



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Farmacia

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia
Farmaceutiche

Tesi di Laurea:

OTTIMIZZAZIONE SINTETICA E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI NUOVI INIBITORI DI METZINCINE

Relatori:

Prof.ssa Elisa Nuti
Dott.ssa Doretta Cuffaro

Candidato:

Sara Orrù

Sommario

CAPITOLO 1: LA MATRICE EXTRACELLULARE (ECM)	5
1.1 METZINCINE: ADAMs E MMPs	5
1.2 LE METALLOPROTEASI DI MATRICE (MMPs)	6
1.2.1 Struttura delle MMPs	9
1.2.2 Regolazione delle MMPs	10
1.2.3 La metalloelastasi MMP-12	11
1.2.4 Inibitori delle MMP-12	12
1.3 ADAMs (A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASES)	15
1.3.1 Sintesi e struttura	15
1.3.2 Funzioni fisiologiche delle ADAMs	17
1.3.3 ADAM8	18
1.3.4 Inibitori di ADAM8	21
CAPITOLO 2: I LIQUIDI IONICI (ILS)	25
2.1 STRUTTURA E PROPRIETÀ DEI LIQUIDI IONICI	26
2.2 STRUTTURA DEI LIQUIDI IONICI	26
2.3 PROPRIETÀ CHIMICO-FISICHE	27
2.4 REAZIONE DI ULLMANN	30
2.5 REAZIONI DI SUZUKI	31
2.6 LIQUIDI IONICI E TECNOLOGIA MICROONDE (MW)	32
CAPITOLO 3: INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE	33
3.1 PROGETTAZIONE, SINTESI E VALUTAZIONE BIOLOGICA DI INIBITORI SELETTIVI DI ADAM8	33
3.1.1 Sintesi	38
3.1.2 Risultati biologici	39
3.2 MESSA A PUNTO DI METODOLOGIE "GREEN" PER LA SINTESI DI INIBITORI SELETTIVI DI MMP-12	42
3.2.1 Reazione di Ullmann utilizzando ILS	44
3.2.2 Reazione di Suzuki-Miyaura utilizzando ILS	48

CAPITOLO 4: PARTE SPERIMENTALE	51
4.1 MATERIALI E METODI	51
4.2 SINTESI DI 4-(PENT-3-IN-1-IL) BENZENSOLFONIL CLORURO (6).....	51
4.2.1 Sintesi di sodio 4-(but-2-in-1-ilossi) benzensolfonato (5)	51
4.2.2 Sintesi di 4-(pent-3-in-1-il) benzensolfonil cloruro (6).....	52
4.3. SINTESI DELL'ACIDO (R)-2-((4-(BUT-2-IN-1-ILOSSI) FENIL) SOLFONAMIDO)-4-FENILBUTANOICO (7) (SCHEMA 1).	52
4.3.2 Sintesi dell'acido idrossammico (R)-2-((4-(but-2-in-1-ilossi) fenil) solfonamido)-4-fenilbutanoico (2) (Schema 1).	53
4.4. SINTESI DELL'ACIDO (R)-2-((4-(BUT-2-IN-1-ILOSSI)FENIL)SOLFONAMIDO)-5-FENILPENTANOICO (8) (SCHEMA 1).....	54
4.4.1 Sintesi dell'acido idrossammico (R)-2-((4-(but-2-in-1-ilossi)fenil)solfonamido)-5-fenilpentanoico (3) (Schema 1).	54
4.5. SINTESI DELL'ACIDO (R)-3-(4-(BENZILOSSI)FENIL)-2-((4-(BUT-2-IN-1-ILOSSI)FENIL)SOLFONAMIDE)PROPANOICO (11) (SCHEMA 2).....	55
4.5.1 Sintesi dell'acido idrossammico (R)-3-(4-(benzilossi)fenil)-2-((4-(but-2-in-1-ilossi)fenil)sulfonamide)propanoico (4) (Schema 2).	56
4.6 OTTIMIZZAZIONE DELLA SINTESI DEL DERIVATO 15 TRAMITE REAZIONE DI ULLMANN (SCHEMA 3) IN ILS.....	58
4.6.1 SINTESI DEL DERIVATO 15 TRAMITE REAZIONE DI ULLMAN IN ILS CONDOTTA IN CONDIZIONI STANDARD.....	58
4.7 SINTESI DEL DERIVATO 15 TRAMITE REAZIONE DI ULLMAN IN ILS UTILIZZANDO TECNOLOGIA MW (R14-R16).	58
4.7 SINTESI DI ETIL 2-(2-((4-BROMOFENIL)TIO)FENIL)ACETATO 16A(SCHEMA 3).....	59

