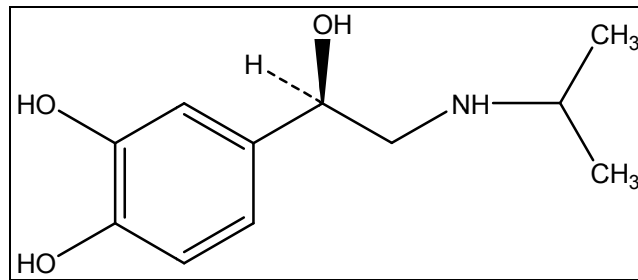


Figura 2.5: Isoprenalina

La presenza di un gruppo N-alchilico voluminoso (ad esempio un gruppo *iso*-propile o *ter*-butile) è particolarmente favorevole per l'affinità β a conferma del fatto che il recettore β adrenergico possiede una tasca idrofobica all'interno della quale si può adagiare un gruppo alchilico voluminoso, tasca non presente nel recettore α (figura 2.6).

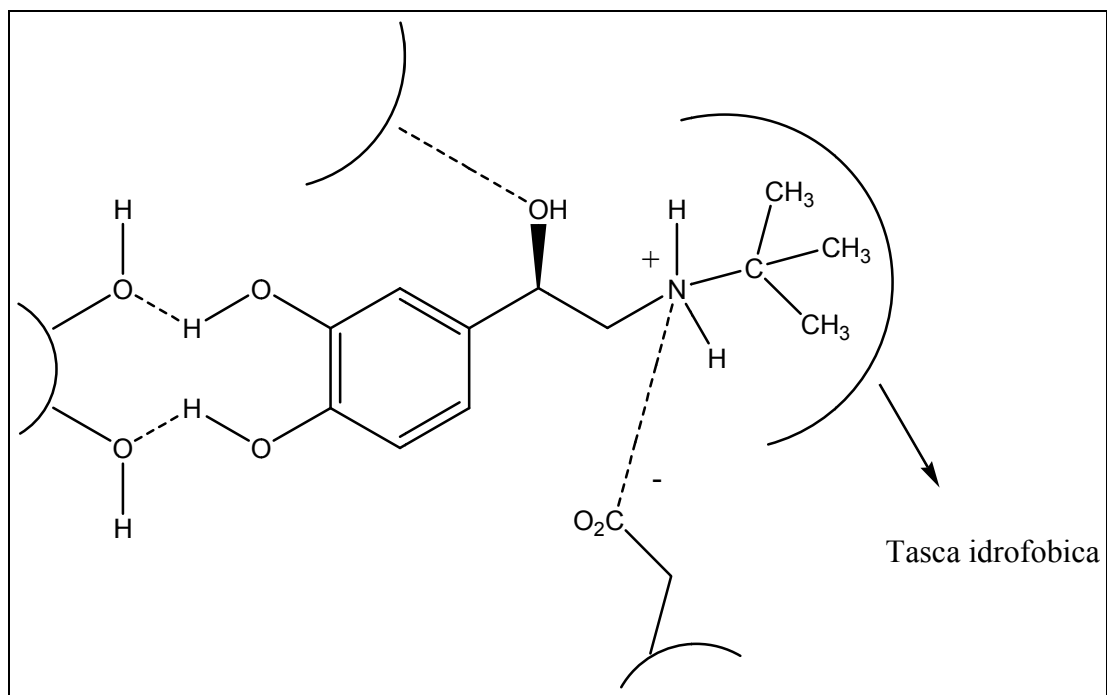


Figura 2.6: Rappresentazione schematica del recettore beta-adrenergico



La presenza di un sostituito metile in α .

La presenza di un gruppo metile in posizione α (per esempio nel caso dell' α -metilnoradrenalina, figura 2.7) accentua la selettività verso i recettori α_2 .

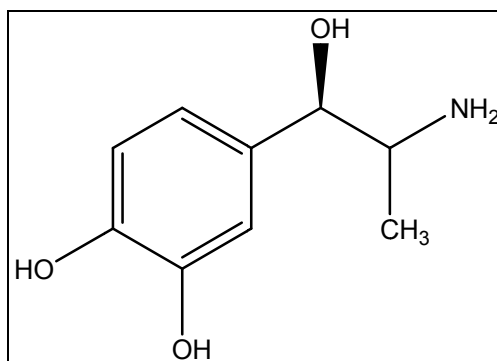


Figura 2.7: α -metil noradrenalina

L'estensione della catena alchilica.

Come spiegato precedentemente, la presenza di *iso*-propile e *ter*-butile sull'azoto della funzione aminica è particolarmente favorevole per l'affinità β . L' aumento della lunghezza della catena alchilica non offre alcun vantaggio ai fini dell'affinità mentre la situazione cambia se si aggiunge un gruppo funzionale polare alla sua estremità. In particolare, l'aggiunta di un gruppo idrossifenile all'estremità di una catena N-alchile a due atomi di carbonio, conduce ad uno spiccato aumento dell'attività (figura 2.8). Ciò dimostra che la molecola ha probabilmente accesso ad una regione polare presente in un sito un po' più distante con il quale è possibile la formazione di un ponte ad idrogeno. La molecola rappresentata di seguito ha un'attività 800 volte maggiore rispetto alla noradrenalina [15].

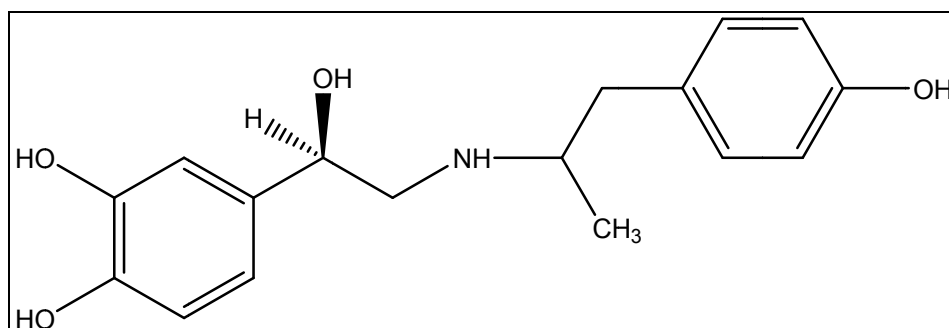


Figura 2.8: Esempio di estensione della catena alchilica

2.3. Gli antagonisti dei recettori adrenergici

2.3.1. Gli α -bloccanti

Da un punto di vista terapeutico gli α -bloccanti (o α -simpaticolitici) non sono dei farmaci particolarmente utilizzati, il loro impiego è confinato prevalentemente agli antagonisti α_1 -selettivi adoperati nel trattamento dell'ipertensione e nel controllo dell'insufficienza renale. La prazosina [16,17] (figura 2.9) è stata il primo α_1 -bloccante selettivo utilizzato in caso di ipertensione, essa ha però dimostrato una breve durata d'azione, da qui la necessità di sintetizzare molecole caratterizzate invece da una durata d'azione più lunga le quali offrirono il vantaggio di non dover essere somministrate più volte nel corso della giornata. Tra queste vanno annoverate Doxazosina [18,19] e Terazosina (figura 2.10): tali molecole determinano un abbassamento della pressione arteriosa bloccando gli effetti di adrenalina e noradrenalina a livello dei recettori α_1 della muscolatura liscia vasale. Ciò induce un rilassamento della muscolatura stessa e quindi una vasodilatazione che si traduce in un abbassamento della pressione.

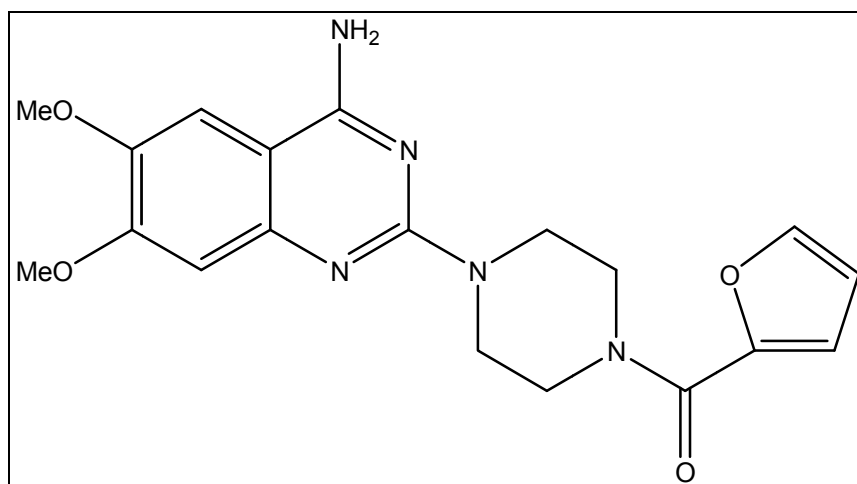


Figura 2.9: Prazosina

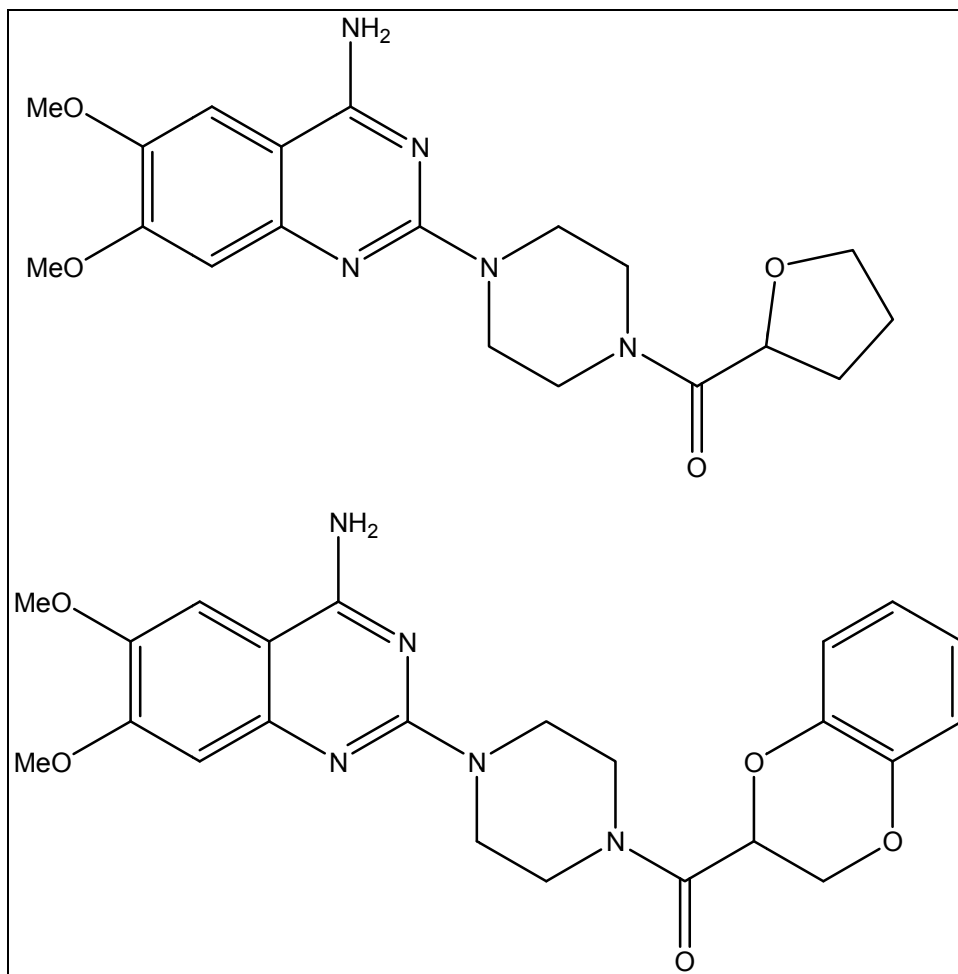


Figura 2.10: Terazosina, Doxazosina

2.3.2. I β -bloccanti

2.3.2.1. I β -bloccanti di prima generazione

Gli antagonisti dei recettori adrenergici che sono maggiormente utilizzati oggi in medicina sono senza dubbio i β -bloccanti (o β -simpaticolitici). Tali medicinali furono progettati allo scopo di antagonizzare i recettori β_1 -adrenergici cardiaci. Il primo problema affrontato fu quello di progettare delle molecole che fossero selettive nei confronti dei recettori β -adrenergici, discriminando quindi quelli α . La molecola designata come capostipite di questa classe di farmaci fu l'isoprenalina (o isoprotenerolo, figura 2.11).

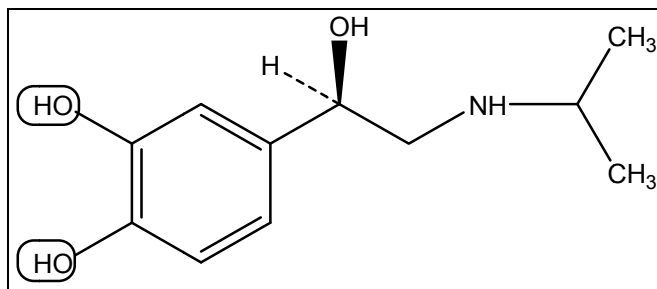


Figura 2.11: Isoprotenerolo

Benchè l'isoprenalina [20] agisse da agonista e non da antagonista, essa era in grado di attivare solo i recettori β . Si è cercato allora di sfruttare tale specificità modificandone la struttura al fine di ottenere un'antagonista. Prima di tutto i due gruppi idrossilici catecolici sono stati sostituiti con due atomi di cloro con ottenimento della dicloroisoprenalina (figura 2.12).

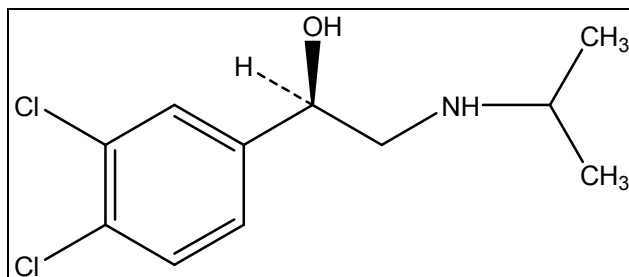


Figura 2.12: Dicloroisoprenalina

Tale molecola pur comportandosi da agonista parziale, ovvero un agonista che non è in grado di indurre una risposta massimale (essa esercita una certa attività agonista ma non paragonabile a quella di un agonista puro), era in grado di ridurre l'accesso dei ligandi endogeni ai recettori, agendo in ultima analisi come un antagonista nonché dando riduzione dell'attività adrenergica.

Lo step successivo fu quello di eliminare tale attività agonista parziale: la strategia utilizzata fu quella di aggiungere un ciclo aromatico supplementare in sostituzione agli atomi di cloro con ottenimento di un nucleo naftalenico. La molecola sintetizzata fu il pronetalolo (figura 2.13) che pur mantenendo un'attività agonista parziale, è storicamente importante in quanto primo β -bloccante utilizzato in clinica nel trattamento di angina pectoris, aritmia e ipertensione [21].

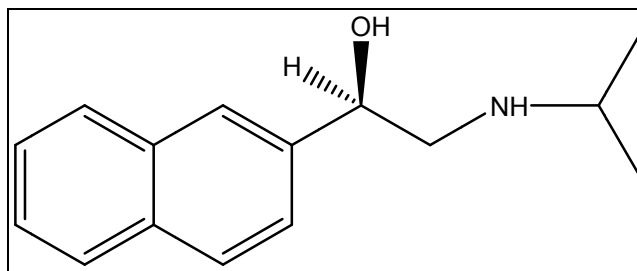


Figura 2.13: Pronetalolo

Lo stadio successivo ha riguardato l'estensione della catena che lega il ciclo naftalenico con la porzione etanolaminica [13] (figura 2.14)

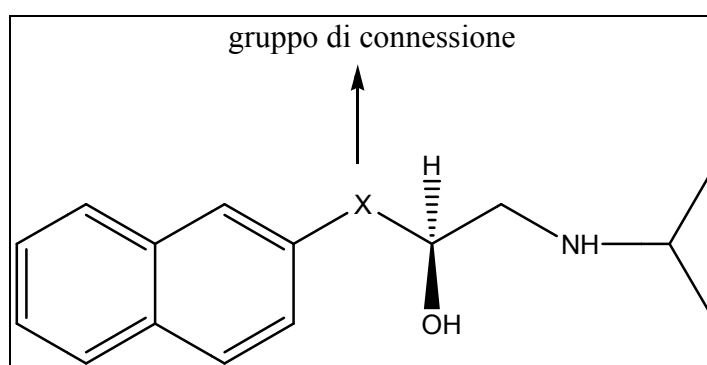


Figura 2.14: Estensione della catena etanolaminica

arrivando al propranololo, a struttura arilossipropanolaminica (figura 2.15), la quale pur non avendo attività di antagonista puro, risultava essere da 10 a 20 volte più attivo del pronetalolo [21]. Il propranololo, inizialmente utilizzato per il trattamento dell'angina pectoris, è presto divenuto il lead compound tutti gli altri β -bloccanti. Sebbene tale molecola venga somministrata sottoforma racemica, l'enantiomero attivo, responsabile dell'attività terapeutica, è l'enantiomero S.

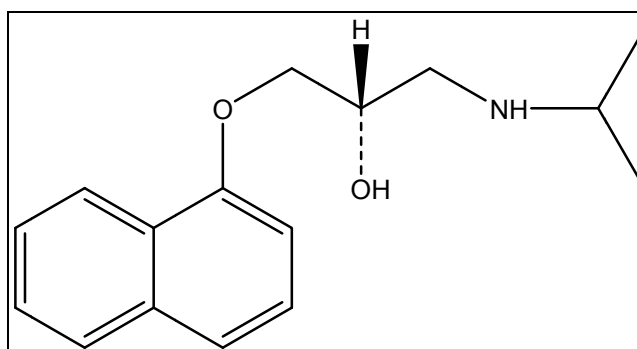


Figura 2.15: Propranololo

2.3.2.2. Relazioni struttura-attività delle arilossipropanolamine

Un largo numero di molecole a struttura arilossipropanolaminica (fig. 2.16) sono state successivamente sintetizzate

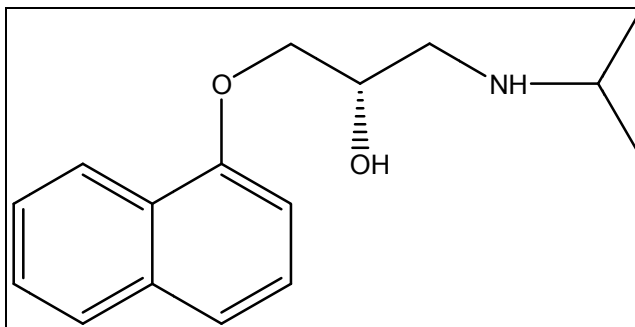


Figura 2.16: Struttura arilossipropanolaminica

Dallo studio delle relazioni struttura-attività è emerso che:

- La presenza di un gruppo *N*-alchile voluminoso e ramificato (isopropile, ter-butile) favorisce l'attività β -antagonista. Ciò suggerisce che esso sia responsabile di un'interazione di tipo idrofobico tra tale gruppo e una tasca presente sul sito recettoriale.
- La porzione ciclica può essere ampiamente modificata sia come sistema ciclico stesso che riguardo i sostituenti presenti. Tra le strutture di tipo arilossipropanolaminico numerosi derivati attivi contengono sistemi carbociclici ed eterociclici diversamente sostituiti (Es. pindololo e timololo) figura 2.17 [5].

Il pindololo è un antagonista β -adrenergico non selettivo con attività simpaticomimetica intrinseca.

Sebbene siano disponibili solo dati limitati, i β -bloccanti con debole attività agonista parziale possono causare minore riduzione della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa a riposo. Quindi tali farmaci possono essere preferiti, come agenti antiipertensivi, in soggetti con riserva cardiaca diminuita o con tendenza a bradicardia.

Il pindololo è una molecola interessante per la sua attività di β agonista parziale. Ciò nondimeno, esso è efficace nelle principali applicazioni dei β -bloccanti (ipertensione e angina). Sebbene sia meno probabile che questo agonista parziale provochi bradicardia e modificazioni dei lipidi plasmatici in confronto agli agonisti puri, il significato clinico globale dell'attività simpatico mimetica intrinseca rimane incerto. Il pindololo può



inoltre potenziare l'azione dei farmaci antidepressivi, forse come risultato di effetti sul sistema serotoninergico.

Il timololo è un potente antagonista β -adrenergico non selettivo, esso non possiede attività simpaticomimetica intrinseca. Il timololo trova applicazione nel trattamento del glaucoma anche se la formulazione oculare può essere assorbita sistemicamente in modo significativo; gli effetti collaterali possono insorgere in pazienti predisposti, come quelli con asma o con insufficienza cardiaca congestizia [5].

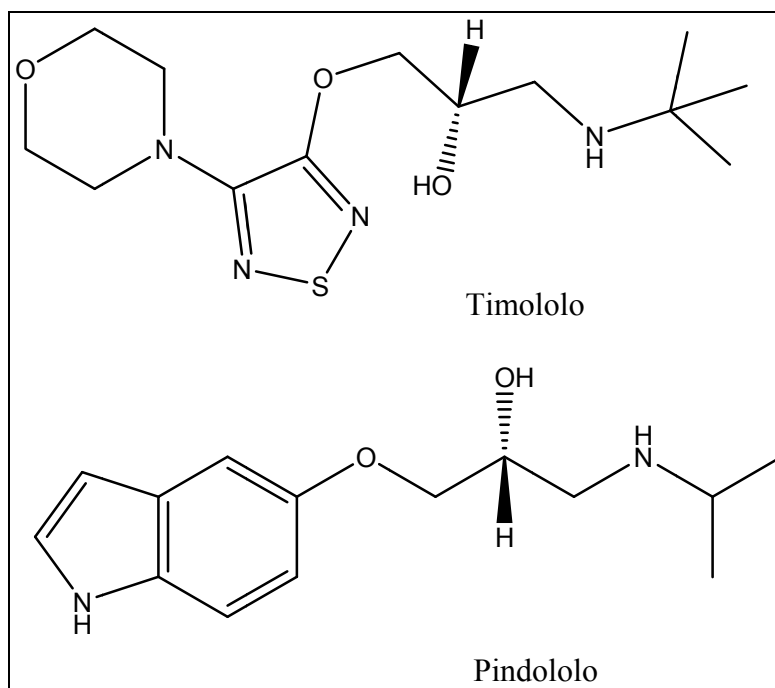


Figura 2.17: Timololo, Pindololo

- L'introduzione di un sostituito sul metilene della catena laterale aumenta la stabilità dal punto di vista metabolico ma diminuisce l'attività biologica,
- La funzione alcolica sulla catena laterale è indispensabile per mantenere l'attività,
- La presenza di sostituenti più ingombranti rispetto ad un gruppo isopropilico o tert-butilico riduce l'efficacia,
- L'aggiunta di un gruppo ariletilenico, quali $\text{CMe}_2\text{-CH}_2\text{Ph}$ o $\text{CHMe-CH}_2\text{Ph}$, porta dei benefici all'attività,
- L'azoto della funzione aminica deve essere secondario.



2.3.2.3. Gli effetti clinici dei β -bloccanti di prima generazione

Gli effetti del propranololo e degli altri β -bloccanti di prima generazione dipendono dall'attività del paziente. In particolare, a riposo il propranololo modifica di poco il ritmo e la gittata cardiaca piuttosto che la pressione arteriosa, se invece il paziente fa uno sforzo o si agita, esso è in grado di attenuare gli effetti dell'adrenalina circolante. Inizialmente i β -bloccanti sono stati impiegati prevalentemente nel trattamento dell'angina pectoris, ma successivamente hanno mostrato un'attività antipertensiva inaspettata che li ha resi i farmaci di elezione per il trattamento dell'ipertensione primaria [22].

L'effetto antipertensivo è la risultante di una serie di azioni esercitate a diversi livelli nell'organismo: effetti su cuore (riducono la gittata cardiaca e la frequenza) e sui vasi sanguigni, sul sistema renina-angiotensina, e sul Sistema Nervoso Centrale (SNC) riducono gli effetti periferici dovuti al sistema simpatico quali i tremori. Alle dosi normalmente utilizzate, in individui sani con pressione normale, questi farmaci, in genere, non provocano ipotensione e generalmente ad essi sono associati un effetto inotropo e cronotropo negativo. Il rallentamento della conduzione atrioventricolare, con allungamento dell'intervallo PR nell'elettrocardiogramma, è il risultato del blocco adrenergico nel nodo atrioventricolare. Inoltre, a livello cardiaco l'azione fondamentale mediata dai recettori β_1 è un'azione prevalentemente stimolatoria accoppiata ai movimenti del calcio che modificando le conduttanze ioniche sulla membrana determinano una variazione dello stato di eccitabilità. Ciò si traduce in un effetto batmotropo, cronotropo e dromotropo positivi [23] oltre che ad uno stimolo del consumo di ossigeno e ad un aumento del lavoro del cuore. Nel sistema vascolare, il blocco dei recettori β si oppone alla vasodilatazione mediata dai recettori β_2 . Ciò può tradursi inizialmente in un aumento delle resistenze vascolari periferiche, in quanto gli effetti mediati dai recettori α non trovano opposizione allorché il sistema simpatico viene attivato dall'abbassamento della pressione arteriosa [24,25].

I farmaci β -bloccanti antagonizzano la liberazione di renina causata dal sistema nervoso simpatico. Mentre gli effetti di questi farmaci possono includere un aumento delle resistenze periferiche, la loro somministrazione cronica porta ad una caduta delle resistenze periferiche in pazienti ipertesi [26,27].