4.8 OTTIMIZZAZIONE DELLA SINTESI DEL DERIVATO 17A TRAMITE REAZIONE DI CROSS-COUPLING SUZUKI MUYARA (SCHEMA 3).....	60
4.8.1 Sintesi del derivato 17a tramite Suzuki cross coupling in ILs condotta in condizioni standard (R17-R18).....	60
4.8.2 Sintesi del derivato 17a tramite Suzuki cross coupling in ILs condotta tramite tecnologia MW (R18 e R20)	60
5 BIBLIOGRAFIA.....	62

Capitolo1: La matrice extracellulare (ECM)

La matrice extracellulare (ECM) costituisce la più complessa unità di organizzazione strutturale degli organismi viventi. È una struttura acellulare presente in tutti i tessuti, essenziale per la vita del nostro organismo in quanto coinvolta nella regolazione di diverse attività cellulari come la migrazione, la proliferazione e la differenziazione cellulare. La sua principale funzione è di provvedere al supporto strutturale dei tessuti, conferendogli integrità ed elasticità; inoltre riveste un importante ruolo nel garantire il mantenimento dell'omeostasi tissutale in quanto struttura dinamica in continuo rimodellamento. La matrice cellulare è costituita da una componente fibrillare (collagene, fibronectina, elastina, laminina) e una componente amorfa. La componente amorfa è formata da una fase acquosa al cui interno troviamo proteoglicani, glicoproteine, glicosamminoglicani e miscele di enzimi.¹

Un'adeguata degradazione della matrice extracellulare è importante in quanto coinvolta nello sviluppo, nella morfogenesi, nella riparazione e rimodellamento tissutale. Questi processi proteolitici avvengono ad opera di enzimi con attività proteasica, nello specifico endopeptidasi, suddivise in base al loro meccanismo catalitico e alla loro sensibilità verso gli inibitori in:

- cisteina proteasi
- serina proteasi
- aspartico proteasi
- metallo proteasi
- treonina proteasi

1.1 Metzincine: ADAMs e MMPs

All'interno della famiglia delle endopeptidasi di matrice, le metalloproteasi sono senza dubbio le più studiate. Molteplici studi hanno evidenziato come diversi tipi di metalloenzimi siano implicati sia in processi fisiologici, come la degradazione della ECM, sia in processi patologici. All'interno delle Metalloproteasi troviamo la super famiglia delle metzincine che comprende al suo interno serralisine, astacine, pappalisine, metalloproteasi di matrice (MMPs) e adamlisine (ADAMs e ADAMTSs) (vedi **Figura 1**).

In questo progetto di tesi ci focalizzeremo sullo studio di MMPs e ADAMs.

Le MMPs e le ADAMs sono coinvolte in molti processi fisiologici ed un'alterata espressione di queste proteasi comporta lo sviluppo e la progressione di diverse condizioni patologiche,

tramite la degradazione di differenti substrati sotto controllo di specifici inibitori tissutali delle metallo proteasi (TIMPs). Si è appurato che nelle neoplasie le MMPs giocano un ruolo cruciale nel processo metastatico e invasivo del cancro; mentre le ADAMs sono invece coinvolte nei processi di proliferazione e di progressione delle cellule tumorali, andando ad interferire sul metabolismo dei fattori di crescita e dei loro recettori. Sono inoltre coinvolte in patologie polmonari, del sistema cardiovascolare, digestivo, renale e del sistema nervoso centrale.² Per questo motivo le MMPs e le ADAMs sono considerate le famiglie di zinco-endopeptidasi tra le più importanti e, negli ultimi decenni, sono state oggetto di studio di numerose ricerche farmaceutiche e diagnostiche.

1.2 Le Metalloproteasi di matrice (MMPs)

Le metalloproteasi di matrice, note anche come matrixine, sono zinco endopeptidasi appartenenti alla superfamiglia delle metzincine. Vennero identificate per la prima volta nel 1962, come agenti responsabili della degradazione del collagene fibrillare nel processo di metamorfosi della coda del girino da Gross e Lapiere, e vennero per questo identificate con il nome di “collagenasi interstiziali”.

Dal 1962 ad oggi sono state scoperte più di venti MMP umane, espresse in molti organi e tessuti.³ Inizialmente, si riteneva che le metalloproteasi fossero unicamente coinvolte nella modulazione e regolazione del turnover della matrice extracellulare (ECM), tramite la degradazione delle sue proteine. Ad oggi si pensa che il ruolo delle MMPs non sia solo limitato alla degradazione dei componenti dell'ECM ma che questo sia strettamente legato allo sviluppo di diverse condizioni fisiologiche e patologiche. Infatti, in condizioni fisiologiche l'attività delle MMPs è regolata da inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMPs), quando questo controllo viene a mancare si possono sviluppare diverse patologie, come crescita tumorale, aneurismi, aterosclerosi, artrite, nefrite, fibrosi e ulcere tissutali.⁴ La maggior parte delle 26 MMPs presentano quattro domini principali, che sono a partire dall'estremità *N*-terminale: il peptide segnale, il prodominio autoinibitorio, il dominio catalitico e il dominio emopexinico (**Figura 1**).