I β -bloccanti di prima generazione sono altresì caratterizzati da numerosi effetti collaterali. Tra i più rilevanti vanno annoverati:

- Broncocostrizione dovuta ad un'azione sui recettori β_2 localizzati sulla muscolatura liscia bronchiale. Il blocco di questi recettori può portare ad un aumento delle resistenze delle vie aeree, specialmente nei pazienti affetti da patologie respiratorie. Pertanto gli antagonisti selettivi dei recettori β_1 , sono da preferire agli antagonisti β non selettivi qualora si desideri il blocco dei recettori β_1 cardiaci, ma non quello dei recettori β_2 . Tuttavia, ad oggi, nessuno dei farmaci disponibili è sufficientemente specifico da evitare completamente l'interazione con i recettori β_2 [10,11]. Di conseguenza si dovrebbe evitare l'uso di questi farmaci nei pazienti asmatici o almeno associare il loro utilizzo ad altri farmaci, quali i diuretici, allo scopo sia di aumentarne l'effetto terapeutico sia di ridurne gli effetti collaterali.
- Affaticamento degli arti a causa della diminuita gittata cardiaca
- Diversi effetti a livello del SNC quali vertigini e sedazione, disturbi del sonno, depressione, in particolare per i β -bloccanti che a causa della loro struttura lipofila sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (quali per es. pindololo e propanololo)
- Insufficienza cardiaca ovvero riduzione della frequenza che può rivelarsi un problema per i pazienti predisposti. Il blocco dei recettori β deprime la contrattilità e l'eccitabilità del miocardio. Nei pazienti con funzione miocardica alterata, la gittata cardiaca può dipendere dallo stimolo simpatico. Se quest'ultimo è rimosso dal blocco beta, ne può risultare uno scompenso cardiaco. Occorre cautela nell'usare gli antagonisti β recettoriali in pazienti con insufficienza cardiaca congestizia compensata, anche se l'uso a lungo termine di questi farmaci può prolungare la sopravvivenza. Anche se, in una situazione d'emergenza, un effetto indesiderato di un β -bloccante a carico del cuore può essere fronteggiato direttamente con isoprenalina o con glucagone. Dosi molto piccole di un β -bloccante possono indurre una grave insufficienza cardiaca in un soggetto particolarmente suscettibile.



- Un'inibizione del rilascio noradrenalina a livello delle sinapsi.

2.3.2.4. β -bloccanti di seconda generazione (bloccanti β_1 -selettivi)

Il propranololo è un β -simpaticolitico non selettivo. Ciò costituisce un problema per i pazienti asmatici in quanto l'azione sulla muscolatura liscia bronchiale provoca contrazione della stessa e conseguentemente ostruzione delle vie respiratorie. Ciò nonostante, considerati i numerosi studi associati al propranololo stesso, esso è ancor oggi visto come un prototipo.

Un esempio di farmaco β -1 selettivo è il practololo (figura 2.18). Esso non determina effetti collaterali sui bronchi e inoltre a causa della struttura meno lipofila del propranololo non raggiunge il SNC. Nonostante questi vantaggi, il practololo fu ritirato dal commercio dopo qualche anno a causa di effetti collaterali osservati su un largo numero di pazienti, quali eruzioni cutanee, problemi a livello oculare e peritonite. È stato successivamente dimostrato che il gruppo acetamidico in posizione para sull'anello aromatico conferiva alla molecola una conformazione tale per cui essa era in grado di formare una ulteriore interazione attraverso un legame idrogeno con il recettore β -1 adrenergico. Lo stesso gruppo invece in posizione orto o meta, non conferiva alla molecola le stesse proprietà. Tale gruppo è stato successivamente rimpiazzato da altri sostituenti in grado di realizzare questo stesso legame dando luogo ai cosiddetti β -bloccanti cardioselettivi. Tra questi vanno annoverati acebutololo, atenololo, metoprololo e betaxololo (figura 2.19).

L'acebutololo è un antagonista adrenergico β_1 -selettivo con una certa attività simpaticomimetica intrinseca utilizzato nel controllo della pressione arteriosa e nelle aritmie sopraventricolari. La dose iniziale dell'acebutololo nel trattamento dell'ipertensione è solitamente di 400 mg al giorno; può essere somministrato in dose singola, ma possono essere necessarie due dosi separate per un adeguato controllo della pressione arteriosa. Si raggiunge solitamente una risposta ottimale con dosi 400-800 mg al giorno. Nel trattamento delle aritmie sopraventricolari è necessario somministrare il farmaco due volte al giorno [28].

L'atenololo e il metoprololo sono farmaci più sicuri in quei pazienti in cui il propranololo induce broncocostrizione. Dal momento, peraltro, che la loro selettività per i recettori β_1 è molto modesta, dovrebbero essere usati con molta cautela, o addirittura non usati, in pazienti con storia d'asma. Tuttavia i benefici possono superare i rischi in pazienti selezionati affetti da bronco pneumopatia cronica ostruttiva, ad



esempio quelli con infarto del miocardio. Nei pazienti con diabete o con vasculopatie periferiche, qualora sia necessaria una terapia con β -bloccanti, è preferibile utilizzare antagonisti selettivi β_1 , poiché probabilmente i recettori β_2 hanno un importante ruolo nel fegato (recupero dell'ipoglicemia) e nei vasi sanguigni (vasodilatazione).

L'atenololo è privo di attività simpaticomimetica intrinseca ed essendo caratterizzato da una struttura piuttosto idrofila, sembra che riesca ad attraversare la barriera ematoencefalica solo in misura ridotta. È stato dimostrato che esso, in combinazione con un diuretico è efficace in pazienti anziani con ipertensione sistolica isolata [29].

Il metoprololo è anch'esso privo di attività simpaticomimetica intrinseca. Nel trattamento dell'ipertensione il farmaco risulta efficace, in alcuni casi, anche quando somministrato una sola volta al giorno, sebbene venga generalmente utilizzato in due dosi giornaliere. Le forme di dosaggio convenzionali del metoprololo sono state ampiamente riconosciute valide per il trattamento dell'ipertensione e dell'ischemia cardiaca. Recentemente sono state sviluppate nuove formulazioni che sono in grado di mantenere relativamente costante la velocità di rilascio del farmaco nell'arco delle 24 ore [30].

Il betaxololo è utilizzato nel trattamento dell'ipertensione, dell'angina pectoris e del glaucoma.

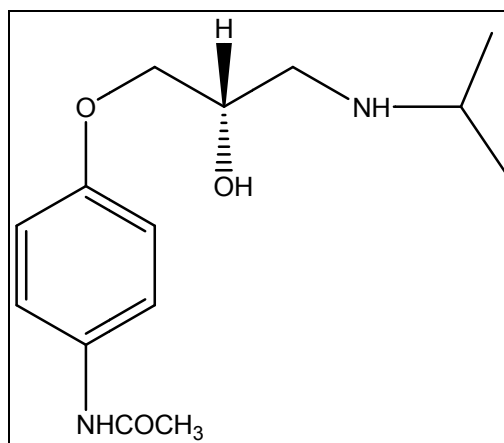


Figura 2.18: Practololo

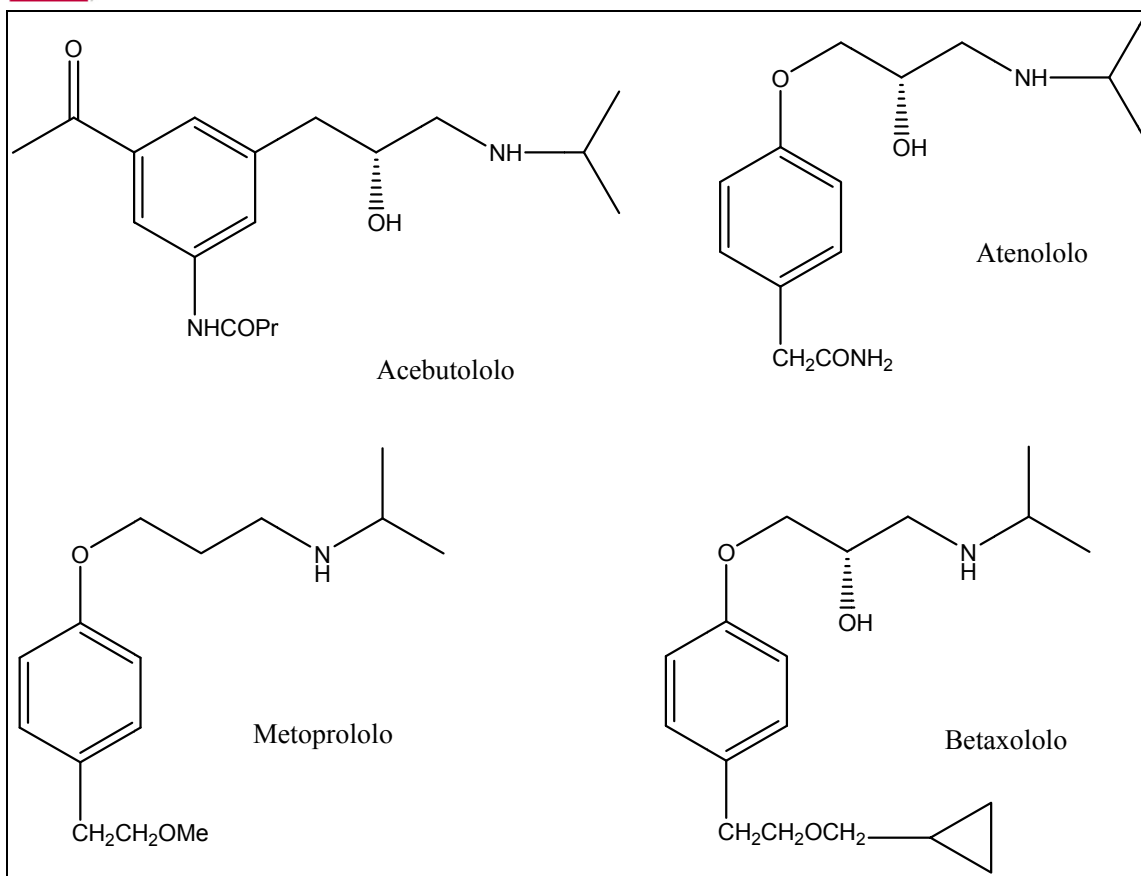


Figura 2.19: beta-bloccanti di seconda generazione

2.3.2.5. I β -bloccanti di terza generazione

I beta bloccanti di terza generazione, oltre ad essere dotati di una spiccata cardioselettività, presentano anche ulteriori proprietà “pleiotropiche”. In particolare il nebivololo (figura 2.20) sembrerebbe svolgere un’azione vasodilatatrice mediata dall’ossido nitrico che avrebbe ripercussioni positive sullo spessore medio-intimale e sulla rigidità delle arterie, ben noti e riconosciuti fattori di rischio per malattie cardiovascolari. Ai beta bloccanti con proprietà vasodilatatorie sono state associate proprietà anti-proliferative, anti-infiammatorie ed anti-ossidanti, che contribuiscono ad avvalorarne l’impiego nel trattamento dell’ipertensione arteriosa e dello scompenso cardiaco [31].

I β -bloccanti di terza generazione, dal punto di vista strutturale, sono caratterizzati dalla presenza di gruppi arilalchilici sull’azoto in grado di creare un legame idrogeno addizionale. Oltre al nebivololo i farmaci più rappresentativi sono epanololo, primidololo e xamoterolo in figura 2.21 (quest’ultimo presenta un’attività di agonista β_1 -parziale) [32,33].

L’epanololo ha mostrato la sua efficacia nel trattamento dell’insufficienza cardiaca cronica, è un farmaco β -1 bloccante selettivo con attività simpatico mimetica intrinseca



utile anche nella prevenzione dell'angina pectoris [34]. Il suo ruolo specifico nel trattamento dell'ischemia e nella disfunzione ventricolare sinistra non è ben noto ma, di fatto, determina una riduzione nella produzione di catecolamine [35].

Uno studio condotto su 15 pazienti adulti con ipertensione moderatamente grave ha messo in relazione diminuzioni significative di tutti i parametri base cardiaci con l'assunzione di dosi crescenti di primidololo [36].

Lo xamoterolo è un agonista parziale del recettore β -1: esso esercita attività agonista in condizioni di riposo (o di minima attivazione simpatica), mentre esercita invece attività antagonista in situazioni di sforzo, e comunque in tutte le condizioni in cui è elevato il tono simpatico, come ad esempio in caso di scompenso cardiaco grave.

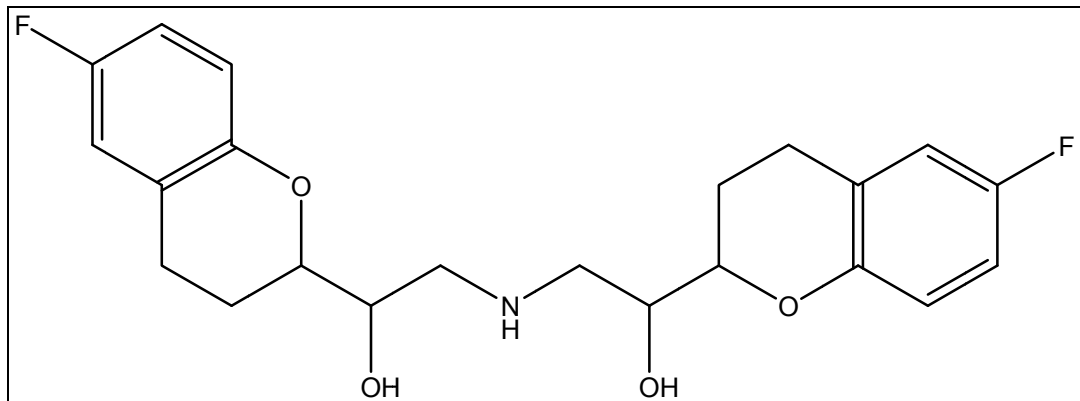


Figura 2.20: Nebivololo

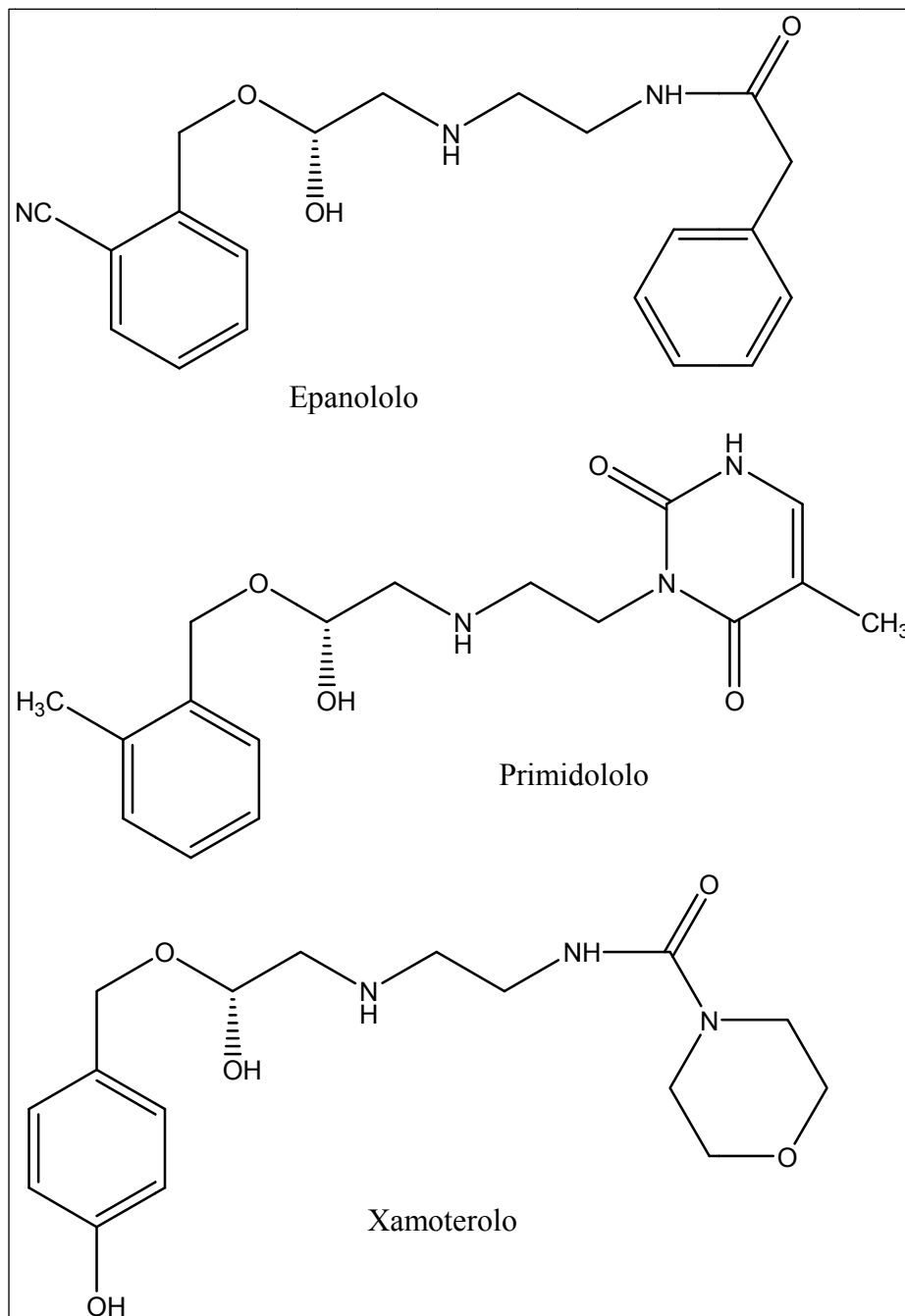


Figura 2.21: Beta-bloccanti di terza generazione

2.3.2.6. Altre applicazioni dei β -bloccanti

I β -bloccanti trovano numerose applicazioni in differenti ambiti. È stato osservato, per esempio, casualmente che la somministrazione sistemica di alcuni di essi riduceva la pressione endoculare nei pazienti glaucomatosi [37]. Successivamente, si trovò che anche la loro somministrazione topica produceva lo stesso effetto. Il meccanismo sembra coinvolgere una ridotta produzione di umor acqueo da parte del corpo ciliare, che è fisiologicamente attivato dall' AMPc. Il Timololo è il farmaco di elezione per uso locale in quanto è sprovvisto di proprietà anestetiche locali ed è un antagonista puro.



Esso pare possedere un'efficacia paragonabile a quella dell'adrenalina nel glaucoma ad angolo aperto. Betaxololo (figura 2.19), carteololo, levobunololo e metipranolo (figura 2.22) sono nuovi beta-bloccanti recentemente approvati per il trattamento del glaucoma [37,38]. Il betaxololo ha il potenziale vantaggio di essere β_1 selettivo; rimane da determinare, però, in qual misura questo vantaggio potenziale possa diminuire gli effetti avversi sistemici. Questo farmaco avrebbe provocato evidente peggioramento di sintomi polmonari nei pazienti predisposti. Anche se la dose massima giornaliera applicata localmente (1 mg) è piccola rispetto alle dosi sistemiche comunemente usate nel trattamento dell'ipertensione o dell'angina (10-60 mg), è possibile che venga assorbita dall'occhio una quantità di timololo sufficiente a causare seri effetti indesiderati a carico del cuore e delle vie aeree in soggetti particolarmente sensibili.

Diversi studi suggeriscono un'utilità del propranololo nel ridurre frequenza ed intensità degli attacchi di emicrania [38]. Altri antagonisti β -adrenergici efficaci nella profilassi dell'emicrania sono metoprololo e probabilmente anche atenololo, timololo e nadololo. Il meccanismo non è noto [38].

Dal momento che la stimolazione adrenergica può esagerare il tremore muscolare, non sorprende che certi tremori siano ridotti dai β -antagonisti. Le manifestazioni somatiche dell'ansia [39] possono essere ridotte da piccole dosi di propranololo, particolarmente se assunto a scopo profilattico [40]. Ad esempio, beneficio è stato riscontrato in musicisti con ansia da prestazione.

Il propranololo è anche utile nel trattamento di alcuni pazienti con sindrome da astinenza da alcool.

C'è anche da ricordare che un'attività adrenergica costituisce un aspetto importante della fisiopatologia dell'ipertiroidismo, specialmente in relazione agli effetti sul cuore. I β -antagonisti possono quindi rilevarsi utili in questa condizione. Gli effetti benefici sono da collegarsi presumibilmente al blocco adrenergico e forse all'inibizione della conversione della tiroxina in triiodotironina nei tessuti periferici. Quest'ultima azione può variare da un β -antagonista ad un altro. Il propranololo è particolarmente efficace nella "tempesta tiroidea", in questo caso, esso è usato con cautela per controllare le tachicardie sopraventricolari che spesso scatenano un'insufficienza cardiaca congestizia. E' stato riscontrato che gli antagonisti del recettore β diminuiscono la pressione della vena porta in pazienti cirrotici. Esistono delle evidenze che indicano come sia il propranololo che il nadololo diminuiscono l'incidenza del primo episodio di sanguinamento di varici esofagee e diminuiscono il tasso di mortalità associato al sanguinamento nella cirrosi.



I β -bloccanti trovano applicazione anche in caso di tumore della midollare del surrene (caratterizzato da una sovrapproduzione di catecolammine).

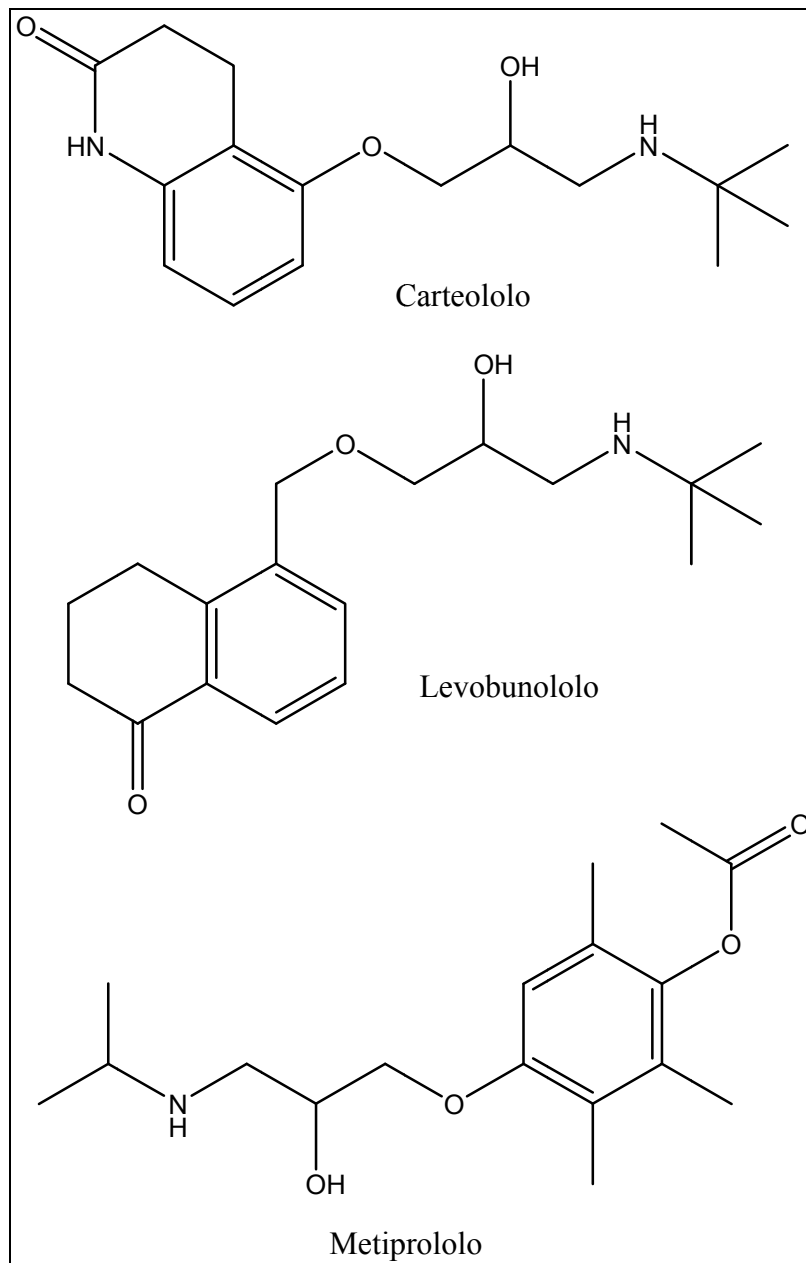


Figura 2.22: Carteololo, Levobunololo, Metiprololo

Capitolo 3

Lo stato dell'arte

3.1. Derivati della 1,8-naftiridina.

Nell'ultimo decennio, la ricerca nel campo dei bloccanti dei recettori β -adrenergici ha avuto ampio sviluppo considerato che le patologie cardiovascolari risultano essere, nei paesi più sviluppati, in rapida crescita. Gli agenti β -bloccanti generalmente appartengono alla classe delle ariletanolamine e arilossipropanolamine e in letteratura sono riportati solo pochi esempi di strutture caratterizzate da un ossigeno di una funzione ossimica legato alla catena laterale propanolaminica, tipica dei beta-bloccanti classici. Tra i β -bloccanti di ultima generazione il composto indicato in figura 3.1 ha dimostrato grande interesse in termini di potenza e selettività. E' stato dimostrato da studi preliminari che il gruppo C=N-O, introdotto a livello della catena laterale, esalta l'attività β -adrenergica [41].

Pertanto, ciò premesso sono state sintetizzate due serie di isomeri (E) e (Z), derivate dalla tetraidro-1,8- naftiridina, allo scopo di valutarne l'attività e la selettività per i recettori β_1 e β_2 , nonché le relazioni struttura-attività.

I risultati farmacologici più rilevanti sono stati ottenuti per i composti indicati nella tabella 3.1.

Tali composti, testati sugli atri di *Cavia Porcellus*, si sono mostrati privi di attività β_1 -agonista, ed in particolare le molecole 1, 2, 3, 4, 5 e 6 hanno mostrato inibizione dell'effetto inotropo positivo indotto dall'isoprotenerolo, quindi antagonismo competitivo. E' risultato che la presenza di alogeni in posizione 6 o 7 dell'anello aromatico aumentava generalmente l'attività bloccante e la selettività sui recettori β_1 . Gli stessi composti, testati su tessuti tracheali di *Cavia Porcellus* hanno invece antagonizzato, sebbene con bassa affinità, l'effetto broncocostrittore dose-dipendente indotto dal practololo, mostrando quindi attività β_2 -agonista.



D'altra parte le molecole in esame si sono mostrate prive di qualunque attività, agonista o antagonista, sui recettori α -adrenergici dimostrata da test effettuati sulla muscolatura liscia del dotto deferente di ratto stimolato da noradrenalina.

Inoltre, l'attività dei suddetti composti si è rilevata indipendente dalla conformazione (E)-(Z) della catena laterale [41].

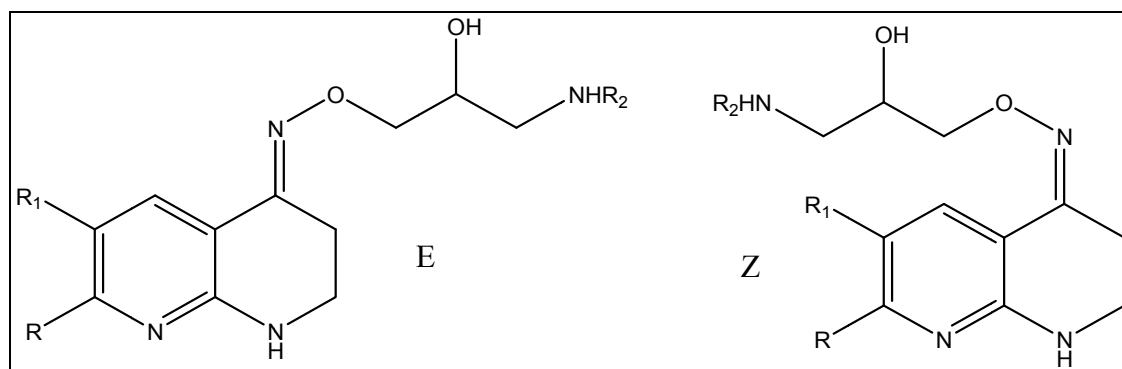
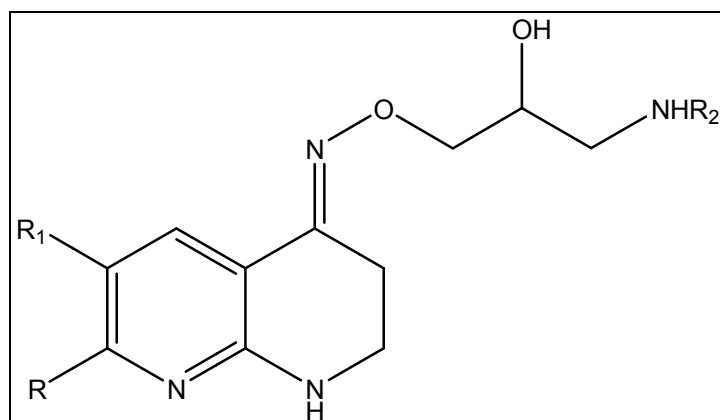


Figura 3.1: Esempio di beta-bloccante a struttura arilossipropolanminica



Composti	R	R ₁	R ₂
1	Br	H	<i>t</i> -Bu
2	Cl	H	<i>i</i> -Pr
3	CH ₃	Br	<i>i</i> -Pr
4	Br	Br	<i>i</i> -Pr
5	Br	Br	<i>t</i> -Bu
6	Br	Br	<i>t</i> -Bu

Tabella 3.1: (E)-4(1H)-[(3-alcilamino-2-idrossipropil)ossimino]-2,3-diidro-1,8-naftiridinio derivati



Sulla base dei risultati ottenuti dagli studi preliminari, sopra descritti, sono state effettuate modificazioni strutturali a livello dell'atomo di azoto della catena laterale attraverso introduzione di gruppi N-alchilici di diverse dimensioni, sostituzione dell'atomo di azoto in posizione 1 del nucleo dell'1,8-naftiridina con un atomo di zolfo, e introduzione di un gruppo metilico in posizione 7 dell'anello aromatico.

Tali modificazioni hanno evidenziato variazioni rilevanti dell'attività dei composti in esame nei confronti dei diversi sottotipi recettoriali.

Dettagliatamente, sostituenti sull'atomo di azoto della catena laterale, quali *iso*-propile e *tert*-butile hanno determinato un aumento della selettività nei confronti dei recettori β_1 , mentre sostituenti quali ad esempio gruppi benzilici o feniletalici spostano l'attività da β_1 verso i β_2 . I derivati tiopirano piridinici invece hanno mostrato una perdita di selettività per cui bloccano con potenza paragonabile i vari sottotipi recettoriali (β_1 , β_2 e β_3) [42].

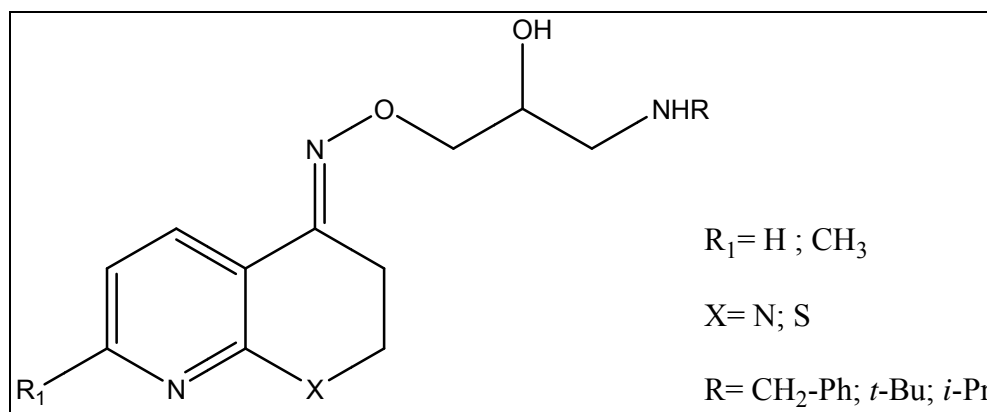


Figura 3.2: Derivati dell'1,8-naftiridina

3.2. Derivati 3,4-diidro-1(2H)-benzoxazepine

Ulteriori studi hanno convalidato i risultati sopra descritti identificando come β -bloccanti di ultima generazione, strutture di tipo 3,4-diidro-1(2H)benzoxepin-5-onica (figura 3.3), nelle quali la porzione arilica risulta modificata, e la catena laterale risulta essere conservata e necessaria per legare il recettore adrenergico [43].

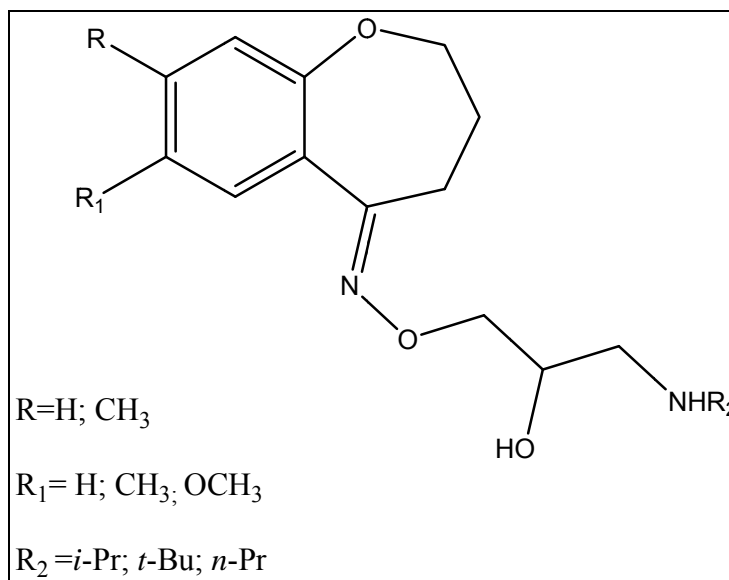
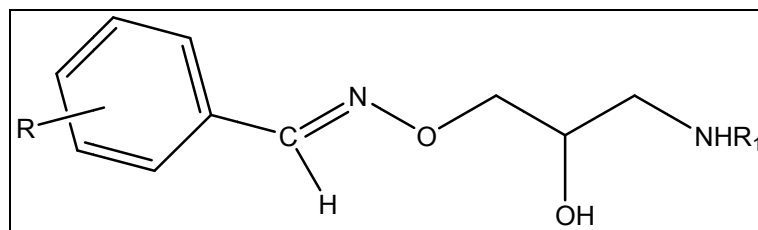


Figura 3.3: Derivati 5-[(3-alcilamino-2-idrossipropil)ossimino]-3,4-diidro-1(2H)benzossopine diversamente sostituite

3.3. Derivati 3-(benziliden)aminossipropanolamine

Importante per la selettività recettoriale risulta essere la sostituzione del sistema aromatico. Come riportato, per esempio, la presenza di un gruppo idrossilico o metossilico varia la selettività recettoriale anche in funzione della sua posizione in *orto*, *meta* o *para*. Come si evince dalla tabella 3.2, i composti 1c e 1d possiedono un'apprezzabile attività β -bloccante su entrambi i tipi recettoriali con scarsa selettività, i composti 1e e 1f mostrano un'attività prevalentemente sui recettori β_1 , mentre il composto 1g risulta essere selettivo per i recettori β_2 [44].



Composti	R	R ₁
1a	–	<i>i</i> -Pr
1b	–	<i>t</i> -Bu
1c	<i>o</i> -OH	<i>t</i> -Bu
1d	<i>p</i> -OH	<i>t</i> -Bu
1e	<i>o</i> -OCH ₃	<i>t</i> -Bu
1f	<i>p</i> -OCH ₃	<i>t</i> -Bu

Tabella 3.2: 3-(benzilidenaminossi)propanolaminoderivati

Capitolo 4

SCOPO DELLA RICERCA E RISULTATI OTTENUTI

Il presente lavoro di tesi rivolge l'attenzione allo studio dei derivati del indeno[1,2-*c*]pirazol-4(1*H*)-one, molecole progettate come nuovi agonisti e/o antagonisti β -adrenergici.

Sebbene lo scopo principale del lavoro sia stato, principalmente, l'ottenimento di nuovi composti selettivi nei confronti dei recettori β -1, tuttavia dei derivati eterociclici a nucleo indeno[1,2-*c*]pirazolo in questione, (figura 4.1), è stato effettuato uno studio chimico-farmaceutico più ampio che ha previsto non solo la messa a punto delle metodiche sintetiche ma anche la caratterizzazione, la valutazione biologica e la veicolazione dei nuovi composti ottenuti.

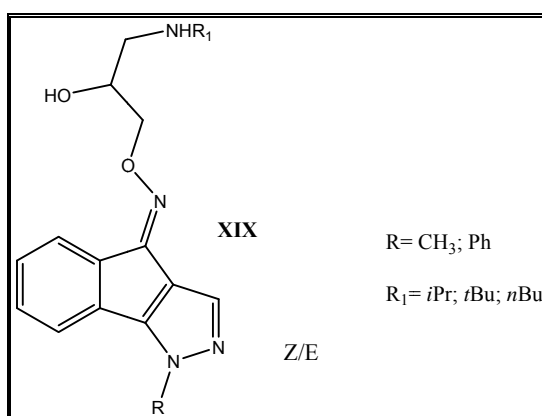


Figura 4.1: Nuovi indeno[1,2-*c*]pirazol derivati diversamente sostituiti: struttura generale

Parte del lavoro sperimentale di tesi è stato svolto presso il CERMN, Centro di Studi e di Ricerca sui Medicamenti della Normandia (Caen-Francia), sotto la supervisione dei Professori Patrick Dallemagne e Christophe Rochais. Tale centro si interessa con successo della sintesi di composti a struttura eterociclica e vanta una chemioteca contenente 14000 nuove molecole.

I composti studiati nel presente lavoro (Tab. 4.1) sono strutturalmente correlati e opportunamente funzionalizzati rispetto a composti noti riportati in letteratura. Tuttavia, la messa a punto dello schema sintetico, che ha consentito l'ottenimento di tali composti, ha previsto la realizzazione di reazioni spesso condotte in ambiente anidro e



che hanno dato la formazione di alcuni intermedi poco stabili (**XVIa-b**, **XVIIa-b**, **XVIIIa-b**, **XIXa-d**).

Nello specifico sono state preparate le seguenti molecole:

- **(E/Z)-1-fenil-indeno[1,2-*c*]pirazol-4(1*H*)-one (isopropilamino)propil)ossima (XIXa);** ***O*-(2-idrossi-3-**
- **(E/Z)-1-fenil-indeno[1,2-*c*]pirazol-4(1*H*)-one idrossipropil)ossima (XIXb);** ***O*-(3-*tert*-butilamino)-2-**
- **(E/Z)-1-fenil-indeno[1,2-*c*]pirazol-4(1*H*)-one idrossipropil)ossima(XIXc);** ***O*-(3-*n*-butilamino)-2-**
- **(E/Z)-1-metil-indeno[1,2-*c*]pirazol-4(1*H*)-one (isopropilamino)propil) ossima(XIXd).** ***O*-(2-idrossi-3-**

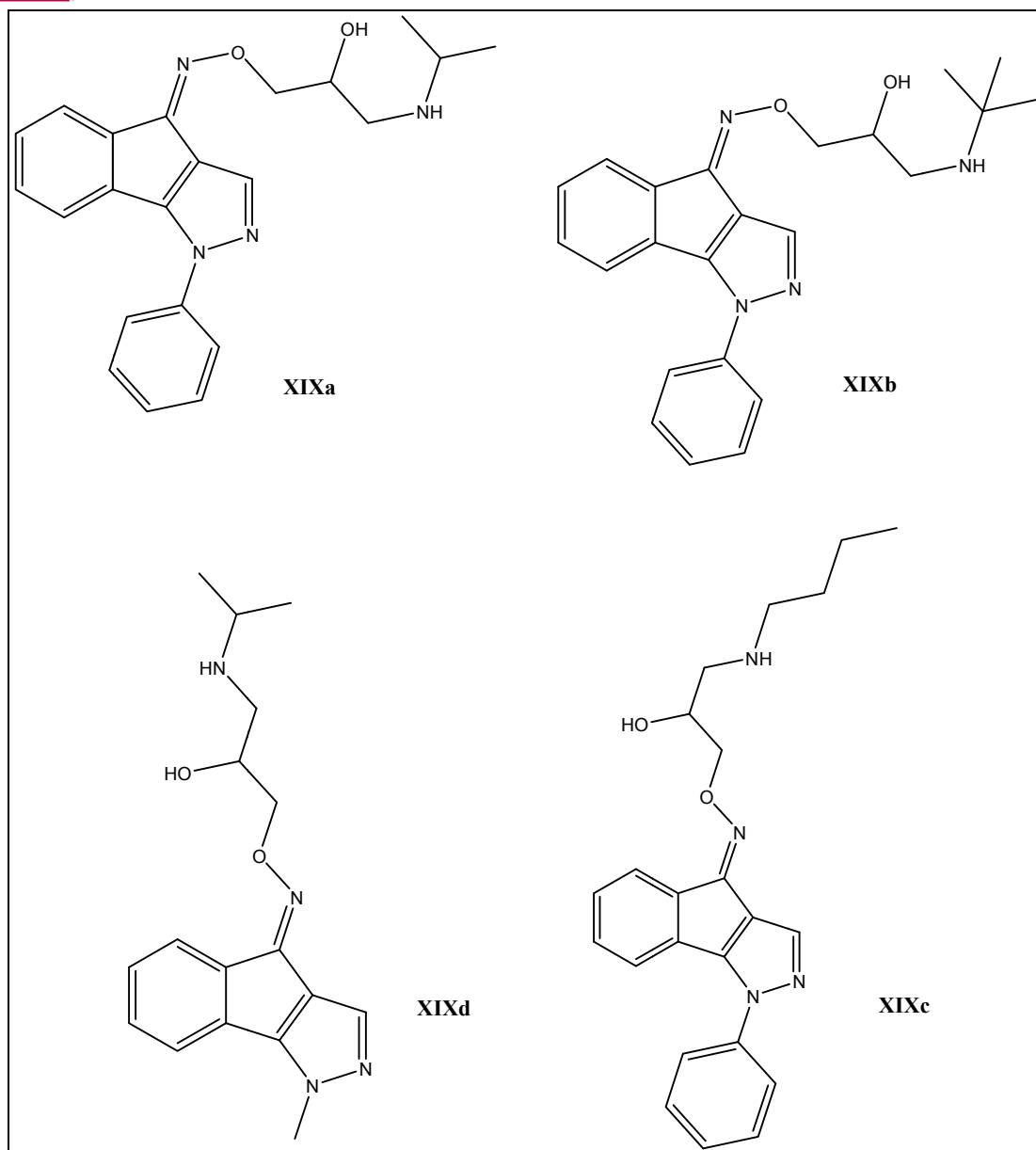


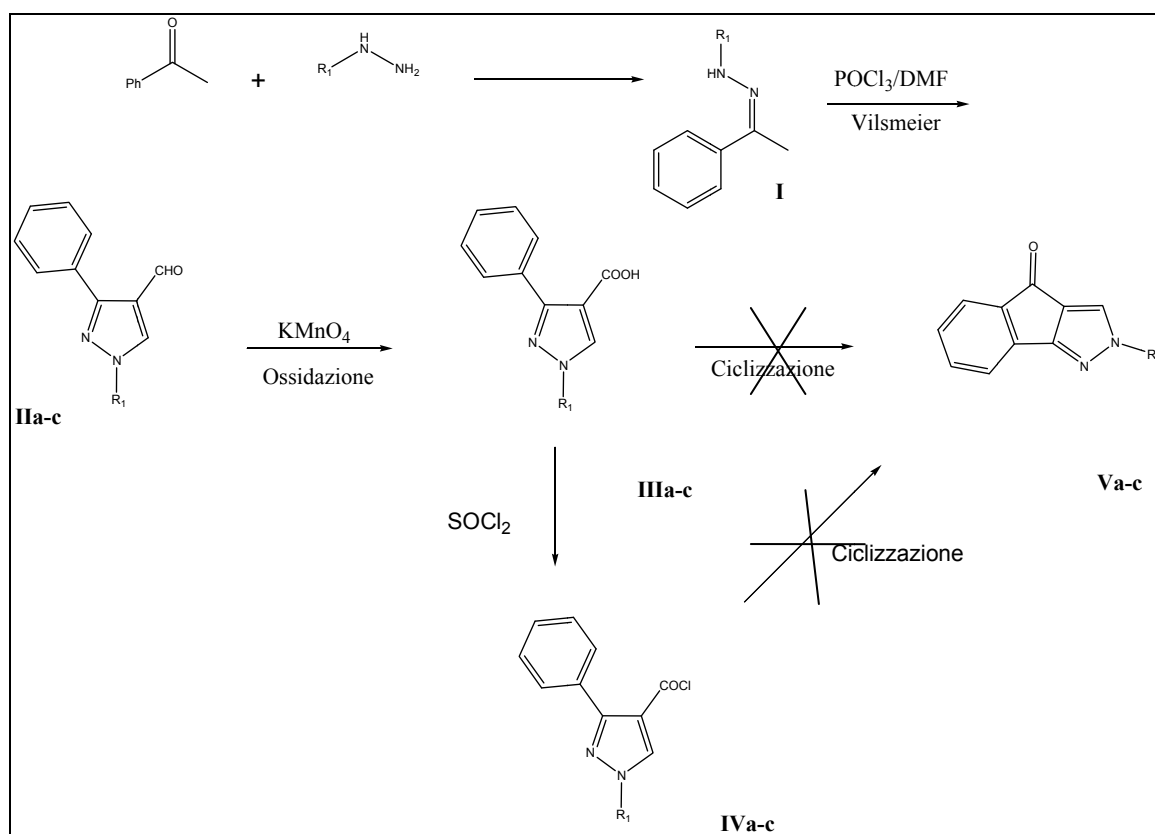
Tabella 4.1: Nuovi indeno[1,2-c]pirazol derivati diversamente sostituiti (XIXa-d)

In un secondo tempo, i composti preparati **XIXa**, **XIXb** e **XIXc** sono stati sottoposti a test biologici *in vivo* allo scopo di valutarne gli effetti sui parametri cardiaci. Nello specifico, si è valutato come tali composti siano in grado di modificare la *performance* cardiaca, i parametri di contrazione e di rilassamento cardiaci, nonché la vasocostrizione coronarica e la frequenza cardiaca.

Nella fase finale, l'interesse è stato rivolto alla formulazione di vettori particellari per il rilascio transdermico dei principi attivi sintetizzati, atti, da un lato, ad aumentare la permeazione attraverso la pelle, dall'altro a garantire un rilascio costante di principio attivo nel tempo.

Durante il primo anno di dottorato, con l'obiettivo di sintetizzare i composti sopra menzionati, il progetto di ricerca ha previsto, inizialmente, delle reazioni di condensazione tra acetofenone e idrazine opportunamente sostituite con ottenimento dei corrispondenti idrazoni, **Ia-c**, successivamente ridotti per ottenere le rispettive aldeidi, **IIa-c**. Infine, tali aldeidi sono state ossidate e clorurate ottenendo gli acidi carbossilici, **IIIa-c**, ed i cloruri acilici, **IVa-c** corrispondenti, come mostrato nello schema 4.1a.

In una seconda fase della ricerca, si è cercato di individuare l'ideale metodologia sintetica che consentisse di preparare, a partire dagli acidi carbossilici e dai cloruri acilici ottenuti, i pirazol-4-oni di interesse **V**, quali precursori di una nuova classe di β 1-bloccanti (schema 4.1a).



Schema 4.1a

Tuttavia i diversi approcci sintetici tentati, come mostrato nella figura 4.2, sono stati fallimentari. Nello specifico i primi tentativi hanno riguardato la classica reazione di Friedel-Craft utilizzando come acido di Lewis il tricloruro di alluminio (AlCl₃) in cloroformio (CHCl₃); reazione che non ha condotto alla formazione del prodotto desiderato (**V**). La stessa reazione è stata anche effettuata in assenza di solvente, utilizzando AlCl₃ in presenza NaCl (cloruro di sodio), anche in questo caso non è stato ottenuto il prodotto desiderato. Successivamente, sono stati tentati altri approcci



utilizzando diversi reattivi in diverse condizioni di reazione allo scopo di ottenere la ciclizzazione intramolecolare desiderata. In particolare, un'ulteriore prova ha riguardato l'utilizzo di acido polifosforico (PPA) con l'idea di utilizzare allo stesso tempo un reattivo/solvente che fungesse anche da catalizzatore della reazione. La prova effettuata non ha dato tuttavia i risultati attesi. Un ultimo approccio ha riguardato l'utilizzo di ossicloruro di fosforo (POCl_3), ennesima prova che non ha portato i risultati sperati. L'idea era infatti quella di ottenere i composti di interesse (**VIIIa-c**) attraverso la retrosintesi mostrata nello schema 4.1b, ma tali derivati **VIII** non sono stati mai ottenuti probabilmente perché la sostituzione in posizione N2 impediva per ingombro sterico la ciclizzazione e quindi la formazione dei chetoni ciclici **V**.