Possono essere classificate in vari modi, ma la classificazione più comune si basa sulla specificità di substrato e sulla localizzazione cellulare di ciascuna MMPs. Possiamo quindi distinguere:

- **Collagenasi:** degradano il collagene interstiziale di tipo I, II, III a livello di un sito specifico situato a $\frac{3}{4}$ rispetto alla zona *N*-terminale. Appartengono a questo gruppo

MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18, delle quali solo le prime tre sono presenti nell'uomo. Il loro substrato chiave è il collagene fibrillare, ma ognuna di esse presenta una specificità per vari tipi di collagene. La Collagenasi-1 o Collagenasi interstiziale (MMP-1) idrolizza maggiormente il collagene di tipo III, la Collagenasi-2 o Collagenasi neutrofila (MMP-8) ha come substrato preferenziale il collagene di tipo I ed infine la Collagenasi-3 (MMP-13) ha un'elevata affinità per il collagene di tipo II.

- **Gelatinasi:** comprendono la Gelatinasi A (MMP-2) e la Gelatinasi B (MMP-9). Entrambe idrolizzano substrati come il collagene di tipo IV, presente nelle lamine basali, e il collagene di tipo V, VII, e X più altre proteine della matrice extracellulare (ECM) come la gelatina, la fibronectina e l'elastina. La MMP-2 degrada inoltre il collagene di tipo II e III. L'attività di questi enzimi prevede un primo legame del collagene all'enzima a cui segue una tripla attività elicastica che comporta l'esposizione dei legami che verranno successivamente idrolizzati. Questa capacità idrolitica è propria sia delle collagenasi che delle gelatinasi ma la differenza è rappresentata dall'ulteriore capacità delle gelatinasi di idrolizzare collagene denaturato.
- **Stromelisine:** le tre MMPs di questo gruppo, chiamate anche Proteoglicanasi sono Stromelisinasi-1 (MMP-3), Stromelisinasi-2 (MMP-10) e Stromelisinasi-3 (MMP-11). Non hanno attività elicastica ma degradano componenti della matrice come proteoglicani, proteine (come la laminina) e partecipano all'attivazione di altre MMPs. Al contrario delle Stromelisine 1 e 2 che sembrano funzionalmente e strutturalmente correlate, ad oggi esistono poche informazioni sulla Stromelisinasi 3 che si ritrova espressa nel tumore al seno e presenta un'azione serpinasica (inattiva) verso gli inibitori della serina proteasi.
- **Matrilisine:** come Matrilisinasi-1 (MMP-7) e Matrilisinasi-2 (MMP-26) sono caratterizzate dall'assenza del dominio emopexinico nella loro sequenza aminoacidica e presentano un'ampia specificità di substrato andando a degradare fibronectina, laminina, proteoglicani e le regioni non-elicoideali del collagene IV. In particolare la MMP-7 detta anche PUMP-1 è responsabile della processazione di diverse molecole di superficie come, ad esempio la pro- α -defensina e il pro-tumor necrosis factor α (pro-TNF α). La MMP-26, chiamata anche Endometasi (in quanto espressa nelle cellule dell'endometrio) agisce su substrati come elastina, fibrina e fibrinogeno.