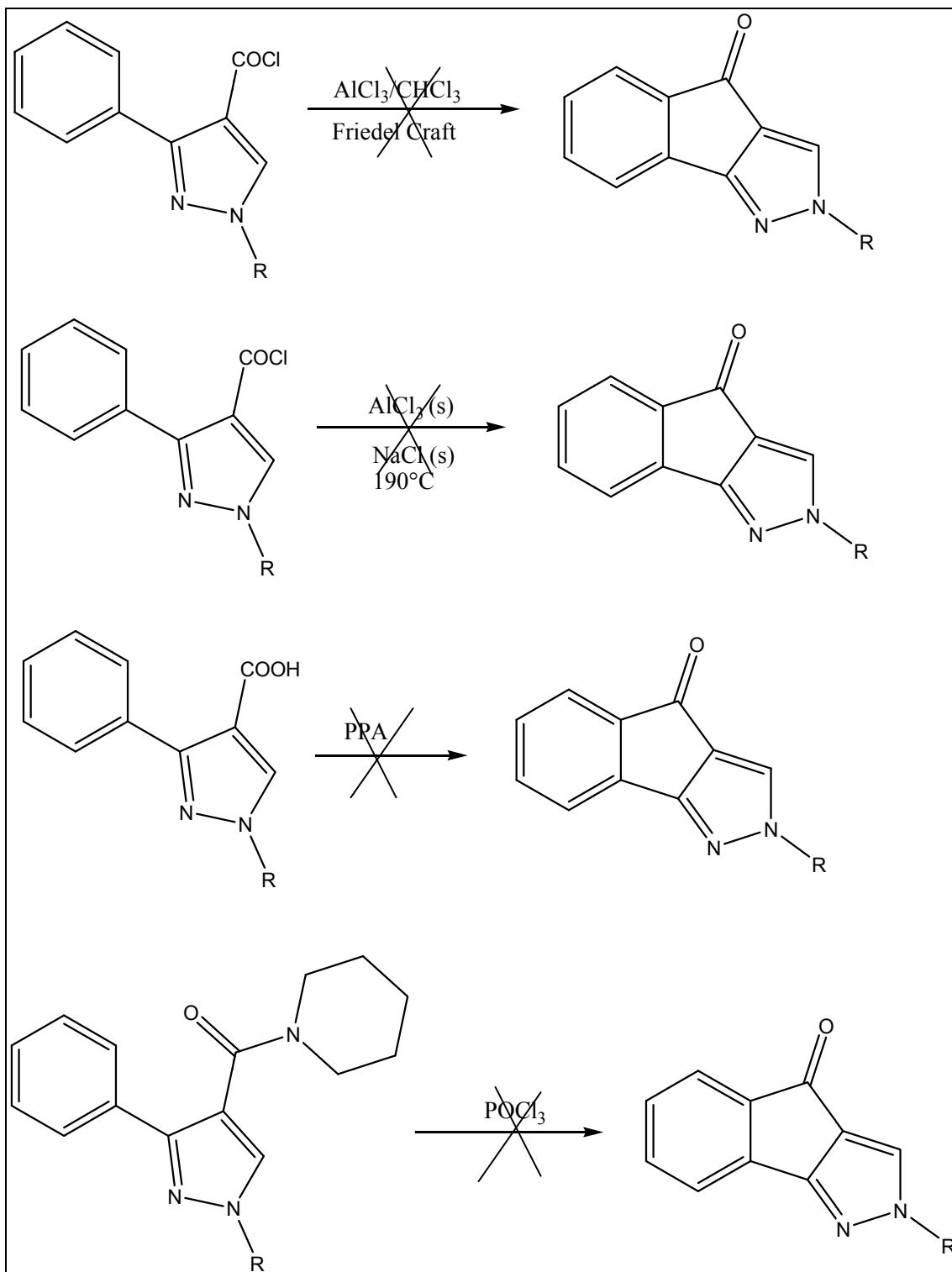
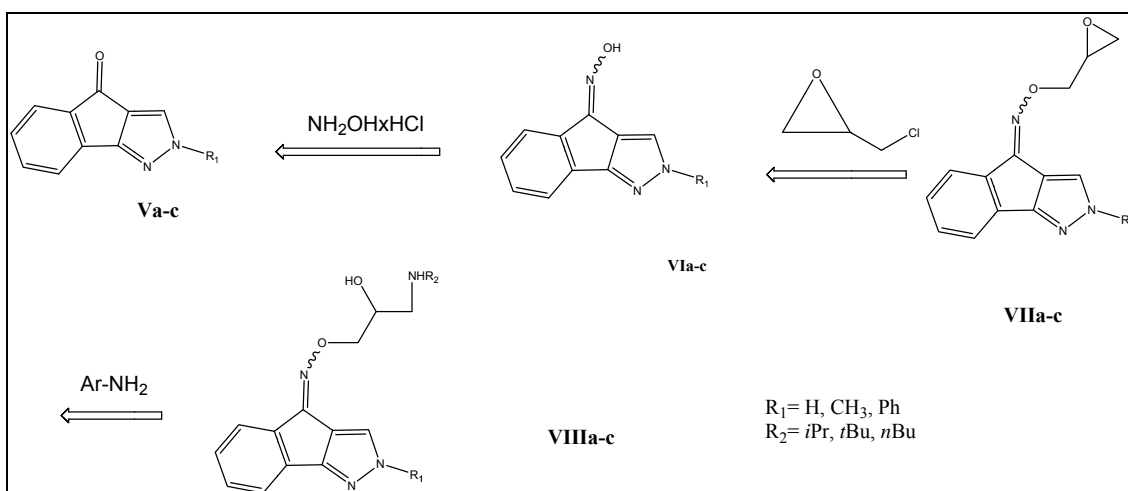


Figura 4.2: Tentativi di ciclizzazione intramolecolare



Schema 4.1b

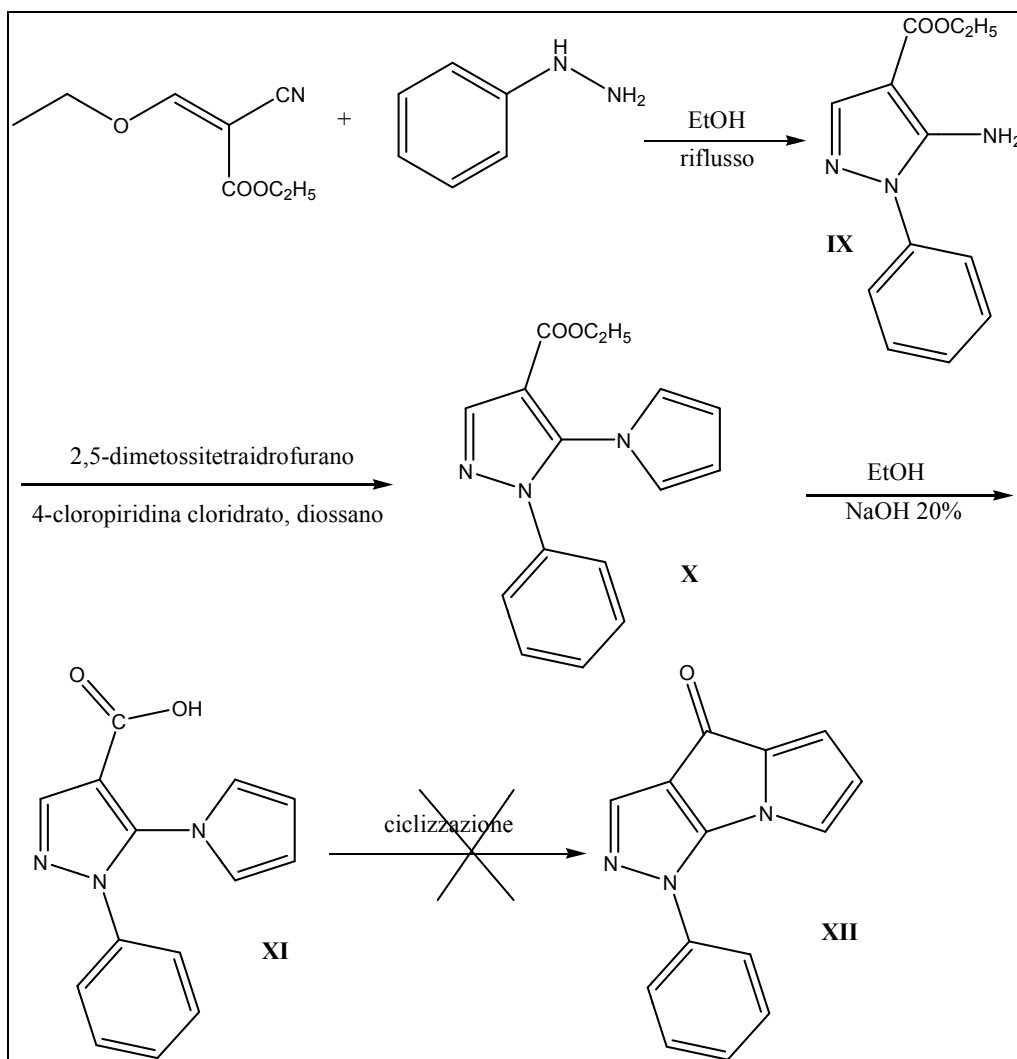
Per ovviare a tale inconveniente, si è pensato di sintetizzare nuovi derivati ciclici (composto **XII**), apportando delle modifiche strutturali alle molecole cicliche (composto **VIIIa-c**) inizialmente progettate, attraverso la messa a punto di un nuovo schema di sintesi (schema 4.2). Tale modificazione strutturale è stata pensata conservando le porzioni molecolari ritenute indispensabili per le interazioni con il recettore adrenergico (ovvero con il residuo di aspartato ASP-113, con i due residui di serina SER-207 e SER-204 e con il residuo di fenilalanina PHE-290, come descritto nel capitolo 2). Per la sintesi di dette molecole è stata effettuata, come mostrato nello schema, una reazione di condensazione tra l'etil-2-cianoetossiacrilato e la fenilidrazina con ottenimento di un amino estere **IX** e la successiva reazione di Clauson-Kaas [45] utilizzando 2,5-dimetossitetraidrofurano e 4-cloropiridina allo scopo di introdurre un ciclo pirrolico con ottenimento del composto **X**.

L'estere ottenuto, **X**, è stato sottoposto a reazioni di idrolisi basica ottenendo il corrispondente acido carbossilico **XI**.

Tuttavia la metodica impiegata non ha consentito l'ottenimento del prodotto desiderato (composto **XII**) in quanto la successiva reazione di ciclizzazione dell'acido carbossilico utilizzando diverse metodiche di ciclizzazione di Friedel-Craft in diverse condizioni di reazione, non ha dato i risultati attesi (figura 4.3). Nel dettaglio, un primo tentativo ha previsto la reazione di Friedel-Craft con AlCl_3 in CHCl_3 , reazione che non ha portato alla formazione del prodotto desiderato (**XII**). Successivamente si è tentato un ulteriore approccio utilizzando PPA allo scopo di catalizzare la reazione di ciclizzazione intramolecolare, ma senza ottenere i risultati attesi ed infine l'attenzione è stata focalizzata sull'utilizzo del trifosgene allo scopo di consentire in un unico step la



clorurazione ed il successivo attacco intramolecolare, tentativo anche questo fallimentare (figura 4.3).



Schema 4.2

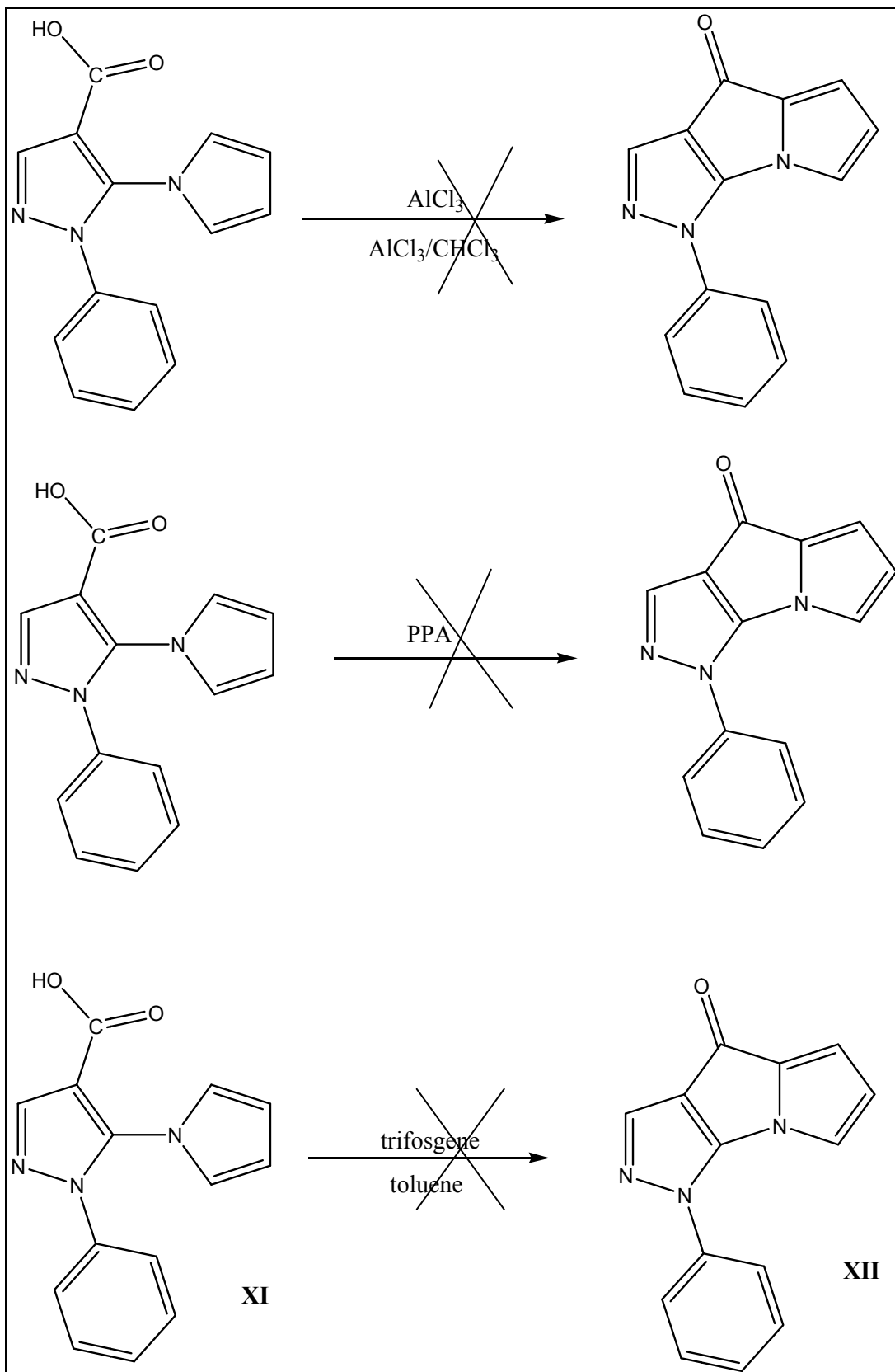
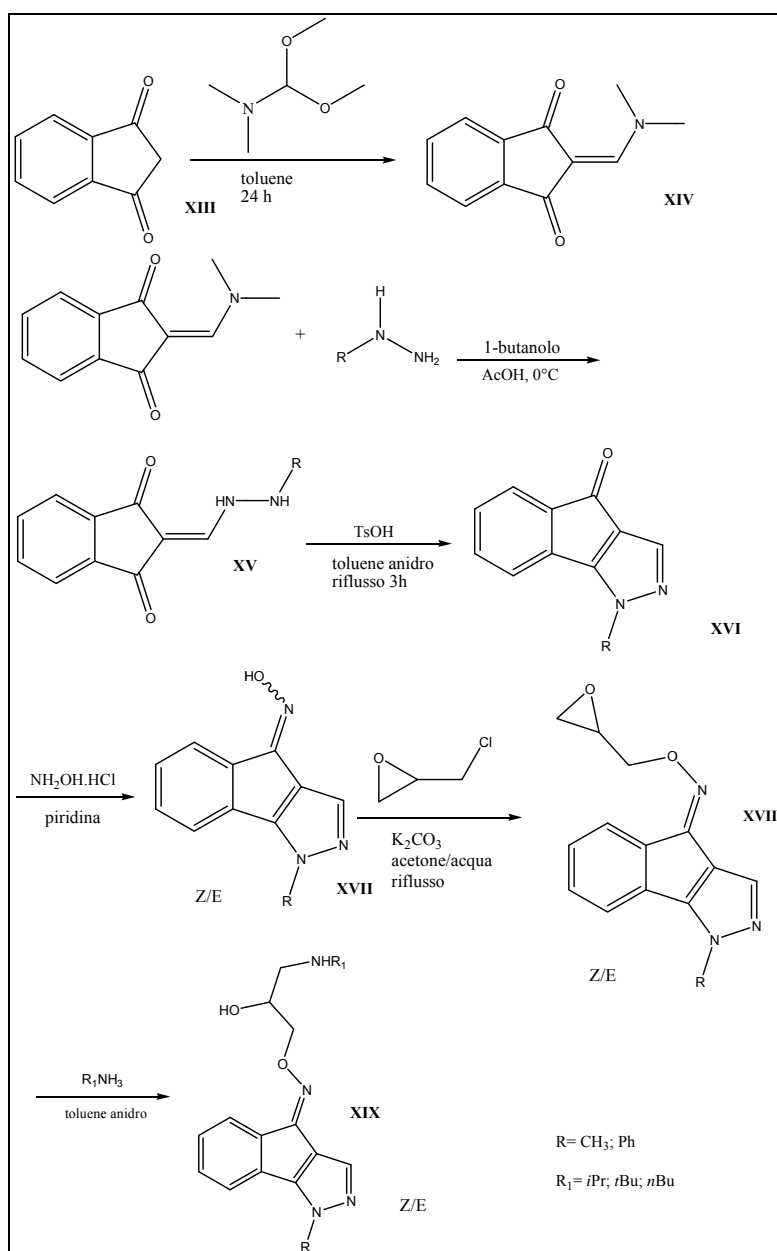


Figura 4.3: Tentativi di ciclizzazione dei derivati XI

Il lavoro è proseguito attraverso un attento studio della letteratura [41, 42, 43, 44] che ha suggerito di modificare strutturalmente i composti **Va-c** variando la posizione del sostituente al fine di ottenere le molecole **XIX** (schema 4.3) sostituite in N1.

4.1. Schema generale di reazione per la preparazione di nuovi indeno[1,2-*c*]pirazol derivati diversamente sostituiti

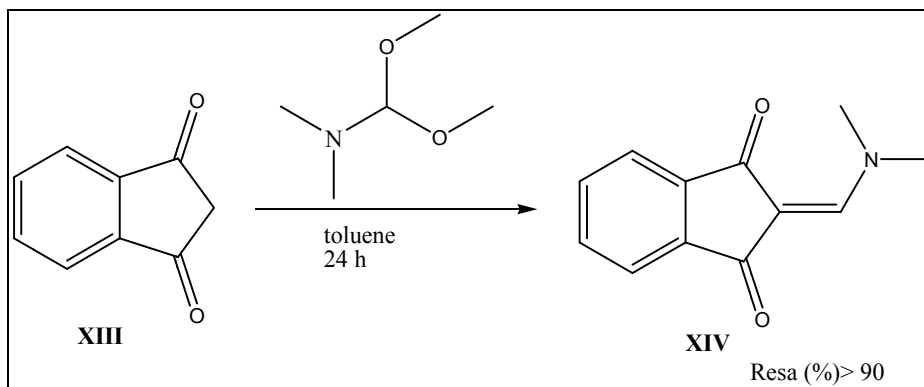
Lo schema 4.3, descrive la sintesi dei nuovi indeno[1,2-*c*]pirazol derivati diversamente sostituiti. Nello specifico le reazioni sono di seguito riportate.



Schema 4.3: Schema di reazione generale per la sintesi di nuovi indeno[1,2-*c*]pirazol derivati diversamente sostituiti

4.1.1. Sintesi del 2-dimetilaminometilen-indan-1,3-dione (XIV)

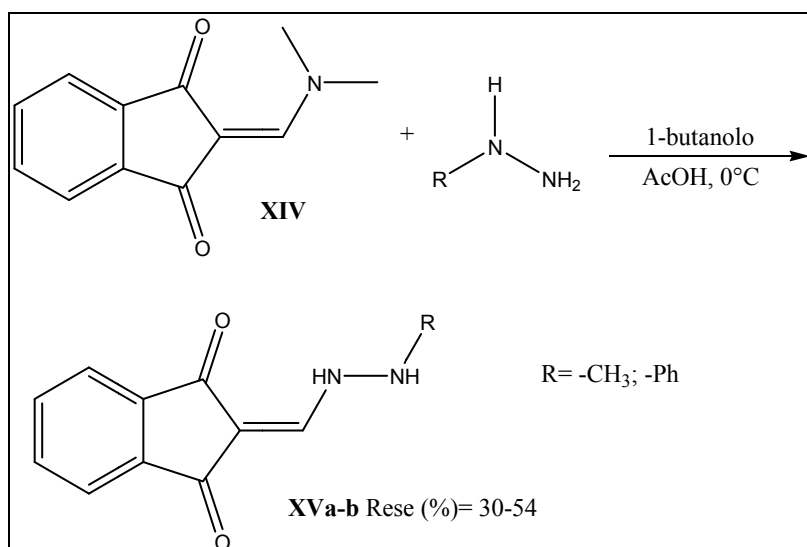
Il composto **XIV** è stato ottenuto a partire dall'1,3-indandione, **XIII**, per reazione di condensazione con la dimetilformammide dimetilacetale DMF/DMA, in toluene [44] che comporta l'eliminazione di metanolo (schema 4.4).



Schema 4.4

4.1.2. Sintesi di 2-(N'-metil (o fenil)-idrazinometilen)indan-1,3-dione (XV)

Il derivato **XIV** è stato solubilizzato a temperatura ambiente in 1-butanolo. A tale soluzione è stato aggiunto acido acetico glaciale e successivamente l'opportuna idrazina diversamente sostituita (fenilidrazina o metilidrazina), negli opportuni rapporti molari e preventivamente solubilizzata in 1-butanolo (schema 4.5) [44]. In tal modo si sono ottenuti i derivati **XVa-b**.

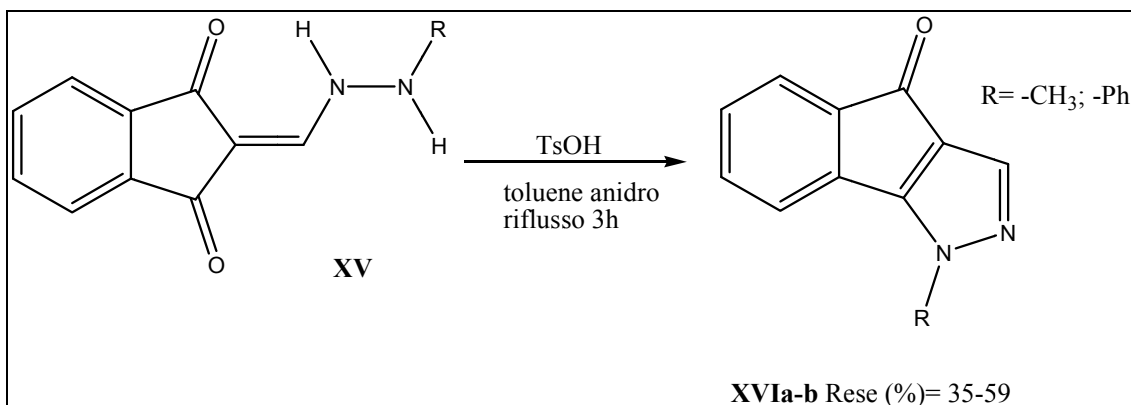


Starting	Prodotti	R
XIV	XVa	Ph
XIV	XVb	CH ₃

Schema 4.5

4.1.3. Sintesi di 1-metil(o fenil)-1*H*-indeno[1,2]pirazol-4-one (XVI)

Dalla reazione di ciclizzazione intramolecolare dei derivati **XVa-b** in toluene anidro ed in presenza di acido *para*-toluen solfonico è stato possibile ottenere i derivati **XVIa-b** attesi (schema 4.6) [44-46].

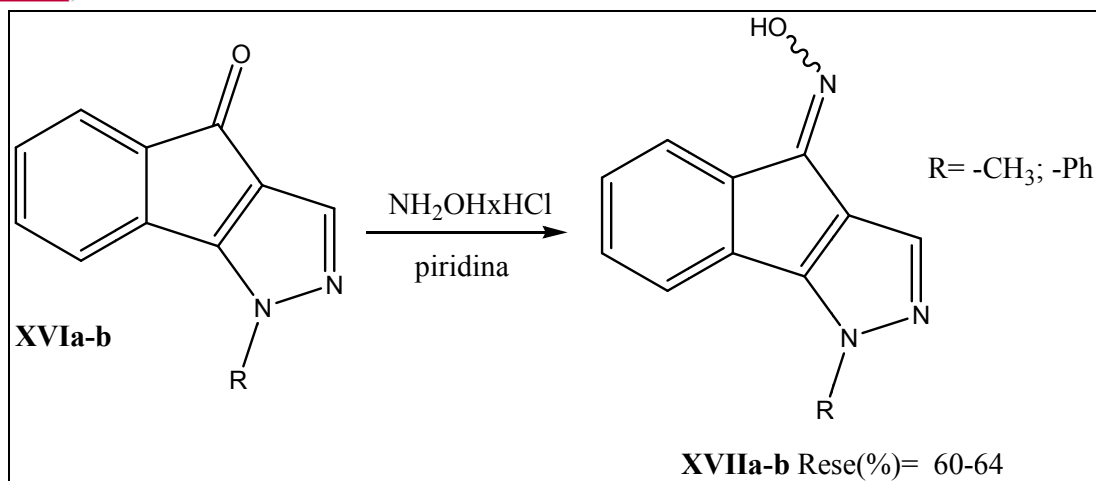


Starting	R	Prodotti	R
XVa	Ph	XVIa	Ph
XVb	CH ₃	XVIb	CH ₃

Schema 4.6

4.1.4. Sintesi di (Z/E)-1-metil(o fenil)-1*H*-indeno[1,2-*c*]pirazol-4-one ossima (XVII)

I chetoni ciclici **XVIa-b**, solubilizzati nella minima quantità di piridina, sono stati condensati con idrossilammina cloridrata dando le rispettive chetossime **XVIIa-b** [47-48-49].

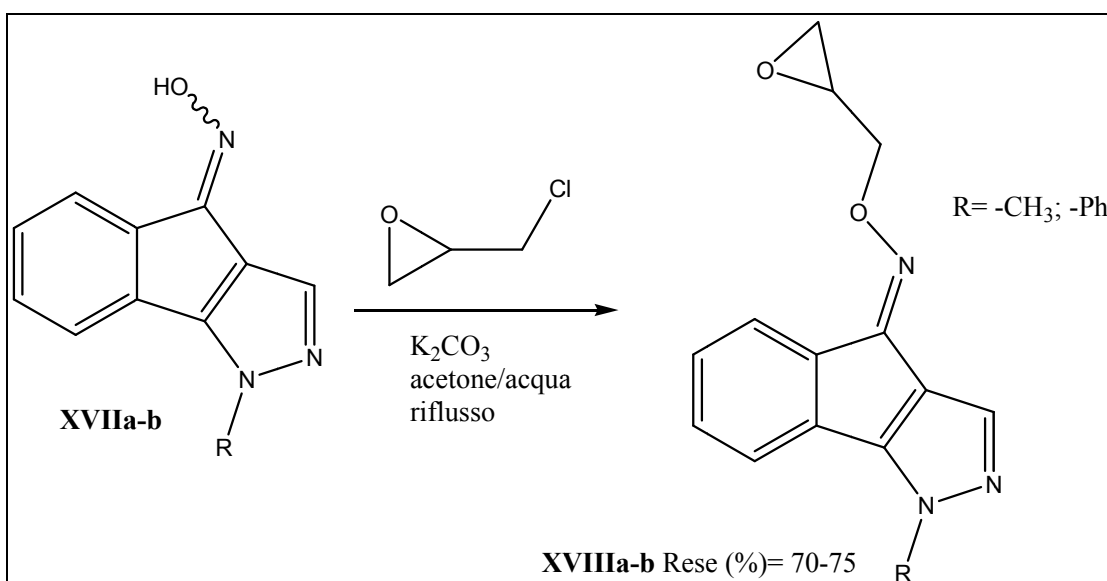


Starting	R	Prodotti	R
XVIa	Ph	XVIIa	Ph
XVIb	CH ₃	XVIIb	CH ₃

Schema 4.7

4.1.5. Sintesi di (Z/E)-1-metil(o fenil)-1H-indeno[1,2c]pirazol-4-one O-ossiranilmetil-ossima (XVIII)

I composti **XVIIIa-b** sono stati ottenuti, mediante reazione di sostituzione nucleofila, facendo reagire le chetossime corrispondenti **XVIIa-b**, solubilizzate precedentemente in acetone e con l'aggiunta successiva di K₂CO₃ in acqua, con l'epicloridrina negli opportuni rapporti molari.

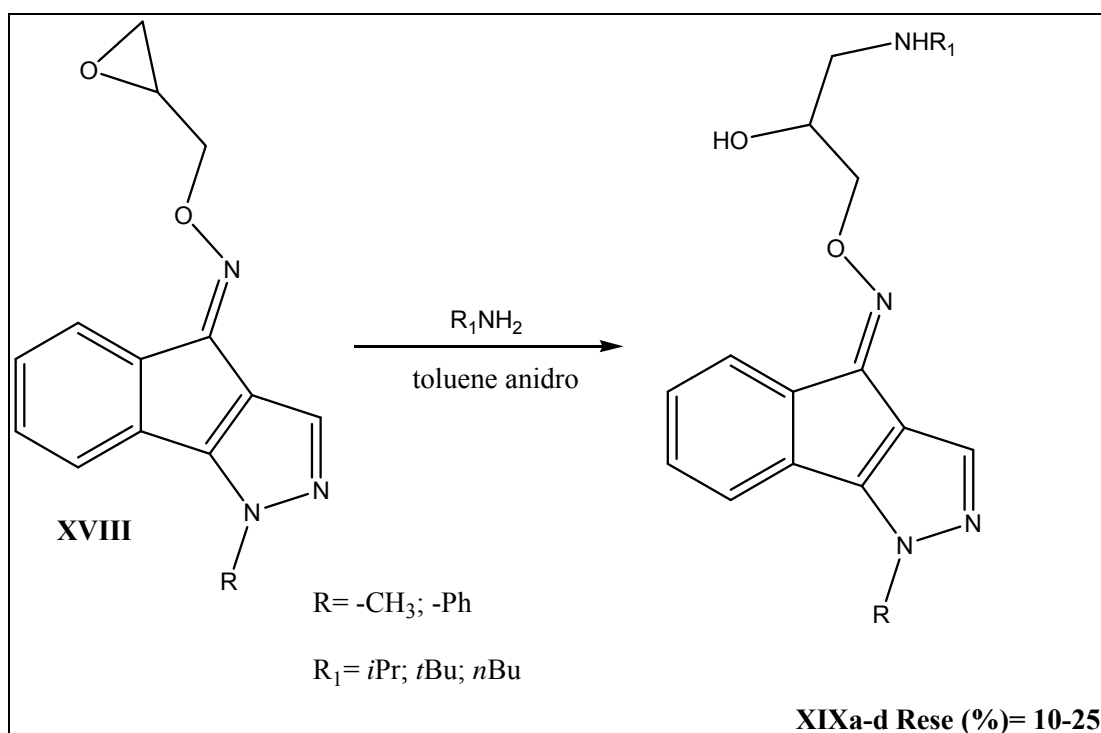


Starting	R	Prodotti	R
XVIIa	Ph	XVIIIa	Ph
XVIIb	CH ₃	XVIIIb	CH ₃

Schema 4.8

4.1.6. Sintesi dei derivati del indeno[1,2-*c*]pirazol-4(1*H*)-one diversamente sostituiti (XIX)

I derivati indeno[1,2-*c*]pirazol-4(1*H*)-one **XIX** diversamente sostituiti sono stati ottenuti mediante una procedura sintetica particolarmente complicata a causa della loro scarsa stabilità (schema 4.9). Essa ha previsto una reazione tra i derivati ossiranilmetil-ossimici **XVIIIa-b** precedentemente ottenuti ed un'ammina secondaria opportunamente sostituita. La reazione, condotta in condizioni anidre, in tubo sigillato e toluene anidro, ha previsto l'attacco nucleofilo dell'ammina sul ciclo ossiranico, dando i derivati **XIXa-d** desiderati.





Starting	R	Prodotti	R	R ₁
XVIIIa	Ph	XIXa	Ph	<i>iPr</i>
XVIIIa	Ph	XIXb	Ph	<i>tBu</i>
XVIIIa	Ph	XIXc	Ph	<i>nBu</i>
XVIIIb	CH ₃	XIXd	CH ₃	<i>iPr</i>

Schema 4.9

4.2. Valutazione biologica dei derivati sintetizzati

I derivati **XIXa**, **XIXb** e **XIXc** sono stati sottoposti a test biologici *in ex-vivo* allo scopo di valutarne gli effetti sui parametri cardiaci.

In particolare, nelle figure 4.4, 4.5 e 4.6 sono rappresentate le curve concentrazione-risposta relative alle prime tre molecole prese in esame: rispettivamente **XIXa** (ACO 25), **XIXb** (ACO 28), **XIXc** (ACO 27).

Sono stati analizzati i parametri di contrattilità cardiaca (LVP e +(LVdP/dT)_{max}), la frequenza (HR) e la pressione coronarica (CP).

Nella fattispecie, **ACO 25** è in grado di indurre effetti inotropi negativi come si rileva dalla riduzione significativa di LVP e +(LVdP/dT)_{max} a 1 pM e 1 nM e 10 nM raggiungendo un massimo di riduzione della contrazione del 20% circa alla dose più alta concentrazione. **ACO 25** non modifica nè HR nè CP a tutte le concentrazioni testate.

Tra le molecole testate, **ACO 27** è la molecola più attiva, infatti, essa determina una riduzione significativa dei parametri di contrazione (LVP e +(LVdP/dT)_{max}) a tutte le concentrazioni testate, raggiungendo un massimo di riduzione alla concentrazione più alta del 40% circa. **ACO 27** non determina variazioni nè di frequenza (HR) nè di pressione coronarica (CP).

A differenza delle altre due molecole, **ACO 28** non determina riduzioni significative dei parametri di contrattilità. Inoltre, sempre **ACO 28** induce un aumento anche se non significativo della frequenza (HR) e della pressione coronarica (CP).

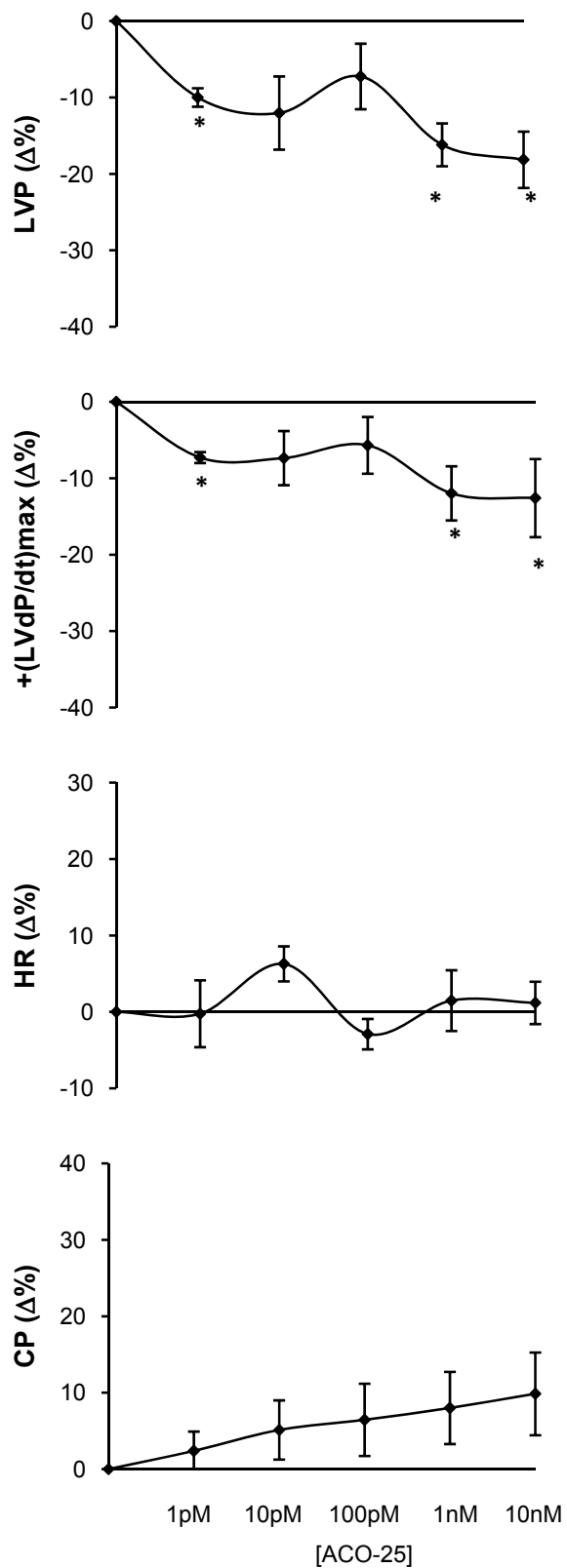


Figura 4.4: Dose-dependent response curves of ACO-25 (1pM - 10nM) on LVP, +(LVdP/dT)max, -(LVdP/dT)max, CP and HR, on Langendorff perfused rat heart preparations. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of 7 experiments. Significance of difference from control values was evaluated by one-way ANOVA; $P = 0 < 0.05$.

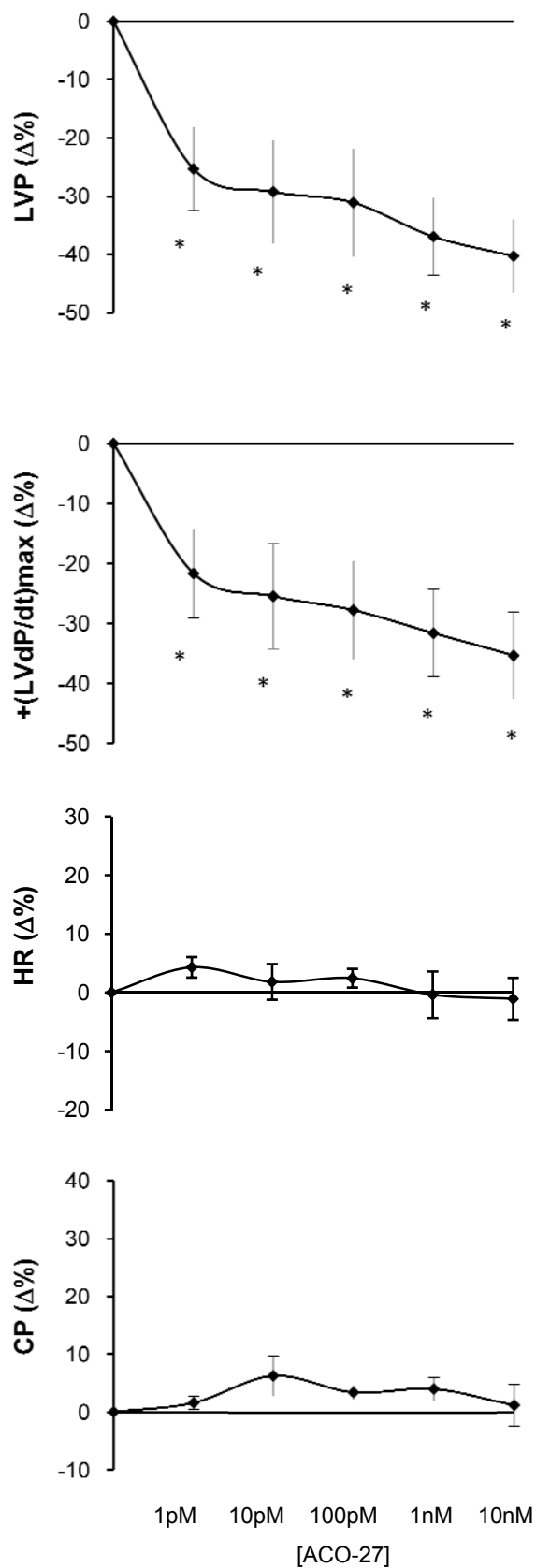


Figura 4.5: Dose-dependent response curves of **ACO-27** (1pM - 10nM) on LVP, +(LVdP/dT)max, CP and HR, on Langendorff perfused rat heart preparations. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of 7 experiments. Significance of difference from control values was evaluated by one-way ANOVA; $P = 0 < 0.05$.

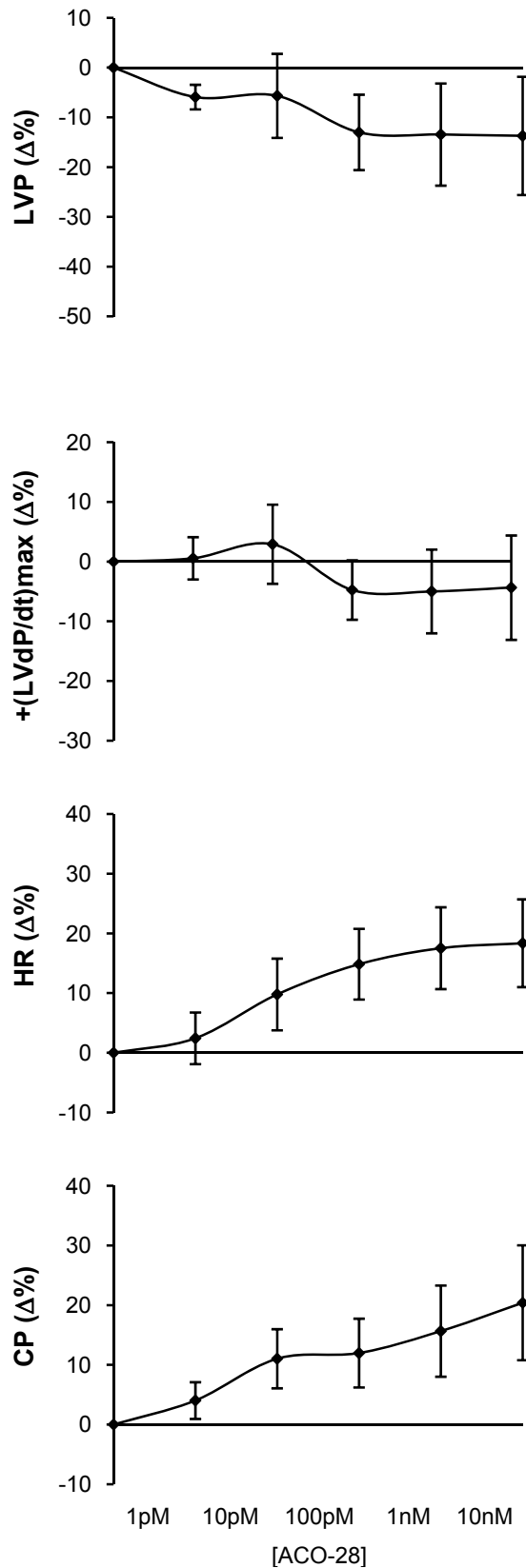


Figura 4.6: Dose-dependent response curves of **ACO-28** (1pM - 10nM) on LVP, +(LVdP/dT)max, CP and HR, on Langendorff perfused rat heart preparations. Percentage changes were evaluated as means \pm SEM of 7 experiments. Significance of difference from control values was evaluated by one-way ANOVA; $P = 0 < 0.05$.

Capitolo 5

PARTE SPERIMENTALE

5.1. Chimica

5.1.1. Materiali e metodi

Alcuni spettri ^1H e ^{13}C NMR sono stati registrati con uno spettrometro Bruker 300MHz mentre altri sono stati registrati con uno spettrometro JEOL Lamda 400 MHz. Come solventi sono stati utilizzati CDCl_3 , DMSO deuterato e acetone deuterato.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrometro Perkin Elmer BX-FT-IR.

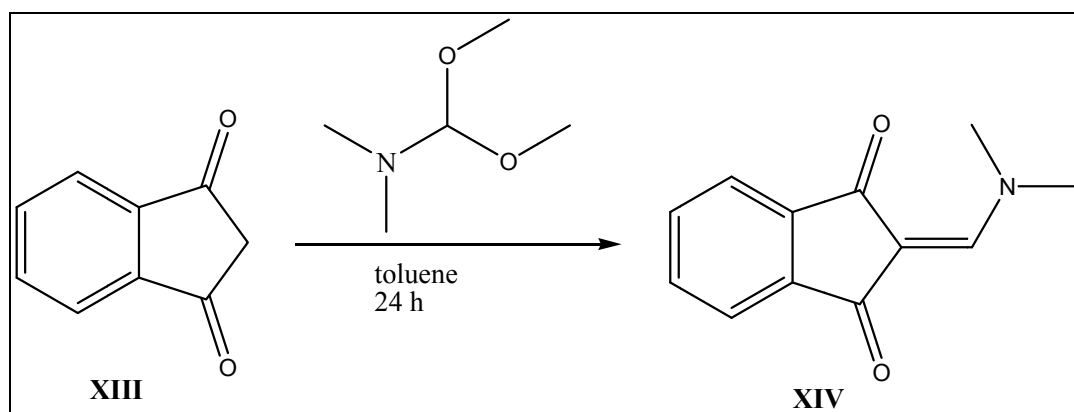
Le analisi GC-MS sono state eseguite con un HP 5890 serie II, mentre le LC-MS con uno spettrometro Waters alliance 2695 (ESI+). Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro JEOL JMS GCmate a potenziale di ionizzazione di 70eV (EI).

I punti di fusione sono stati misurati con uno strumento Kofler Melting Point.

Per la cromatografia su strato sottile sono state adoperate lastrine Riedel-de Haen 5x10cm di gel di silice 60 F₂₅₄, spessore 0.2mm, le macchie sulle TLC sono state osservate con luce ultravioletta.

I reagenti chimici ed i solventi ad elevato grado di purezza utilizzati sono stati acquistati dalla Sigma e Aldrich Chemical Co e dalla Alfa Aesar.

5.1.2. Procedura di sintesi di: 2-dimetilaminometilen-indan-1,3-dione (XIV).



Solido verde

C₁₂H₁₁NO₂; PM= 201 g/mol

Resa % >90; pf= 152°C

Reagenti:

1,3-indandione (XIII): 1 gr (0,0068 moli)

DMF/DMA (dimetilformammide dimetilacetale): 2,25 mL (0,0136 moli), d= 0,89 g/L

Toluene: 10 mL

Rapporti molari: 1,3-indandione/DMF-DMA: 1/2

Procedimento:

In un pallone da 250 mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano 1g (6,8 mmol) di 1,3-indandione XIII in 10 mL di toluene. Di seguito si aggiungono 2,25 mL (3,6 mmol) di DMF/DMA. La soluzione si lascia a riflusso per 24 ore (150°C). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione si concentra a pressione ridotta aggiungendo diclorometano (5 mL) di volta in volta fino a completo allontanamento di solvente in eccesso. Il grezzo ottenuto si purifica mediante cristallizzazione utilizzando etere di petrolio[44]

Analisi spettroscopica:

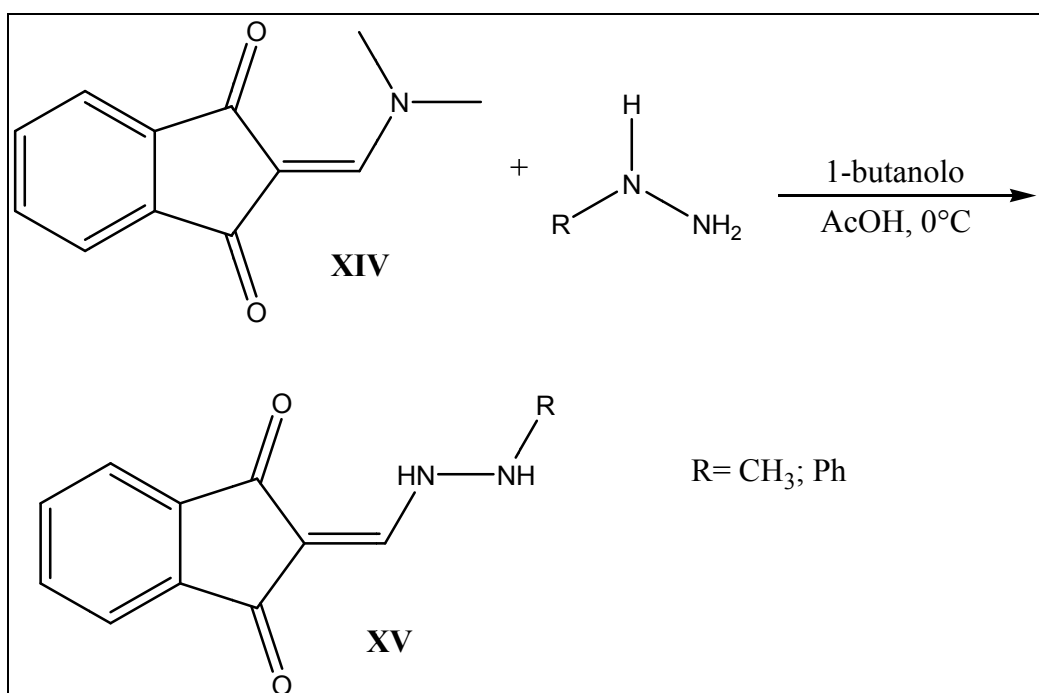
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3,35 [s, 6H, N(CH₃)₂], 7,27 [s, 1H, CH-N]; 7,47- 7,57 [m, 2H, Ar]; 7,66-7,75 [m, 2H, Ar].

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ 153,22; 133,12; 120,83; 101,68; 47,50; 43,31.

MS (ESI⁺): 202 (M⁺+1)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3442; 2919; 1361; 1717; 1641; 1443; 1398; 1342; 1139; 977; 901; 739.

5.1.3. Procedura generale per la sintesi di: 2-(N'-metil (o fenil)-idrazinometilen)indan-1,3-dione (XV).



Reagenti:

2-Dimetilaminometilen-indan-1,3-dione (XIV): moli = 0,00050

Fenilidrazina (per XVa): d = 1,10 g/L moli = 0,00052

Metilidrazina (per XVb): d = 0,875g/L moli = 0,0021

1-Butanolo: 10 ml

Rapporti molari: indandione/idrazina : 1/1.05.

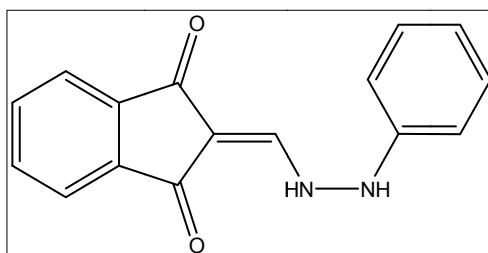
Procedimento:

Ad una soluzione acida, per l'aggiunta di acido acetico glaciale (qualche goccia), di indandione XIV in 1-butanol, in un pallone da 250 mL munito di agitatore elettromagnetico, si aggiunge Xg (xmmol) l'idrazina, opportunamente sostituita,



preventivamente solubilizzata con 1-butanol (10 mL) Si lascia reagire la soluzione risultante a 0°C per 24 ore. Si estrae con DCM e la fase organica ottenuta si lava più volte con H₂O, si anidrifica su MgSO₄ anidro, si filtra ed infine si evapora a pressione ridotta ottenendo un composto grezzo. Per la purificazione di tale grezzo si utilizza una colonna cromatografica (gel di silice, miscela eluente etilacetato/etere di petrolio: 2:1)[44].

Caratterizzazione di 2-(*N'*-fenil-idrazinometilen)indan-1,3-dione (XVa)



Solido marrone

C₁₆H₁₂N₂O₂; PM= 264 g/mol

Resa %= 54; pf= 110°C

Analisi spettroscopica:

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 4,02 [m, 1H, *NH-NH-Ar*]; 6,26 [br, 1H, *NH-NH-C₆H₅*], 6,87-6,91 [m, 2H, *Ar*]; 7,03-7,07 [m, 1H, *Ar*]; 7,31-7,35 [m, 2H, *Ar*]; 7,67-7,70 [m, 2H, *Ar*]; 7,79- 7,82 [m, 1H, *Ar*]; 7,83-7,85 [m, 1H, *Ar*]; 7,97 [s, 1H, *C=CH-NH*].

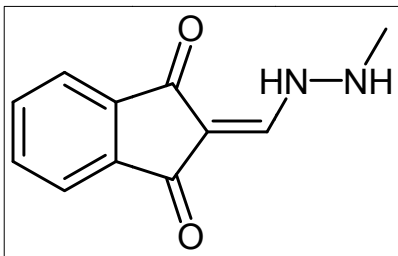
¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 104,45; 113,82; 121,71; 122,27; 122,78; 129,67; 133,64; 133,77; 139,83; 140,37; 146,16; 153,67; 189,66; 193,71.

MS (ESI⁺): 265 (M⁺+1)

MS (EI) m/z calcolata per C₁₆H₁₂N₂O₂ : 265.0977 ; **trovata** 265,0983

IR (KBr) (cm⁻¹): 3452; 2936; 2358,03; 1646; 1621; 1560; 1462; 1340; 1288; 1232; 1166; 1023; 864; 751; 670.

Caratterizzazione di 2-(*N'*-metil-idrazinometilen)indan-1,3-dione (XVb)



Solido arancione

C₁₁H₁₀N₂O₂; PM= 202 g/mol

Resa %= 30; pf= 210°C

Analisi spettroscopica:

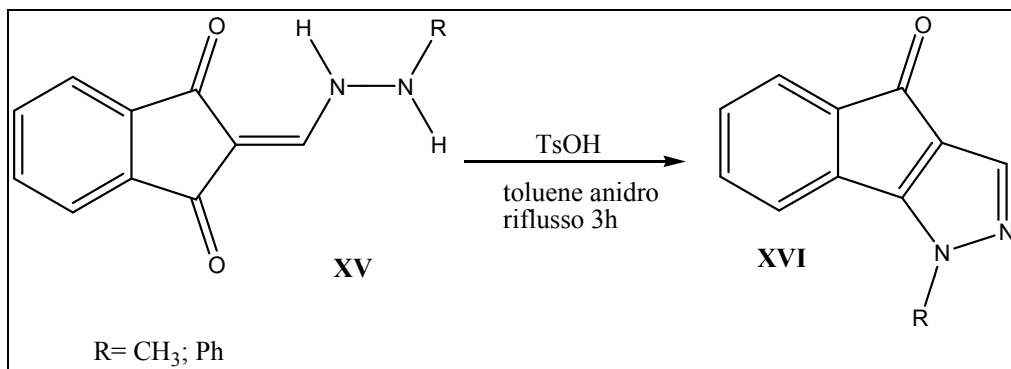
¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3,52 [s, 3H, CH₃]; 5,29 [s, 2H, 2NH]; 7,32 [s, 1H, CH-NH]; 7,57-7,64 [m, 2H, Ar]; 7,70-7,73 [m, 2H, Ar].

¹³C-NMR (DMSO-d₆, 75 MHz): δ 38,65; 99,60; 128,50; 130,40; 132,75; 158,00; 191,98.

MS (ESI⁺): 203 (M⁺+1)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3442; 2925; 2369; 1631; 1570; 1503; 1437; 1370; 1160; 1104; 1038; 859; 711; 593; 511.

5.1.4. Procedura generale per la sintesi di 1-metil(o fenil)-1*H*-indeno[1,2]pirazol-4-one (XVI)



Reagenti:

2-(*N'*-metil (o fenil)-idrazinometilen)indan-1,3-dione (**XV**): moli= 0,00051

Acido *p*-toluensolfonico monoidrato (TsOH) : moli= 0,0010

Toluene: 20mL

Rapporti molari 2-(*N'*-metil (o fenil)-idrazinometilen)indan-1,3-dione (**XV**)

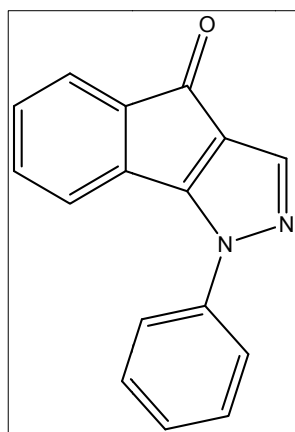
/TsOH: 1/2

Procedimento:

Ad una sospensione dell'intermedio **XV** (xg, 0,51 mmol) in 10 mL di toluene anidro sono aggiunti xg, (1 mmol) di acido paratoluen solfonico in rapporti molari 1/2. Tale soluzione è portata a riflusso (150°C) in un apparato Dean-Stark e lasciata reagire per 24 ore.

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione si versa in una soluzione acquosa di NaOH 1N (300 mL) e si estrae la fase organica con DCM (300 mL), si anidrifica su MgSO₄ anidro, si filtra ed infine si concentra a pressione ridotta ottenendo il grezzo di reazione. Si procede a purificazione cromatografica su gel di silice utilizzando come miscela eluente DCM:AcOEt:EP 1:8:1 [44].

Caratterizzazione di 1-fenil-1*H*-indeno[1,2]pirazol-4-one (XVI**)**



Solido marrone

C₁₆H₁₀N₂O; PM= 246 g/mol

Resa %= 59; pf= 230°C



Analisi spettroscopica:

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 7,17-7,19 [m, 1H, *Ar*], 7,29-7,33 [m, 2H, *Ar*], 7,49-7,53 [m, 1H, *Ar*], 7,56-7,60 [m, 3H, *Ar*], 7,68-7,72 [m, 3H, *Ar*].

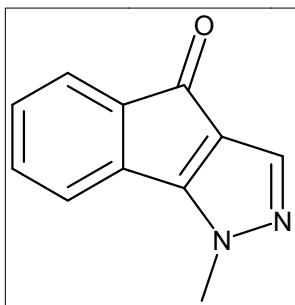
¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 119,62; 123,44; 124,78; 129,05; 129,62; 130,11; 133,00; 136,26; 138,78; 140,79; 158,00; 184,00.

MS (ESI⁺): 247 (M⁺+1)

MS (EI) m/z calcolata per C₁₆H₁₀N₂O: 247,0871; **trovata** 247,0883

IR (KBr) (cm⁻¹): 3442; 2977; 2930; 2859; 2363; 1657; 1631; 1503; 1472; 1380; 1309; 1176; 1135; 1048; 976; 956; 762; 711; 674.

Caratterizzazione di 1-metil-1*H*-indeno[1,2]pirazol-4-one (XVIIb)



Solido arancione

C₁₁H₈N₂O; PM= 184 g/mol

Resa %= 35; pf= 140°C

Analisi spettroscopica:

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 3,75 [s, 3H, CH₃]; 6,96-7,45 [m, 4H, *Ar*]; 7,59-7,61 [m, 1H, *Ar*]



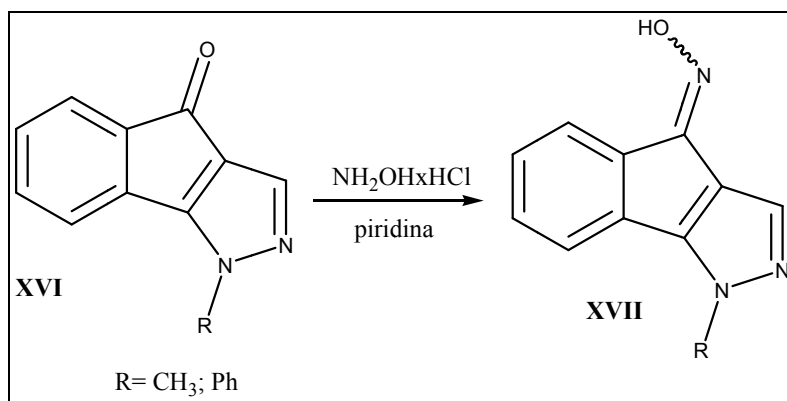
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 37,84; 118,70; 121,72; 123,03; 124,79; 129,78; 132,75; 135,04; 140,97; 183,20; 157,50.

MS (ESI⁺): 185 ($\text{M}^+ + 1$)

MS (EI) m/z calcolata per $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}$: 185.0715; trovata 185,0714

IR (KBr) (cm^{-1}): 3442; 2936; 1713; 1611; 1554; 1468; 1268; 1196; 1064; 966; 879; 639; 639.

5.1.5. Procedura generale per la sintesi di (Z/E)-1-metil(o fenil)-1H-indeno[1,2-c]pirazol-4-one ossima (XVII)



Reagenti

1-metil(o fenil)-1H-indeno[1,2]pirazol-4-one (XVI): moli= 0,00030

Idrossilammina cloridrata: moli= 0,00031

Piridina: 5mL

Rapporti molari: 1-metil(o fenil)-1H-indeno[1,2]pirazol-4-one (XVI)/ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$: 1/1,1

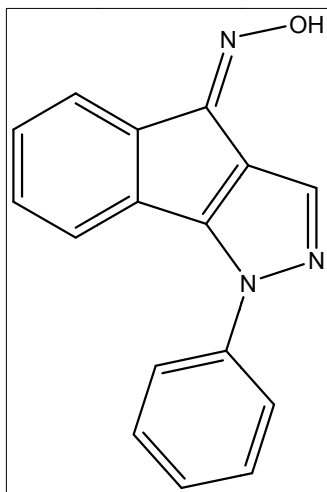
Procedimento:

Xg (0,30 mmol) di XVI si solubilizzano nella minima quantità di piridina [47], [48], [49], a tale soluzione si aggiungono xg (0,31 mmol) di cloridrato di idrossilammina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) in rapporti molari XVI/ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$: 1/1,1. Si lascia reagire la miscela di reazione in un pallone da 250 mL munito di agitatore elettromagnetico a temperatura ambiente per 3 ore. Successivamente, si versa la miscela in un pallone contenente ghiaccio e si lascia reagire sotto agitazione alla temperatura di 0-5 °C per altre 2 ore.



Infine, la miscela di reazione si versa in una soluzione acquosa di HCl 1N (300 mL) e la fase organica si estrae con DCM (300 mL), si anidrifca su MgSO₄ anidro, si filtra e si concentra a pressione ridotta ottenendo i composti **XVII** puri.

Caratterizzazione di (Z/E)-1-fenil-1*H*-indeno[1,2-*c*]pirazol-4-one ossima (**XVIIa**)



Solido arancione

C₁₆H₁₁N₃O; PM= 261 g/mol

Resa%= 64; pf= 212°C

Analisi spettroscopica:

¹H-NMR ((CD₃)₂CO), 400 MHz): δ 7,31-7,34 [m, 3H, *Ar*]; 7,44-7,46 [m, 2H, *Ar*]; 7,53-7,57 [m, 2H, *Ar*]; 7,69-7,82 [m, 3H, *Ar*]; 11,25 [s, 1H, C=N-OH].

¹³C-NMR ((CD₃)₂CO) 100 MHz): δ 120,65; 123,17; 124,06; 128,83; 129,13; 130,11; 130,44; 130,88; 137,75; 140,55; 141,33; 146,98.

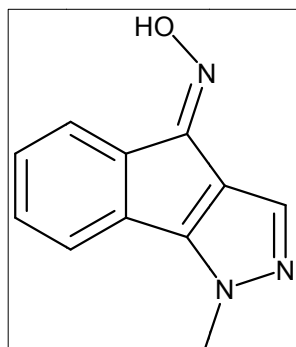
MS (ESI⁺): 262 (M⁺+1)

MS (EI) m/z calcolata per C₁₆H₁₁N₃O: 262,0980; trovata 262,0974

IR (KBr) (cm⁻¹): 3442; 2977; 2930; 2859; 2363; 1703; 1636; 1457; 1370; 1207; 1156; 1115; 1040; 961; 723; 685.



Caratterizzazione di (Z/E)-1-metil-1*H*-indeno[1,2-*c*]pirazol-4-one ossima (XVIIb)



Solido giallo

C₁₁H₉N₃O; P.M.= 199 g/mol

Resa %= 60; pf= 210°C

Analisi spettroscopica:

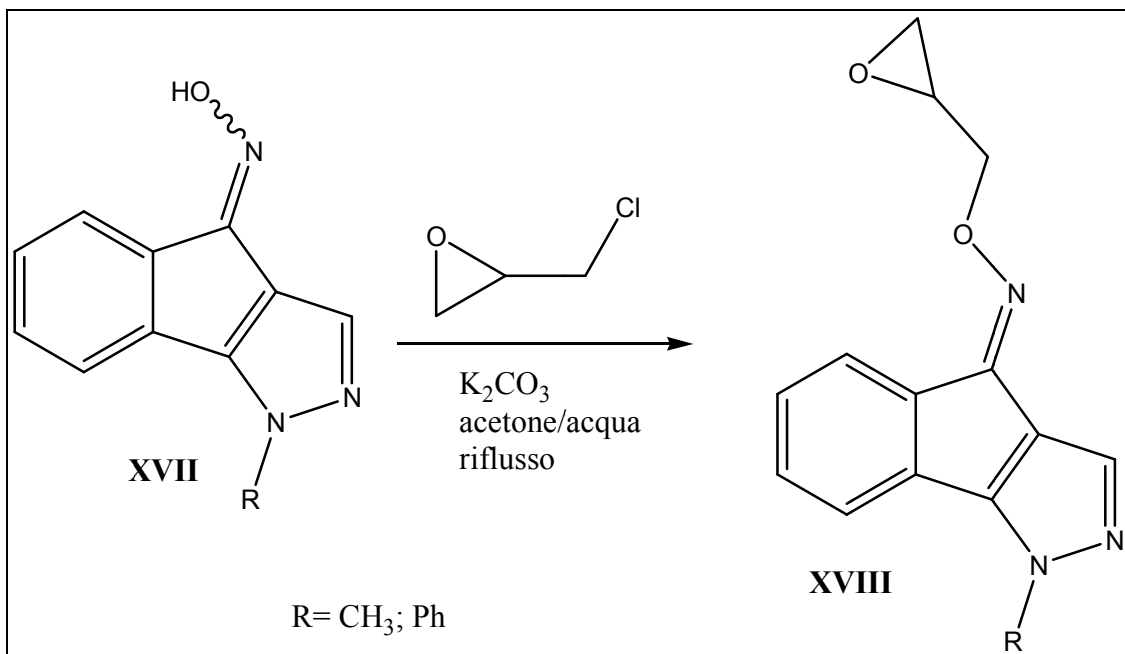
¹H-NMR ((CD₃)₂CO, 300 MHz): δ 3,98 [s, 3H, CH₃], 7,10-7,34 [m, 2H, Ar], 7,43-7,67 [m, 3H, Ar], 8,50 [br, 1H, OH].

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 37,56; 119,71; 122,01; 127,61; 129,21; 134,59; 148,00.

MS (ESI⁺): 200 (M⁺+1)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3422; 3217; 2854; 2363; 1646; 1564; 1469; 1263; 1166; 1068; 752; 711.

5.1.6. Procedura generale per la sintesi di (Z/E)-1-metil(o fenil)-1*H*-indeno[1,2*c*]pirazol-4-one *O*-ossiranilmetil-ossima (XVIII)



Reagenti:

1-metil(o fenil)-1*H*-indeno[1,2-*c*]pirazol-4-one ossima (XVII): moli= 0,00020

Carbonato di potassio (K₂CO₃): moli= 0,00040

Epicloridrina: mL= 0,016 (0,00022 moli), d= 1,18g/L

Rapporti molari 1-metil(o fenil)-1*H*-indeno[1,2-*c*]pirazol-4-one ossima (XVII)/
K₂CO₃/epicloridrina: 1/2/1,1

Procedimento:

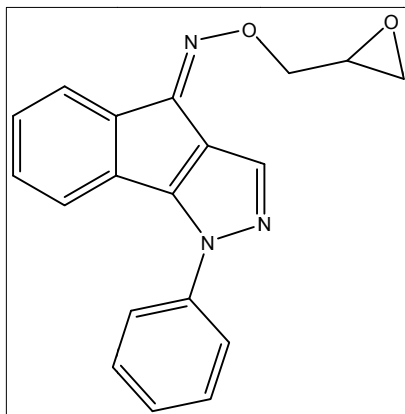
In un pallone da 250 mL, munito di agitatore elettromagnetico, si solubilizzano xg (0,2 mmol) dell'ossima XVII diversamente sostituita in 10 mL di acetone analitico. A tale soluzione si aggiungono xg (0,4 mmol) di K₂CO₃ e xg (0,22 mmol) di epicloridrina. I rapporti molari utilizzati sono ossima XVII/ K₂CO₃/epicloridrina: 1/2/1.1. Alla miscela di reazione, successivamente, si aggiungono 2 mL di H₂O. La miscela di reazione è portata a riflusso (50°C) per 6 giorni monitorando con cura per evitare l'allontanamento dell'acetone (solvente basso bollente).

Dopo raffreddamento si concentra a pressione ridotta per eliminare l'acetone in eccesso e si versa la miscela di reazione in una soluzione acquosa. Si estrae la fase organica con DCM (300 mL), si anidrifca su MgSO₄ anidro, si filtra ed infine si concentra a



pressione ridotta. Si ottiene un grezzo che viene utilizzato come tale, senza alcuna purificazione, nella reazione successiva.

Caratterizzazione di (Z/E)-1-fenil-1*H*-indeno[1,2*c*]pirazol-4-one *O*-ossiranilmetilossima (XVIIIa)



Solido arancione

C₁₉H₁₅N₃O; PM= 317g/mol

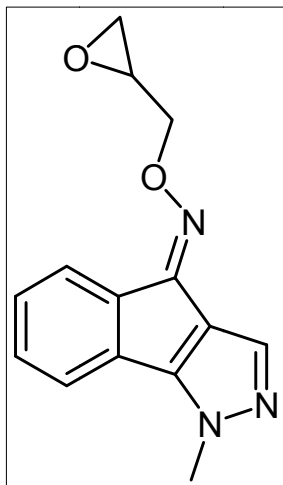
Analisi spettroscopica:

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 2,73-2,75 [m, 1H, CH-H-O], 2,89-2,91 [m, 1H, CH-H-O]; 3,38-3,42 [m, 1H, CH₂-CH-O]; 4,31-4,35 [m, 1H, CH-H-O-N=], 4,53-4,57 [m, 1H, CH-H-O-N]; 7,32-7,33 [m, 1H, Ar]; 7,42-7,46 [m, 1H, Ar]; 7,52-7,56 [m, 3H, Ar], 7,74-7,84 [m, 4H, Ar], 7,92 [s, 1H, Ar].

MS (ESI⁺): 318 (M⁺+1)



Caratterizzazione di (Z/E)-1-metil-1*H*-indeno[1,2*c*]pirazol-4-one *O*-ossiranilmetilossima (XVIIIb)



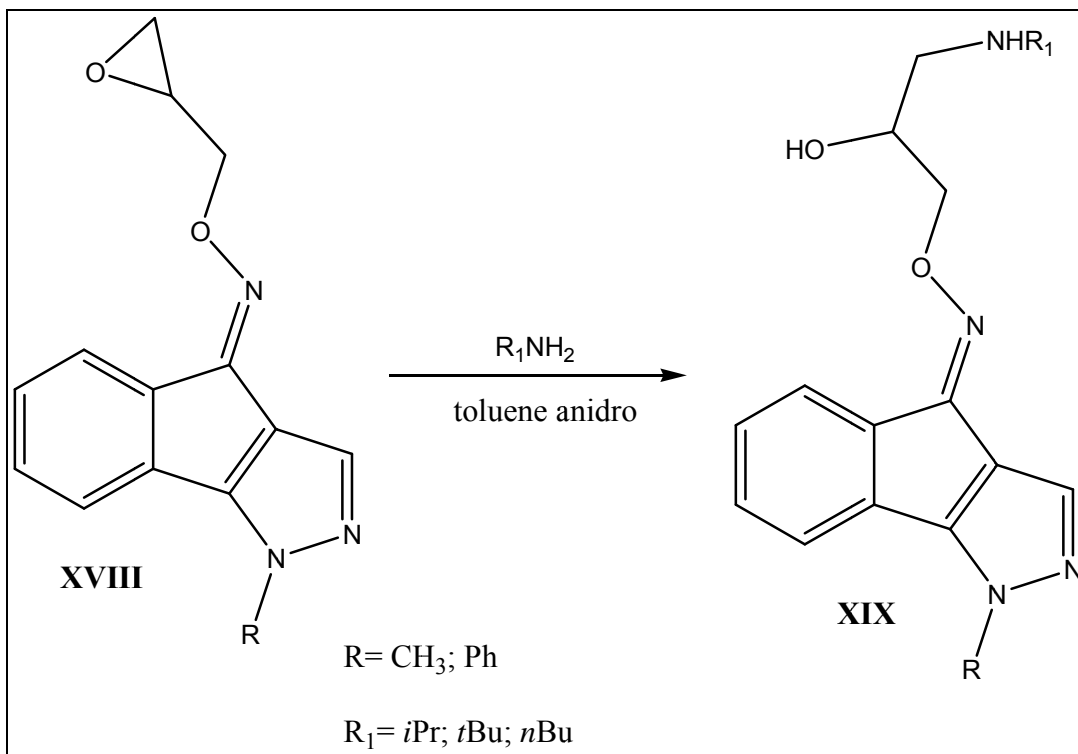
Olio marrone

C₁₄H₁₃N₃O₂; PM= 255,27 g/mol

Analisi spettroscopica:

¹H-NMR ((CD₃)₂CO, 300 MHz): δ 3,50-4,15 [5H, -CH₃, -CH₂-]; 4,30-4,50 [m, 2H, -CH₂]; 5,20-5,32 [m, 1H, -CH-O-]; 7,10-7,38 [m, 3H, Ar]; 7,48-7,70 [m, 2H, Ar].

5.1.7. Procedura generale per la sintesi di (Z/E)-indeno[1,2-c]pirazol-4(1H)-one diversamente sostituiti



Reagenti:

1-metil(o fenil)-1H-indeno[1,2c]pirazol-4-one O-ossiranilmetil-ossima (**XVIII**): moli= 0,0001

*i*PrNH₂: d= 0,69 g/L, 5mL

o

*t*BuNH₂: 0,69 g/L, 5mL

o

*n*BuNH₂: 0,90 g/L, 5mL

Toluene: 10mL

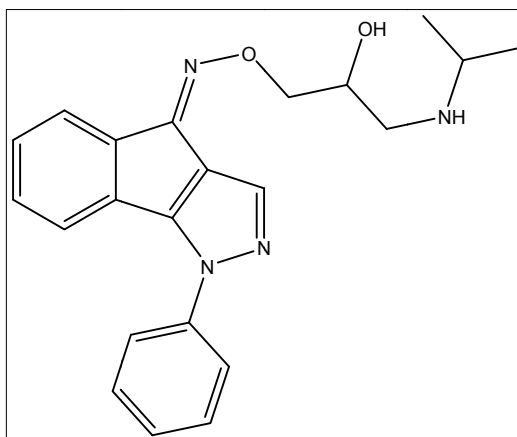
Procedimento:

Il grezzo **XVIII** (xg, 0,1 mmol), ottenuto dalla precedente reazione, è stato solubilizzato in toluene anidro. Alla soluzione risultante, si aggiunge una piccola quantità (5 mL) dell'amina secondaria opportunamente sostituita. Si riscalda a 80°C e si lascia reagire in un tubo sigillato per 7 giorni.



Si raffredda e l'eccesso di solvente è evaporato sotto pressione ridotta ottenendo il grezzo di reazione. Tale grezzo si purifica utilizzando una colonna cromatografica su gel di silice utilizzando come miscela eluente DCM:CH₃OH 9:1. Nell'impaccare la colonna si procede a disattivare la silice utilizzando la miscela eluente al 2% in trietilamina.

Caratterizzazione di (Z/E)-1-fenilindeno[1,2-c]pirazol-4(1H)-one O-(2-idrossi-3-(isopropilamino)propil)ossima (XIXa)



Solido arancione

C₂₂H₂₄N₄O₂; PM= 376 g/mol

Resa %= 10

Analisi spettroscopica:

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,22-1,52 [m, 6H, 2CH₃]; 3,04-3,30 [m, 3H, CH₂-NH; CH]; 4,17-4,18 [m, 1H, CH-OH]; 4,31-4,50 [m, 2H, CH₂-OH]; 5,27 [s, 1H, NH]; 5,42 [s, 1H, OH]; 7,19-7,24 [m, 1H, Ar]; 7,27-7,29 [m, 1H, Ar]; 7,43-7,45 [m, 1H, Ar]; 7,50-7,54 [m, 2H, Ar]; 7,65-7,70 [m, 4H, Ar]; 7,87 [s, 1H, Ar].

¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ 14,38; 19,62; 32,15; 37,04; 50,77; 68,51; 119,37; 119,82; 123,07; 123,25; 128,20; 128,37; 128,77; 129,47; 129,53; 130,25; 130,87; 137,60; 139,29; 140,15; 146,63; 149,08.

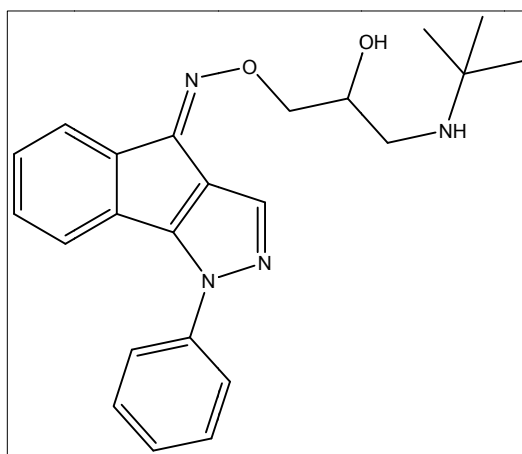
MS (ESI⁺): 377 (M⁺+1)

MS (EI) m/z calcolata per C₂₂H₂₄N₄O₂: 377.1978; **trovata** 377,1968



IR (KBr) (cm^{-1}): 3466; 3433; 2082; 1635; 1531; 1461; 1384; 1261; 1101; 1055; 972; 947; 867; 762; 643; 694; 725.

Caratterizzazione di (Z/E)-1-fenilindeno[1,2-c]pirazol-4(1H)-one O-(3-tert-butilamino)-2-idrossipropil)ossima (XIXb)



Solido marrone

$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_2$; PM= 389,49 g/mol

pf= 112°C; Resa %= 20

Analisi spettroscopica:

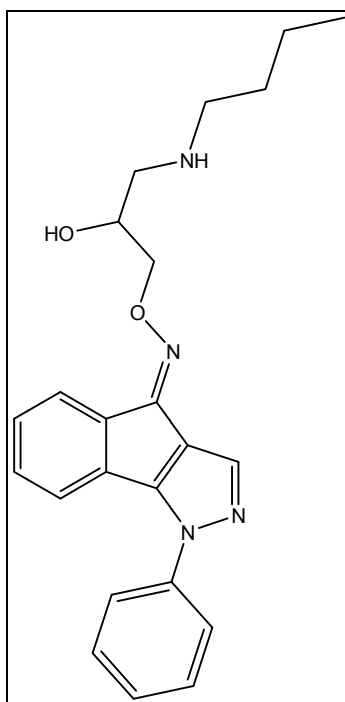
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): δ 1,15 [s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$]; 2,20 [br, 1H, OH]; 3,10-3,80 [m, 3H, $\text{CH}_2\text{-NH}$, CH-OH]; 4,30-4,70 [m, 2H, $\text{CH}_2\text{-O-N}$]; 7,00-7,70 [m, 10H, Ar]; 7,95-8,00 [m, 1H, NH]

MS (ESI^+): 391 (M^++1)

IR (KBr) (cm^{-1}): 3465; 3434; 2926; 2069; 1634; 1529; 1495; 1445; 1383; 1260; 1094; 1030; 969; 759; 697; 580.



Caratterizzazione di (Z/E)-1-fenilindeno[1,2-c]pirazol-4(1H)-one O-(3-butilamino)-2-idrossipropilossima (XIXc)



Solido marrone

C₂₃H₂₆N₄O₂; PM=390,48 g/mol;

pf=215°C; Resa %= 25

Analisi spettroscopica:

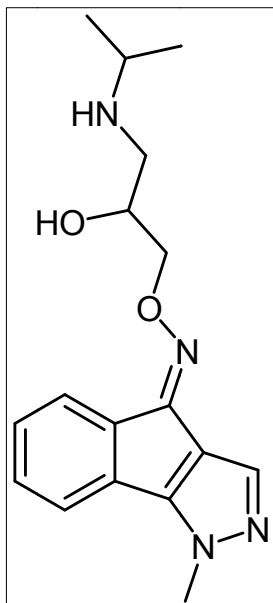
¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 0,70-0,90 [m, 3H, CH₃]; 1,10-1,40 [m, 4H, 2CH₂]; 1,80-2,10 [m, 2H, CH₂-NH]; 1,50 [br, 1H, OH] 2,68-3,10 [m, 2H, CH₂-NH-]; 3,40-3,50 [m, 3H, CH-OH, CH₂-O-N]; 7,35-7,55 [m, 5H, Ar]; 7,60-7,70 [m, 4H, Ar]; 8,12 [s, 1H, Ar]; 9,70 [m, 1H, NH].

MS (ESI⁺): 391 (M⁺+1)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3943; 3861; 3802; 3585; 3521; 3497; 3400; 3230; 3178; 2934; 2859; 1637; 606.



Caratterizzazione di (Z/E)-1-metilindeno[1,2-c]pirazol-4(1H)-one O-(2-idrossi-3-(isopropilamino)propil) ossima (XIXd)



Solido marrone

C₁₇H₂₂N₄O₂; PM=314,38 g/mol

Resa %= 25

Analisi spettroscopica:

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 1,20-1,25 [m, 6H, 2CH₃]; 1,80-2,10 [m, 3H, CH₃]; 2,50-2,90 [m, 2H, 2CH]; 3,00 [br, 1H, NH]; 5,20 [s, 1H, OH]; 3,50-5,10 [m, 4H, 2CH₂]; 7,20-7,35 [m, 2H, Ar]; 7,50-7,70 [m, 2H, Ar]; 8,00 [s, 1H, Ar].

MS (ESI⁺): 315 (M⁺+1)

IR (KBr) (cm⁻¹): 3457; 2930; 2839; 2337; 1754; 1642; 1550; 1396; 1237; 1038; 603; 547.



5.2. Biologia

5.2.1. Materiali e metodi per la valutazione biologica

Animals

Male Wistar rats (HARLAN, Italy), weighing 180-250 g were used. Animal care, sacrifice and experiments were done in accordance with the U.S. National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Isolated and Langendorff perfused heart preparation Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ethyl carbamate (2 g/kg rat, ip) and the rapidly excised hearts were immediately transferred in ice-cold buffered Krebs-Henseleit solution (KHs) for immediate cannulation through the aorta with the use of a glass cannula. Then, perfusion started at a constant flow-rate (12 ml/min). To avoid fluid accumulation, the apex of the left ventricle (LV) was pierced. A water-filled latex balloon, connected to a pressure transducer (BLPR; WRI, Inc., Sarasota, FL), was inserted through the mitral valve into the LV, which allowed the recording of isovolumic contractions and continuous mechanical parameters. Another pressure transducer located just above the aorta was used to record coronary pressure (CP). The perfusion solution consisted of a modified non-recirculating KHs containing (in millimoles) NaCl 113, KCl 4.7, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 1.8, KH₂PO₄ 1.2, glucose 11, mannitol 1.1, Na-pyruvate 5 (pH 7.4; 37 °C; 95% O₂; 5% CO₂). Hemodynamic parameters were assessed using a PowerLab data acquisition system and analyzed using Chart software (both purchased by ADInstruments, Oxford, United Kingdom).

Basal conditions

Cardiac performance was evaluated for inotropism by analyzing the left ventricular developed pressure (LVP; in mm Hg: an index of contractile activity) and the maximal value of the first LVP derivative (mm Hg per second: an index of the maximal rate of LV contraction). Lusitropism was determined by calculating the maximal rate of LVP decline $[-(LVdP/dT)_{max}]$;



mm Hg/sec] and T/-t ratio between the maximal rate of LV contraction $+(LVdP/dT)_{max}$ and the maximal rate of LV relaxation $-(LVdP/dT)_{max}$. After 20 minutes of stabilization, the following basal recordings were measured: LVP=89±3 mmHg, heart rate=280±7 beats/min, RPP=2.5±0.1 104 mmHg beats/min, CP=63±3mmHg, $+(LVdP/dT)_{max}=2492±129$ (mmHg/sec), T/-t=0.08±0.01 (sec), $-(LVdP/dT)_{max} = 1663±70$ (mmHg/sec), HTR=0.05±0.01 (sec) and T/-t or $+(LVdP/dT)_{max}/-(LVdP/dT)_{max}=1.49±1.84$ (mmHg/sec). Endurance and stability of the preparation, analyzed by measuring performance variables every 10 min, showed that the heart preparation is stable for up to 180 min on the perfusion apparatus.

Protocols

ACO stimulated preparations- Repetitive exposure of each heart to a single concentration (1nM) of **ACO 25** or **ACO27** or **ACO 28** revealed absence of desensitization (data not shown). Thus, concentration-response curves were generated by perfusing cardiac preparations with KHs supplemented with increasing concentrations of **ACO 25** or **ACO27** or **ACO 28** (from 1 pM to 10 nM) for 10 min.

5.3 Veicolazione

5.3.1. Membrana cutanea

Anche se la pelle umana può essere la prima scelta come modello per uno studio di un prodotto finale da usare sugli esseri umani, essa non è facilmente ottenibile, e la pelle di ratto o di coniglio può essere facilmente usata per sostituirla. Le membrane da noi usate sono rappresentate dallo strato corneo ricavato dalle orecchie di coniglio.

Dopo che le orecchie sono state lavate e depilate, lo strato corneo è stato rimosso con appositi bisturi e conservato a -20°C fino al momento dell'uso. Prima delle prove di rilascio questo è stato tenuto in soluzione fisiologica a temperatura ambiente per almeno un'ora a scongelare.

5.3.2. Rilascio transdermico mediante celle di Franz

Le prove di rilascio transdermico sono state eseguite mediante l'impiego di celle di Franz di tipo statico e seguendo una procedura riportata in letteratura ed opportunamente modificata [50] (figura 5.1).

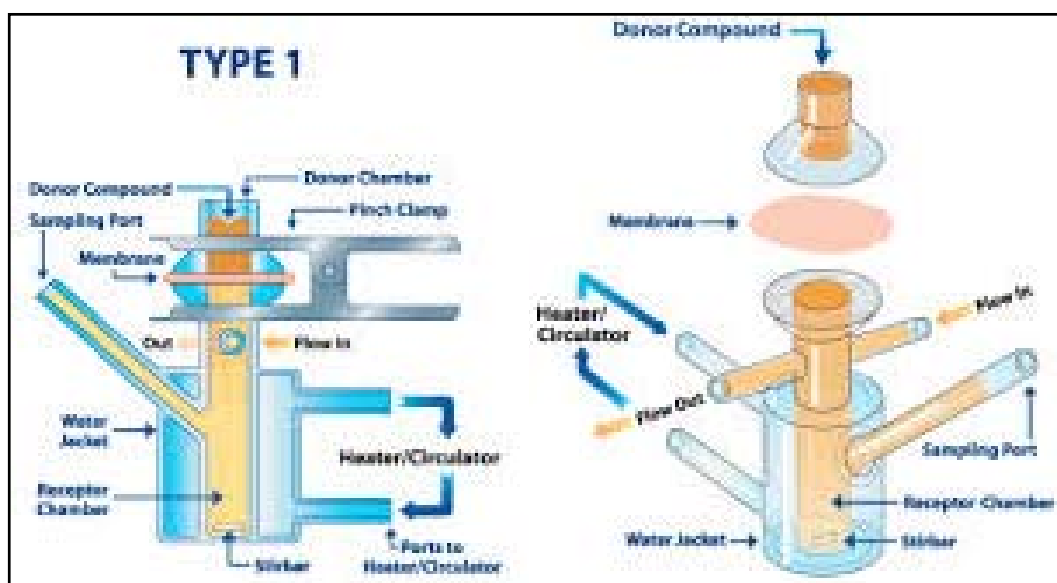


Figura 5.1: Celle di Franz di tipo I

Le celle di Franz consistono di un compartimento donatore e di un compartimento accettore tenuti in posizione da una morsa. Una membrana, nel nostro caso lo strato corneo, è posta tra i due compartimenti che hanno una superficie di contatto pari a $0,4614 \text{ cm}^2$.

Il compartimento accettore presenta un volume di circa 5,5 ml all'interno del quale è stata posta una soluzione di albumina al 5% (p/v) preparata in pbs a pH 7.4 e mantenuta in agitazione magnetica alla temperatura di 37°C attraverso la circolazione di acqua in una camicia di rivestimento.

Nel compartimento donatore sono stati posti 0,5 ml di una soluzione contenente il farmaco e preparata in pbs a pH 7.4 contenente albumina al 5% (p/v).

Ogni prova di rilascio è stata effettuata impiegando contemporaneamente tre celle caricate con la stessa quantità di farmaco per garantire la ripetibilità dei risultati.

In ogni esperimento, ad intervalli di tempo stabiliti (1, 2, 4, 6 e 8 h), tutto il contenuto del compartimento accettore è stato prelevato e ripristinato con un uguale volume di



soluzione al 5% di albumina in pbs (pH 7.4) al fine di mantenere il gradiente chimico del farmaco tra i due compartimenti e favorire la diffusione.

La concentrazione del principio attivo rilasciata è stata, quindi, determinata spettrofotometricamente (figura 5.2).

I risultati preliminari hanno dimostrato l'efficacia del device impiegato, in quanto il rilascio di principio attivo è avvenuto. Tuttavia, tale rilascio si blocca ad una concentrazione del 30%, di conseguenza studi futuri prevedono l'ottimizzazione di tale dispositivo.

% Rilascio	0	6	11	18	23	27
Tempo (h)	0	1	2	4	6	8

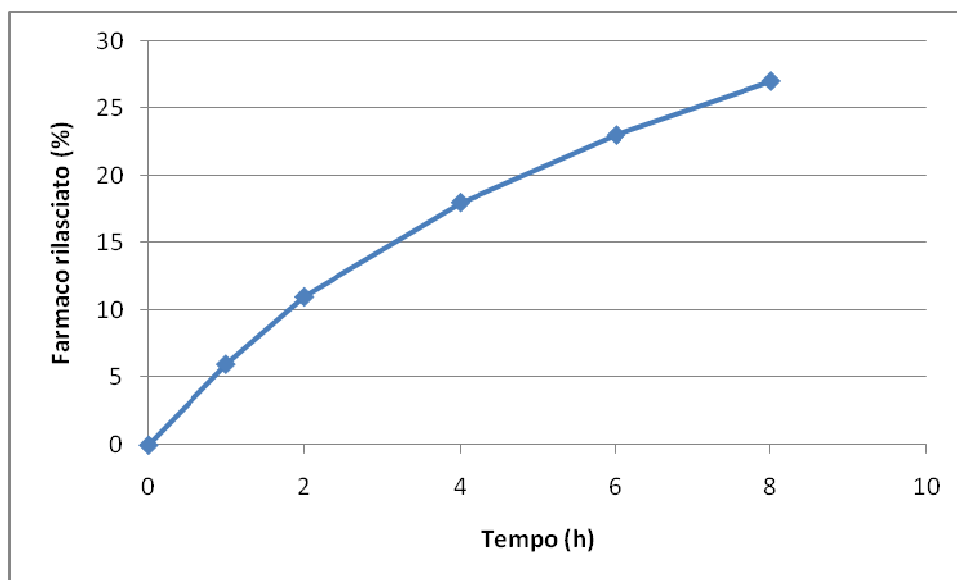


Figura 5.2: Andamento della concentrazione in funzione del tempo

Capitolo 6

Il rilascio transdermico

6.1. Via transdermica

Un caso particolare di assorbimento sistemico dei farmaci è rappresentato dall'assorbimento transdermico o percutaneo. Esso riveste una notevole importanza a causa del sempre maggiore sviluppo di forme farmaceutiche transdermiche [51]. La cute è una vera e propria barriera (figura 6.1) e il maggior ostacolo alla permeazione dei farmaci è rappresentato dallo strato corneo, impermeabile a quasi tutte le sostanze.

Le vie di penetrazione transdermica [52] sono transcellulare, paracellulare e annessiale, cioè attraverso gli annessi cutanei (follicoli piliferi, dotti sudoriferi, dotti sebacei). La via transcellulare è la via preferita. L'equazione che descrive la permeazione attraverso la pelle è quella di diffusione passiva. La permeazione attraverso la pelle rappresenta il tipico esempio di diffusione multistrato. Attualmente sappiamo che la principale barriera dell'assorbimento transdermico dei farmaci è data dallo strato corneo. I fattori fisiologici che influenzano l'assorbimento cutaneo sono:

- idratazione dello strato corneo;
- età;
- sesso e razza;
- regione corporea;
- specie animale;
- processi metabolici della pelle.

I metodi utilizzati per favorire l'assorbimento percutaneo sono:

- aggiunta di tensioattivi;
- aggiunta di promotori di assorbimento.

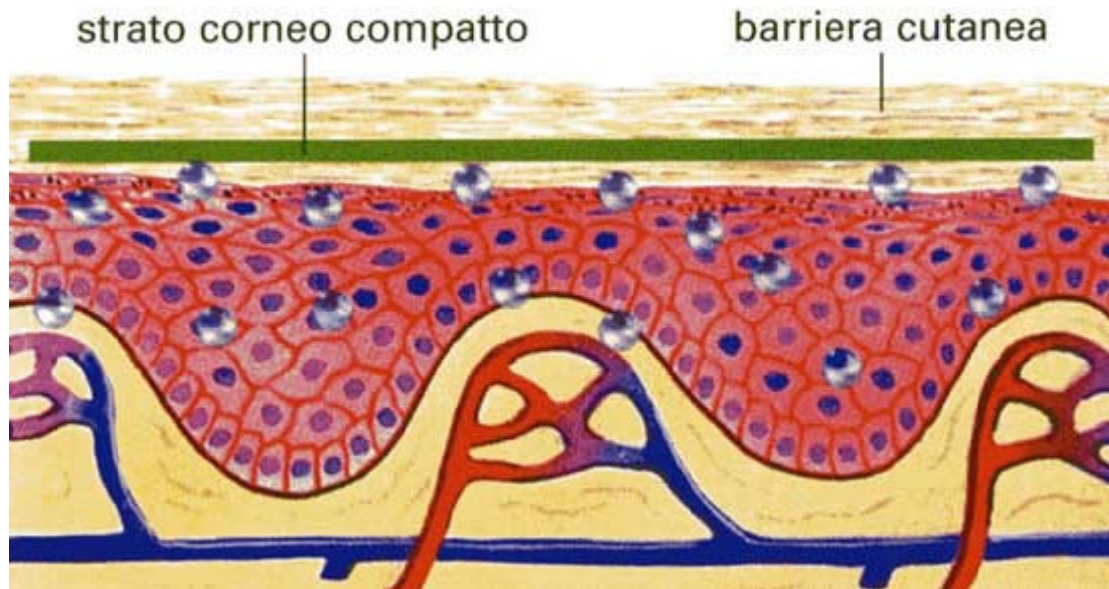


Figura 6.1: Barriera cutanea

6.2. Forme farmaceutiche dermatologiche

Le formulazioni dermatologiche sono tipicamente destinate ad essere applicate sulla pelle o sulle mucose per svolgere un'azione protettiva o emolliente o per rilasciare il principio attivo ai tessuti immediatamente sottostanti il sito di applicazione o nei tessuti attorno al sito di applicazione [53]. Sono principalmente destinate a trattare malattie cutanee o manifestazioni cutanee di malattie sistemiche, limitando gli effetti farmacologici alle regioni cutanee di applicazione. Tali formulazioni possono anche rilasciare il farmaco in regioni più profonde ad una certa distanza dal sito di applicazione, come per esempio ai muscoli. Le formulazioni dermatologiche svolgono tre funzioni principali:

- protezione della porzione di pelle lesa dall'ambiente esterno;
- promozione dell'idratazione cutanea mediante un effetto emolliente;
- veicolazione di un farmaco nella pelle per ottenere un effetto locale o sistemico.

Oltre alle formulazioni per uso topico, esistono anche altre formulazioni destinate ad essere applicate sulla pelle allo scopo di ottenere un effetto sistemico, i cerotti transdermici.

6.3. Struttura della pelle

La pelle può essere considerata come un vero e proprio organo ed è preposta al rivestimento del corpo, alla sua difesa dall'ambiente esterno, alla termoregolazione e ai rapporti di tipo sensoriale facenti parte della vita di relazione. In un individuo adulto la pelle ha un peso medio di 7 Kg e una superficie di circa 1,8 m² (figura 6.2) [54].

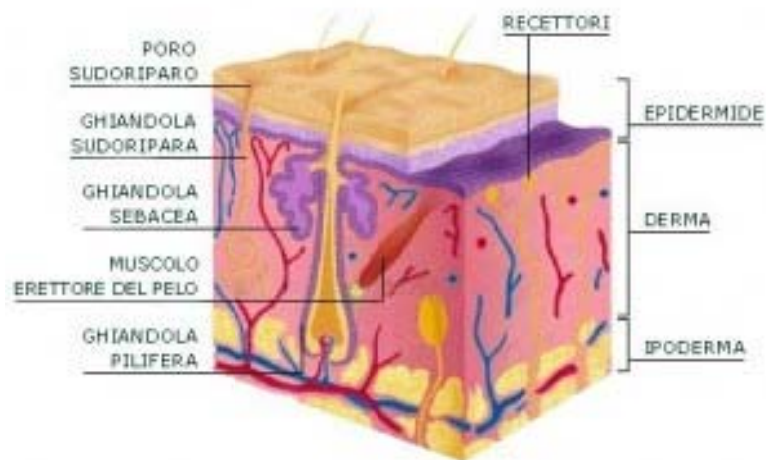


Figura 6.2: Struttura della pelle

L'organo cutaneo è costituito da due tessuti, uno superficiale di tipo epiteliale e uno interno di tipo connettivale. Il tessuto epiteliale è detto epidermide, mentre quello connettivo è composto dal derma. Al di sotto del derma si trova lo strato adiposo sottocutaneo che in molte regioni cutanee dà origine al pannicolo adiposo. Epidermide e derma sono separate da una membrana di giunzione, definita membrana basale o dermo-epidermica, ancorata al derma tramite fibrille di collagene.

6.3.1. Epidermide

L'epidermide è un epitelio pavimentoso pluristratificato e cheratinizzato, di spessore variabile, privo di ghiandole e di vasi sanguigni (figura 6.3).

Lo strato più profondo è lo strato basale o germinativo seguito, procedendo verso la superficie, dagli strati spinoso, granuloso e corneo. Lo strato basale o germinativo è separato dal derma dalla membrana basale ed è costituito da cellule cubiche o cilindriche, caratterizzate dalla capacità di riprodursi per mitosi. L'attività mitotica



permette agli elementi cellulari persi a causa della normale desquamazione o di traumi, di essere rimpiazzate prontamente. Il processo differenziativo, che dal cheratinocita cilindrico basale, attraverso l'ordinato succedersi degli strati epidermici, porta progressivamente al corneocita, è detto cheratinizzazione ed è caratterizzato da profondi cambiamenti strutturali e biochimici.

Lo strato corneo (figura 6.4), il più superficiale, è invece costituito da vari strati di cellule morte, i corneociti. Si tratta di 15-20 strati di cellule appiattite, prive di nucleo, ricche di cheratina e povere di lipidi, immerse in una matrice extracellulare costituita da un alternarsi di strati idrofili e lipofili. La combinazione di cellule cornificate idrofile e di materiale intercellulare idrofobico risulta essere una barriera molto efficiente nei confronti sia delle sostanze idrofiliche che di quelle idrofobiche. La proteina più rappresentata è la cheratina. Lo strato corneo ha principalmente una funzione di barriera verso gli scambi con l'ambiente esterno: esso infatti si oppone sia all'uscita di liquidi dall'organismo che all'ingresso di sostanze estranee.

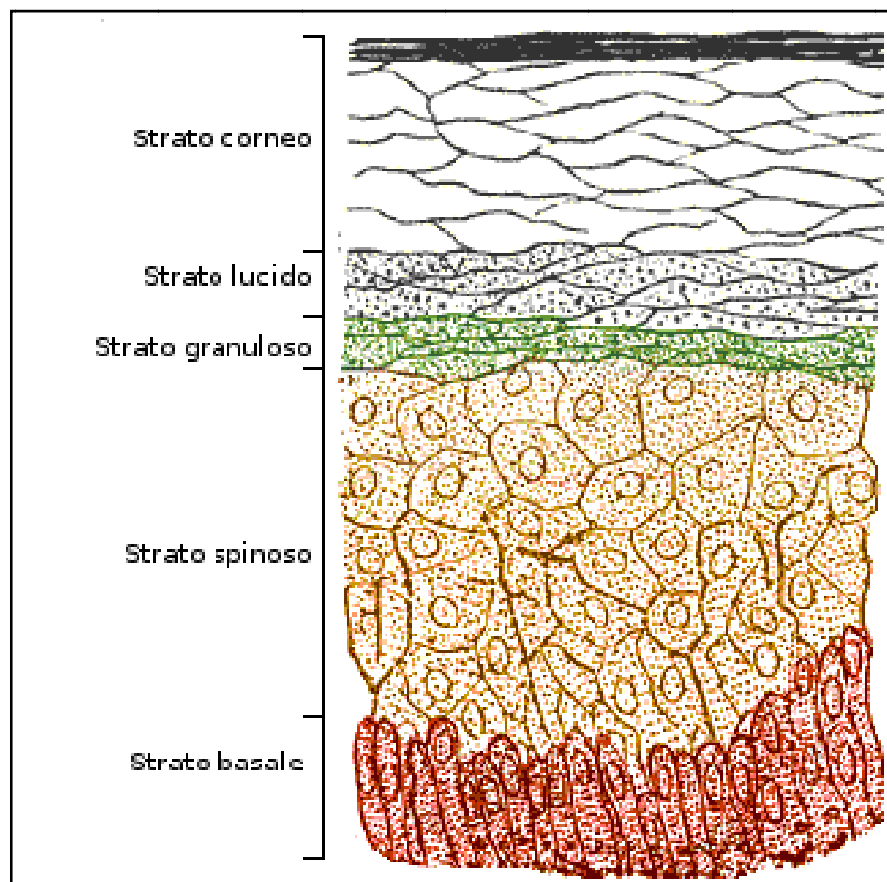


Figura 6.3: Epidermide

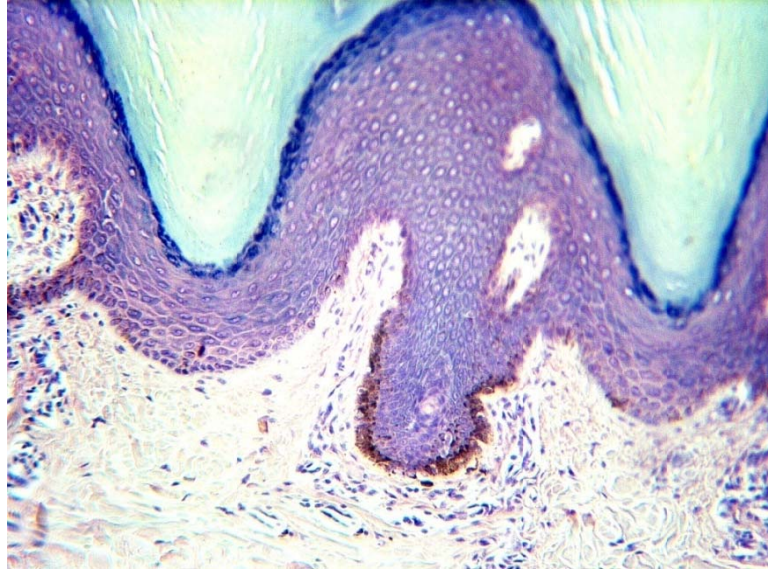


Figura 6.4: Strato corneo

6.3.2. Derma

Il derma si differenzia dall'epidermide per la scarsità di elementi cellulari. Mentre l'epidermide è costituita da cellule addossate le une alle altre, nel derma le cellule (fibroblasti) sono molto meno numerose e disperse in una matrice extracellulare. Il derma consiste essenzialmente in una matrice di tessuto connettivo costituito da proteine fibrose che include una sostanza fondamentale costituita da mucopolisaccaridi. Le fibre di collagene presenti nel derma forniscono sostegno, elasticità e resistenza meccanica alla pelle. A livello del derma sono presenti le terminazioni nervose afferenti ed efferenti, oltre i capillari sanguigni. La rete capillare è essenziale non solo per il nutrimento del derma ma anche per l'epidermide che è priva di vascolarizzazione.

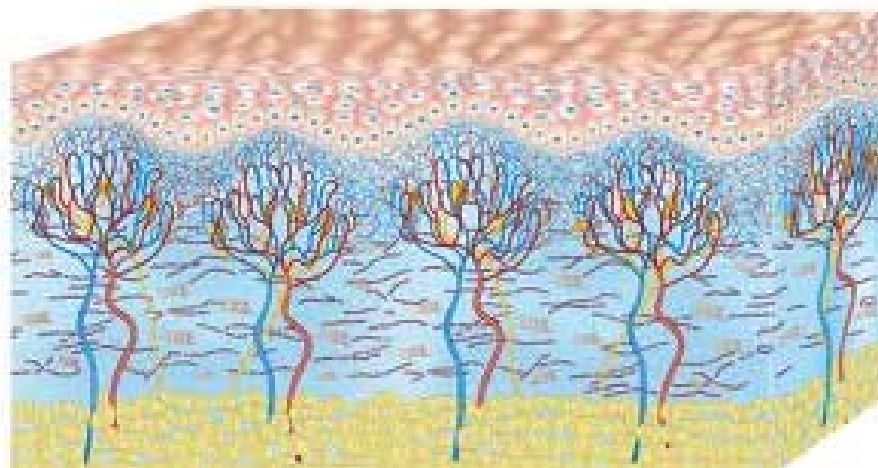


Figura 6.5: Derma



6.3.3. Ipoderma

Al di sotto del derma si ritrova l'ipoderma, o strato adiposo sottocutaneo, di spessore estremamente variabile a seconda della regione del corpo considerata e a seconda dell'individuo. Gli elementi cellulari presenti a questo livello, gli adipociti, sono deputati all'immagazzinamento di trigliceridi come materiale di scorta energetica dell'organismo. L'ipoderma oltre che riserva energetica, svolge funzione coibente e quindi interviene nel processo di termoregolazione.

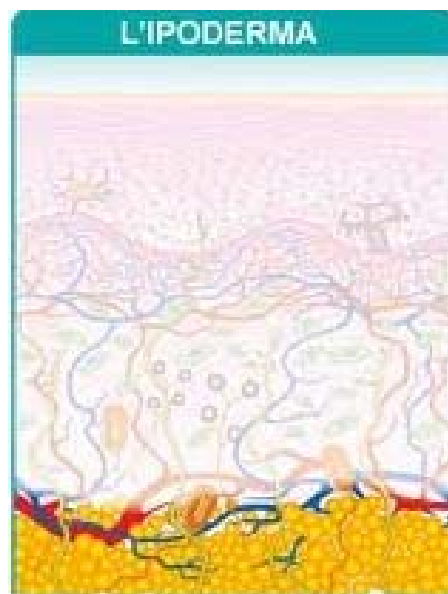


Figura 6.6: Ipoderma

6.3.4. Annessi cutanei

La pelle è attraversata per tutto il suo spessore dagli annessi cutanei, cioè i peli, che con le ghiandole sebacee costituiscono l'unità pilo sebacea, le ghiandole apocrine (localizzate esclusivamente nella regione inguinale e ascellare) e le ghiandole sudoripare eccrine. Le ghiandole sebacee sono deputate alla produzione di materiale lipidico, il sebo, mentre le ghiandole sudoripare secernono un liquido acquoso, fondamentale per la termoregolazione. Gli annessi cutanei sono distribuiti in modo non omogeneo sulla superficie corporea. Anche le unghie tra gli annessi cutanei della pelle e possono essere sede di patologie e dunque di applicazione di prodotti dermatologici.

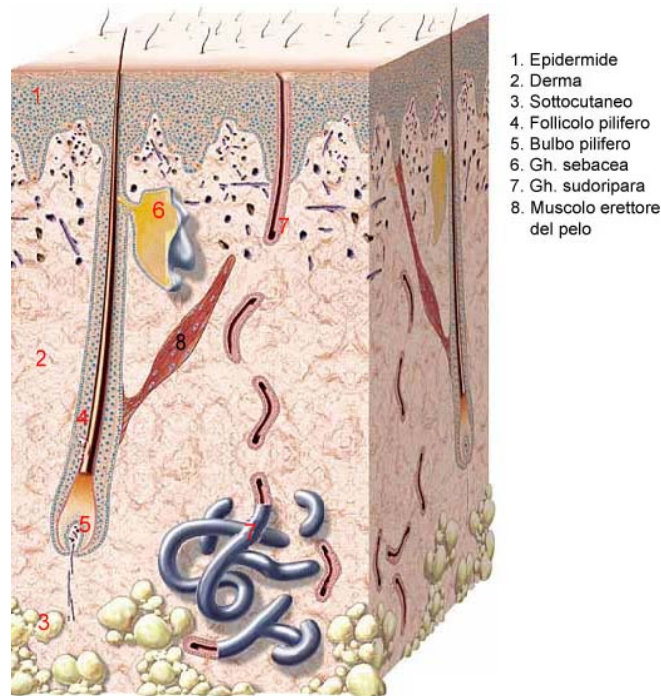


Figura 6.7: Annessi cutanei

6.3.5. Mucose

Anche le mucose presentano una struttura multistratificata, con la differenza principale di essere rivestite da uno strato di muco. Il muco è una dispersione acquosa di proteine, rappresentate in modo prevalente da mucina, che in acqua forma delle soluzioni appiccicose. Immediatamente sotto l'epitelio si trova la lamina basale che lo connette ad una lamina di tessuto connettivo denso ed irregolare, chiamato lamina propria.

6.4. Assorbimento percutaneo dei farmaci

L'assorbimento di molecole attraverso la pelle può essere considerato come l'insieme di processi di ripartizione e di diffusione, la cui fase limitante è, nella maggior parte dei casi, rappresentata dal superamento dello strato corneo, lo strato più esterno dell'epidermide.

La sostanza attiva, veicolata in una opportuna Forma Farmaceutica, viene ceduta prima alla superficie dell'epidermide, poi diffondendo attraverso le cellule dello strato corneo raggiunge il derma dove incontra i vasi capillari e la circolazione sistemica.

Il passaggio del farmaco attraverso lo strato corneo può avvenire attraverso tre vie 1) la via intracellulare attraverso i corneociti, 2) via intercellulare attraverso la matrice



extracellulare, 3) via annessiale attraverso i follicoli piliferi e i dotti delle ghiandole sudoripare e sebacee.

La via annessiale è la via di elezione per farmaci idrofili avendo i pori caratteristiche polari. Tuttavia, poiché gli annessi cutanei costituiscono solo lo 0,1% della superficie cutanea totale, l'assorbimento trans follicolare ha, in genere, una scarsa rilevanza. È quindi la via trans epidermica, comprendendo le vie intra ed intercellulare, quella che offre le maggiori possibilità di penetrazione e, poiché lo strato corneo è costituito da cellule morte, il passaggio si svolge con un processo di diffusione passiva. La via intercellulare, prevede il passaggio attraverso la matrice extracellulare ed è preferenziale per farmaci lipofili. L'importanza della via di penetrazione intercellulare è confermata dall'esistenza di una relazione tra la lipofilia di un composto e il suo coefficiente di permeabilità attraverso la pelle. Quindi la fase limitante la permeazione di una sostanza è rappresentata da una barriera di natura idrofobica, come la matrice lipidica extracellulare. Una eccessiva lipofilia del farmaco però se da un lato favorisce il suo accumulo nello strato corneo, dall'altro ne ostacola la penetrazione negli strati più profondi di natura polare.

Infine l'ultima via, quella intracellulare, presuppone il passaggio della molecola prima attraverso la parete cellulare del corneocita, che proprio per le sue caratteristiche strutturali è uno degli ostacoli principali e poi, superata la membrana, le molecole polari si orientano verso le zone acquose del corneo cita, mentre quelle lipofile si dispongono verso le zone a maggior contenuto lipidico.

Una volta superato lo strato corneo le molecole diffondono rapidamente attraverso gli strati viventi dell'epidermide e nel derma dove possono avvenire fenomeni di metabolizzazione, di inattivazione e nel caso di pro farmaci, di attivazione [55,56].

6.5. Cinetiche di permeazione dei farmaci attraverso la pelle

La cinetica di permeazione di un farmaco attraverso la pelle può essere descritta dalla prima legge di Fick:

$$J = \frac{dM}{dt} \frac{1}{A} = -D \frac{dc}{dx} \quad (\text{eq.1})$$

Dove J rappresenta il flusso di sostanza, D il coefficiente di diffusione e $\frac{dc}{dx}$ il gradiente di concentrazione ai due lati della membrana.



Le soluzioni della prima legge di Fick sono diverse a seconda che ci si trovi in condizioni di sorgente costante o di sorgente non costante.

Nel caso di sorgente costante, allo *steady state*, il flusso di farmaco è descritto dall'equazione 2:

$$J = DK/h (c_d - c_r) = P (c_d - c_r) \quad (\text{eq.2})$$

Dove $(c_d - c_r)$ rappresenta il gradiente di concentrazione del farmaco ai due lati della membrana, K è il coefficiente di ripartizione tra membrana e veicolo e h è lo spessore e h è lo spessore della membrana. P rappresenta il coefficiente di permeabilità ed è uguale a DK/h .

6.6. Fattori che influenzano l'assorbimento percutaneo di farmaci

L'accumulo di farmaco negli strati cutanei e il raggiungimento di livelli terapeutici possono dipendere da diversi fattori, che possono essere classificati in biologici e chimico-fisici.

6.6.1. Fattori biologici

Come detto, l'ostacolo principale alla penetrazione di farmaci nella pelle è costituito dallo strato corneo, quindi modificazioni nella permeabilità dello strato corneo si riflettono sulla capacità di penetrazione delle sostanze applicate sulla pelle.

Lo spessore dello strato corneo è uno dei fattori fisiologici che influenzano l'assorbimento percutaneo dei farmaci. Tale spessore varia a seconda delle regioni del corpo considerate. Anche l'età è un fattore da considerare, in modo particolare nel caso di neonati nei quali lo sviluppo della barriera cutanea non è ancora del tutto completato e quindi la permeabilità è molto elevata.

Lo strato di idratazione dello strato corneo è uno dei fattori più importanti nel determinare la velocità di permeazione di un soluto. Fattori ambientale, fisiologici e farmacologici possono modificare l'idratazione cutanea. L'occlusione e l'aumentata umidità ambientale possono aumentare il contenuto di acqua nello strato corneo e, di conseguenza l'elasticità e la permeabilità cutanea. L'applicazione di formulazioni topiche occlusive, che impediscono l'evaporazione dell'acqua dalla superficie cutanea,



può incrementare in modo considerevole la quantità di farmaco assorbita. Anche la temperatura può alterare la permeabilità dello strato corneo, in quanto un aumento di temperatura rende più fluidi i lipidi della matrice dello strato corneo aumentandone la permeabilità.

6.6.2. Fattori chimico-fisici

Le caratteristiche chimico-fisiche del farmaco, in termini di solubilità nel veicolo prescelto, ripartizione e grado di ionizzazione, possono influenzare la permeazione del farmaco stesso attraverso la pelle. Poiché il passaggio del farmaco attraverso la pelle è un fenomeno diffusivo, dipende dal gradiente di concentrazione del farmaco ai due lati della pelle nonché dal coefficiente di ripartizione del farmaco tra la pelle e il veicolo. È da tenere presente che la pelle, a causa della struttura e della composizione dello strato corneo, si comporta come una barriera lipofila, più facilmente attraversabile da molecole apolari. Un aumento di solubilità del farmaco nel veicolo è positivo, in quanto aumenta il gradiente di concentrazione. È altresì da considerare la scelta di un solvente che garantisce un'elevata solubilità può avere delle ripercussioni negative sul coefficiente di ripartizione, in quanto solubilità e ripartizione variano in senso inverso. Molti dei farmaci utilizzati sono basi o acidi deboli per cui, nel caso in cui vengano impiegate delle soluzioni acquose, possono essere presenti in forma neutra o ionizzata in funzione del pH della formulazione.

6.7. Somministrazione transdermica

La cute costituisce un potenziale sito di assorbimento per numerosi farmaci per il trattamento di patologie diffuse o localizzate.

Nel primo caso si parla di somministrazione trans dermica in quanto il farmaco, penetrando attraverso la cute, raggiunge il circolo e l'organo bersaglio, esercitando un effetto sistemico.

L'applicazione di farmaci sulla pelle può essere sfruttata vantaggiosamente per ottenere un effetto sistemico. Anche se in teoria potrebbero essere impiegate diverse forme, in pratica l'unica utilizzata è costituita dai cerotti, che sono gli unici in grado di garantire con precisione la quantità di principio attivo applicato, oltre che l'area e il tempo di contatto. A differenza delle tradizionali forme topiche, i cerotti transdermici hanno



come finalità quella di liberare a velocità controllata il farmaco attraverso la pelle, in modo tale che avvenga un assorbimento da parte dei capillari sanguigni presenti a livello del derma e quindi una distribuzione del farmaco in tutto l'organismo.

6.8. Sistemi transdermici per il rilascio controllato del farmaco

Esistono diversi tipi di sistemi transdermici: dai più semplici cerotti “piatti”, i quali rilasciano il farmaco per un breve periodo di tempo, a quelli più complessi composti da quattro strati: un isolante esterno, un serbatoio contenente il farmaco, una membrana porosa di polipropilene che controlla il ritmo del rilascio lento e continuo, ed infine un ultimo strato che grazie ad un solvente oleoso permette al farmaco di raggiungere lo strato profondo della pelle nel quale si trovano i vasi sanguigni (figura 6.8).

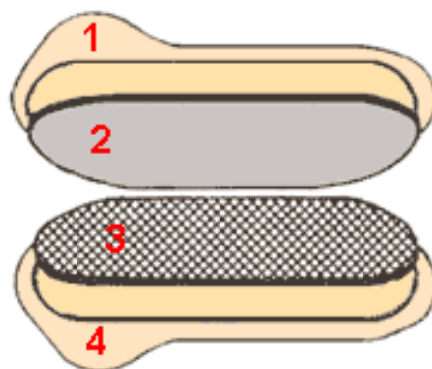


Figura 6.8: Esempio di sistema transdermico

I sistemi terapeutici transdermici, o cerotti, sono sistemi multi-laminati che sono applicati sulla pelle per semplice pressione. Pur appartenendo a tipologie diverse, essi presentano alcuni elementi comuni: un *backing*, ovvero uno strato impermeabile che svolge la funzione di sostegno e di protezione e che non permette la dispersione del principio attivo all'esterno; uno strato adesivo, che consente il posizionamento del cerotto in una parte del corpo e lo mantiene in posizione per tutta la durata dell'applicazione; ed il deposito di farmaco o serbatoio. I sistemi transdermici offrono il grande vantaggio di non essere invasivi per il paziente, poiché vengono applicati sulla pelle come un semplice cerotto; tuttavia i farmaci in commercio sotto questa forma non sono molto numerosi (scopolamina, nitroglicerina, estradiolo, atenololo [57], clonidina, nicotina, testosterone e fentanile; quest'ultimo utilizzato nella terapia del dolore).



I sistemi transdermici costituiscono un tipo di somministrazione razionale e assai più comodo soprattutto per coloro che devono seguire lunghe terapie andando incontro talvolta ad inopportune dimenticanze. L'unico inconveniente di questi prodotti è l'arrossamento della zona di applicazione.

Le sempre maggiori conoscenze acquisite sui farmaci che hanno applicazioni topiche e la disponibilità di sostanze che ne facilitano e ne potenziano l'assorbimento aprono nuove possibilità all'utilizzo dei sistemi transdermici.



Bibliografia

- [1] Freeman K.; Tao W.; Sun H.; Soonpaa M.H.; Rubart M. (2013). In situ three-dimensional reconstruction of mouse heart sympathetic innervation by two-photon excitation fluorescence imaging. *J Neurosci Methods*. 13: 316-6.
- [2] Lympelopoulou A. (2013). Physiology and pharmacology of the cardiovascular adrenergic system. *Front Physiol*. 4: 4-240.
- [3] Barer D.H.; Cruickshank J.M.; Ebraim S.B.; Mitchell J.R.A. (1988). Low Dose Beta-Blockade in Acute Stroke (“BEST” trial): an evaluation. *British Medical Journal*. 296.
- [4] Frielle T., Kiefer W.D.; Caron M.G. and Lefkowitz R.J. (1988). Structural Basis of Beta-Adrenergic Receptor Subtype Specificity Studied With Chimeric β_1/β_2 -Adrenergic Receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85: 9494-9498.
- [5] B.G. Katsung. (2000). “Farmacologia generale e clinica”, IV Ed. Piccin.
- [6] Okine L.K.; Ioannides C.; Parke D.V. (1983). Effect of some beta-adrenergic blocking agents on tissue guanylate cyclase and cyclic nucleotides in the rat. *Toxicol. Lett*. 18(3):235-40.
- [7] Walsh K. B.; Beganisich T.B.; nad Kass R.S. Beta-Adrenergic Modulation of Cardiac Ion Channels. Differenzial Temperature Sensivity of Potassium and Calcium Currents. *From the University of Rochester, School of Medicine and Dentistry, Department of Physiology, Rochester, New York 14642*.
- [8] Zaiken K.; Hudd T.R.; Cheng J.W. (2013). A review of the use of angiotensin receptor blockers for the prevention of cardiovascular events in patients with essential hypertension without compelling indications. *Ann Pharmacother*. 47: 686-93.
- [9] Sindone A.; Erlich J.; Perkovic V.; Suranyi M.; Newman H.; Lee C.; Barin E.; Roger SD. (2013). ACEIs for cardiovascular risk reduction - Have we taken our eye off the ball? *Aust Fam Physician*. 42: 634-8.



- [10] Decolmer P.B.S.; Chatterjee S.S.; Cruickshank J.M., Benson M.K. and Sterling G.M. (1978). Beta-blockers and asthma. *British Heart Journal*. 40:184-189.
- [11] Bexheti S.; Haliti N.; Islami H.; Sukalo A.; Nuraj B.; Krasniqi V.; Kutllovci S.; Beqiraj R.; Disha M. (2010). Development of receptor bronchial system in isolated preparation of piglet trachea in vitro. *Med Arh*. 64:71-4.
- [12] Barrett A.M. (1985). Cardiac beta-adrenoceptor blockade: the quest for selectivity *J Pharmacol*. 2:95-108.
- [13] Introduzione alla chimica farmaceutica. Seconda edizione. Graham L. Patrick. Editore Edises.
- [14] Broadley K.J.; Fehler M.; Ford W.R.; Kidd E.J. (2013). Functional evaluation of the receptors mediating vasoconstriction of rat aorta by trace amines and amphetamines. *Eur J Pharmacol*. 715: 370-80.
- [15] Chimica Farmaceutica. Prima edizione italiana. Schröder E.; Rufer C.; Schmiechen R. Società Editrice Scientifica.
- [16] Kristek F.; Koprdoва R.; (2011). Long-term effect of prazosin administration on blood pressure, heart and structure of coronary artery of young spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Pharmacol*. 62: 295-301.
- [17] Shrivastava A.; Gupta V.B. (2012) Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Simultaneous Determination of Prazosin, Terazosin, and Doxazosin in Pharmaceutical Formulations. *Sci Pharm*. 80: 619-31.
- [18] Kutlu O.; Yalcinkaya M.; Kutlu S.; Elpek G.O.; Köksal I.T.; Kukul E. (2012) *J Nephrol*. Effect of doxazosin on expression of eNOS in rat kidney in the presence of partial bladder outlet obstruction. 25: 750-4.
- [19] Orthostatic hypertension: home blood pressure monitoring for detection and assessment of treatment with doxazosin.
Hoshide S.; Parati G.; Matsui Y.; Shibazaki S.; Eguchi K.; Kario K. (2012). *Hypertens Res*. 35: 100-6.



- [20] McMartin L.; Summers R.J. (1999). Functional analysis of desensitization of the beta-adrenoceptor signalling pathway in rat cardiac tissues following chronic isoprenaline infusion. *Br J Pharmacol.* 4:1012-20.
- [21] Black J.W.; Duncan W.A.; Shanks R.G. (1997). Comparison of some properties of pronethalol and propranolol. 1965.*Br J Pharmacol.* 120: 285-99.
- [22] Fares H.; Lavie C.J.; Ventura H.O. (2012). Vasodilating versus first-generation β -blockers for cardiovascular protection. *Postgrad Med.* 124:7-15.
- [23] Neset A.; Nordseth T.; Kramer-Johansen J.; Wik L.; Olasveengen T.M. (2013). Effects of adrenaline on rhythm transitions in out-of-hospital cardiac arrest. *Acta Anaesthesiol Scand.*
- [24] Baker J.G. (2010). The selectivity of beta-adrenoceptor agonists at human beta-, beta2- and beta3-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 5: 1048-61.
- [25] Laustiola K.; Kaukinen S.; Seppälä E.; Jokela T.; Vapaatalo H. (1986). Adrenaline infusion evokes increased thromboxane B2 production by platelets in healthy men: the effect of beta-adrenoceptor blockade. *Eur J Clin Invest.* 16:473-9.
- [26] Hollenberg N.K. (2005). The role of beta-blockers as a cornerstone of cardiovascular therapy. *Am J Hypertens.* 18:165-168.
- [27] Cruickshank J.M. (2010). Beta-blockers and heart failure. *Indian Heart J.* 62:101-10.
- [28] Ciszewski P.; Tyczka J.; Nadolski J.; Roszak M.; Dyszkiewicz W. (2013). Comparative efficacy and usefulness of acebutolol and diltiazem for the prevention of atrial fibrillation during perioperative time in patients undergoing pulmonary resection. *Thorac Cardiovasc Surg.* 4: 365-72.
- [29] Chapman A.B.; Cotsonis G.; Parekh V.; Schwartz G.L.; Gong Y.; Bailey K.R.; Turner S.T.; Gums J.G.; Beitelshes A.L.; Cooper-Dehoff R.; Boerwinkle E.; Johnson J.A. (2013). Night Blood Pressure Responses to Atenolol and Hydrochlorothiazide in Black and White Patients With Essential Hypertension. *Am J Hypertens.*



- [30] Wright R.A.; Perrie A.M.; Stenhouse F.; Alberti K.G.; Riemersma R.A.; MacGregor I.R.; Boon N.A. (1994). The long-term effects of metoprolol and epanolol on tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 in patients with ischaemic heart disease. *Eur J Clin Pharmacol.* 3: 279-82.
- [31] Buchneva N.V.; Kuz'min O.B. (2012). Effect of the third generation beta-blockers on ion-regulating renal function in rats with heart failure model. *Eksp Klin Farmakol.* 75: 7-9.
- [32] Bertera F.M., Del Mauro J.S.; Lovera V.; Chiappetta D.; Polizio A.H.; Taira C.A.; Höcht C. (2013). Acute effects of third generation β -blockers on short-term and beat-to-beat blood pressure variability in sinoaortic-denervated rats. *Hypertens Res.* 36: 349-55.
- [33] DiNicolantonio J.J.; Hackam D.G.(2012). Carvedilol: a third-generation β -blocker should be a first-choice β -blocker. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 10:13-25.
- [34] Van Den Heuvel A.F.; van der Ent M.; van Veldhuisen D.J.; Kruijssen D.A.; Bartels G.L.; Remme W.J. (1998). Effects of epanolol, a selective beta1-blocker with intrinsic sympathomimetic activity, in patients with ischemic left ventricular dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 4: 506-12.
- [35] Venneker E.H.; Remme W.J.; van Hoogenhuyze D.C.; Krauss X.H.; Bartels G.L.; Kruijssen D.A.; Storm C.J.; van Schelven D. (1994). Acute systemic and antiischemic effects of epanolol in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2: 211-9.
- [36] Saltvedt E.; Fauchald P. (1980). Effect of single and twice daily doses of primidolol (UK-11,443) in hypertension. *Curr Med Res Opin.* 8: 528-33.
- [37] Konstas A.G.; Holló G.; Mikropoulos D.G.; Haidich A.B.; Dimopoulos A.T.; Empeslidis T.; Teus M.A.; Ritch R. (2013). 24-hour efficacy of the bimatoprost-timolol fixed combination versus latanoprost as first choice therapy in subjects with high-pressure exfoliation syndrome and glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 97: 857-61.



- [38] Webb A.J.; Rothwell P.M. (2012). The effect of antihypertensive treatment on headache and blood pressure variability in randomized controlled trials: a systematic review. *J Neurol.* 259:1781-7.
- [39] Struble L.M. (2010). Tremors: learning to stop the shakes. *Nurse Pract.* 35:18-25.
- [40] Khadke V.V.; Khadke S.V.; Khare A. (2012). Oral propranolol--efficacy and comparison of two doses for peri-operative anxiety. *J Indian Med Assoc.* 10:457-60.
- [41] Ferrarini P.L.; Mori C.; Primofiore G.; Da Settimo A.; Breschi M.C.; Martinotti E.; Nieri P.; Ciucci M.A. (1990). Synthesis and β -blocking activity of (E)- and (Z)-iminoethers of 1,8-naphthyridine. Potential antihypertensive agents. *Eur J Med Chem* 5: 489-496.
- [42] Ferrarini P.L.; Mori C.; Badawneh M.; Calderone V.; Greco R.; Manera C.; Martinelli A.; Nieri A.; Saccomanni G. (1999). Synthesis and β -blocking activity of (R,S)-(E)-oximeethers of 2,3-dihydro-1,8-naphthyridine and 2,3-dihydrothiopyrano[2,3-b]pyridine: potential antihypertensive agents – Part IX. *Eur. J. Chem.* 35: 315-826.
- [43] Tandon V.K.; Chandra A. (1992). Synthesis and Hypotensive Activity of 3,4-Dihydro-1(2H)-Benzoxepine Oxime Ethers and Their Derivatives. *Hypotensive Agents.* 221-225.
- [44] Gentili D.; Lapucci A.; Macchia B.; Macchia M.; Martinelli A.; Nencetti S.; Orlandini E. (1995). Synthesis and β -adrenergic activity of a series of 3-(substituted-benzylidenoxy)propano amine derivatives. *Il Farmaco.* 50: 519-526.
- [45] Rochais C.; Lisowski V.; Dallemagne P.; Rault S. (2004). First synthesis of arylpyrrolo- and pyrazolopyrrolizinones as useful agents with potential biological interest. *Tetrahedron Letters.* 45 (6353-6355).
- [46] Campagna F.; Palluotto F.; Carotti A.; Maciocco E. (2004). Synthesis, central and peripheral benzodiazepine receptor affinity of pyrazole and pyrazole-containing polycyclic derivatives. *Il Farmaco.* 59 849-856.



- [47] Fravolini A.; Schiaffella F. (1977). Oxime ether derivatives of thiochroman-4-ones as β -adrenergic blocking agents. *Eur. J. Med. Chem.* 4: 347-350.
- [48] Zang H.; Wang M.; Cheng B.W.; Song J. (2009). Ultrasound-promoted synthesis of oximes catalyzed by a basic ionic liquid [bmIm] OH. *Ultrasonic Sonochemistry.* 16: 301-303.
- [49] Genest D., (2012). Conception, synthèse et évaluation biologique de nouveaux composés à dualité d'action dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.
- [50] Tavano L., Muzzalupo R., Trombino S., Cassano R., Pingitore A., Picci N. (2010). Effect of formulations variables on the *in vitro* percutaneous permeation of Sodium Diclofenac from new vesicular systems obtained from Pluronic triblock copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 79: 227-234.
- [51] Mitragotri S. (2000). Synergistic effect of enhancers for transdermal drug delivery. *Pharm. Res.* 17 (11) 1354–1359.
- [52] Knutson K.; Krill S. L.; Lambert W.; Higuchi J.; W. I. Higuchi. (1987). Physico-chemical aspects of transdermal permeation. *J. Control Release* 6:59–74.
- [53] Surber C.; Davis A. F. (2002). Bioavailability and bioequivalence of dermatological formulations. *Derm and trans formul.* 119: 401-498.
- [54] Katzung B.G. Farmacologia Generale e Clinica. V edizione italiana. Piccin.
- [55] Williams A. C.; Barry B. W. (1992). Skin Absorption Enhancers. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 9: 305–353.
- [56] Vavrova K.; Zbytovsk J.; Hrabalek A. (1996). Amphiphilic transdermal permeation enhancers: structure-activity relationships. *Curr Med Chem.* 85:249.
- [57] Jagdale S.C.; Sali M.S.; Barhate A.L.; Kuchekar B.S.; Chabukswar A.R. (2013). Formulation, development, and evaluation of floating pulsatile drug delivery system of atenolol. *PDA J Pharm Sci Technol.* 67: 214-28.