- **MMPs di membrana (MT-MMPs):** sono 6 metalloproteinasi di cui quattro sono proteine transmembrana type I (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-24) e due (MMP-17 e MMP-25) sono proteine ancorate a residui glicosil-fosfatidil-inositolo (GPI). Esse oltre a digerire proteine della matrice extracellulare (ECM) come proteoglicani, gelatina e fibronectina, sono coinvolte nell'attivazione di pro-MMPs. Ad esempio la MMP-14 mostra un'attività collagenolitica sul collagene di tipo I, II e III ma è anche responsabile dell'attivazione della MMP-2 per idrolisi del pro-peptide. Alcuni studi inseriscono in questo gruppo anche la MMP-23 o CA-MMP (Cysteine Array MMP), definita anche type II membrane protein, in quanto ospita il dominio transmembrana nella parte *N*-terminale del propeptide. Quest'ultima si differenzia dalle altre perché presenta una cisteina libera nel sito catalitico e manca del dominio emopexinico.
- **Altre MMPs:** sono inserite in questo gruppo tutte le MMPs che non vengono classificate nelle precedenti categorie. La MMP-12, detta anche metalloelastasi dei macrofagi, è espressa prevalentemente negli alveoli polmonari. Questa matrixina è coinvolta nei processi di degradazione dell'elastina nella parete alveolare, può causare patologie come l'enfisema ed è essenziale per la migrazione dei macrofagi dove peraltro è sovraespressa. La MMP-19 chiamata anche RASI (Rheumatoid Arthritis Synovial Inflammation) che, come deducibile dal nome, la ritroviamo a livello plasmatico in pazienti affetti da artrite reumatoide. La MMP-20, detta anche Enamelisina, è stata ritrovata nello smalto dei denti e la MMP-21 di cui ad oggi si conosce ancora poco che presenta un'attività gelatinolitica. La MMP-27 espressa in particolare nei linfociti B e la MMP-28 (Epilisina) espressa in vari tessuti come quelli cartilaginei, responsabile di patologie come artrite o osteoartrite.

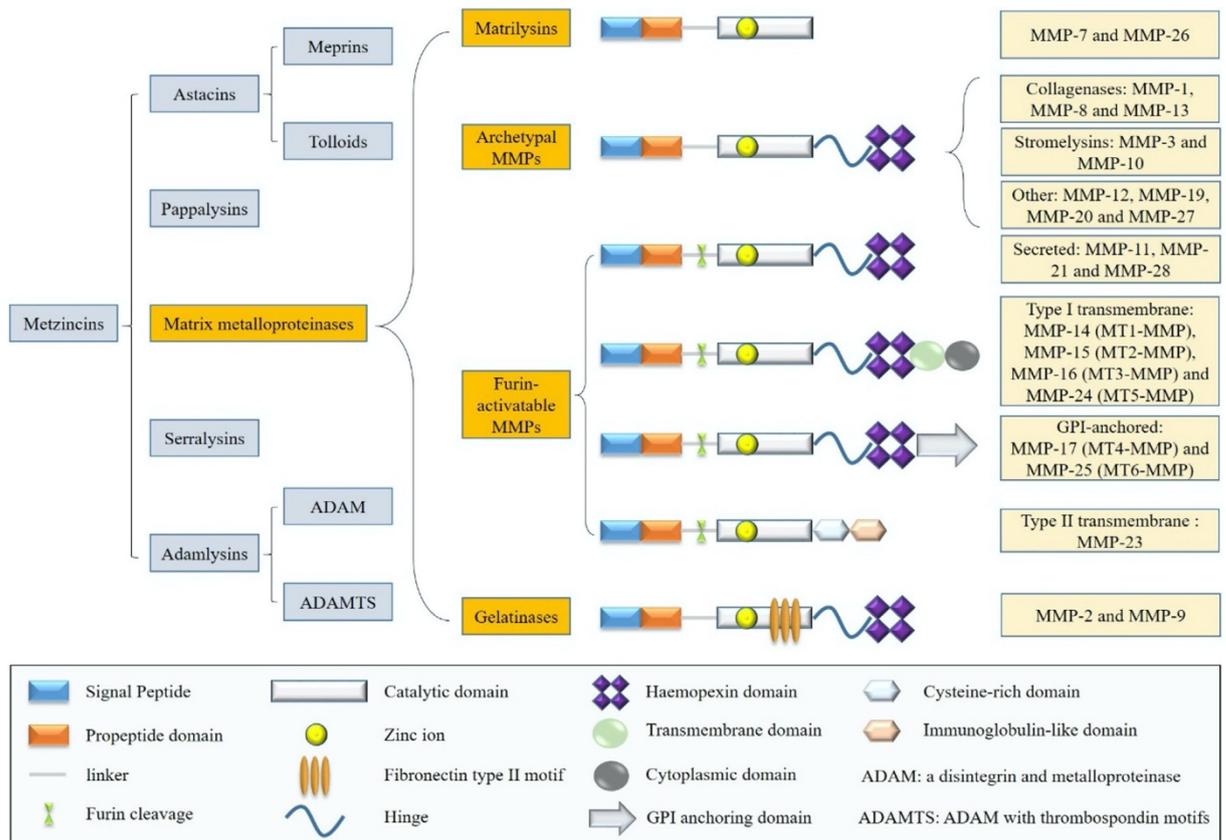


Figura 1. Classificazione strutturale delle MMPs in base alla disposizione dei loro domini⁵

1.2.1 Struttura delle MMPs

La maggior parte delle MMPs presenta quattro domini principali, che sono a partire dall'estremità *N*-terminale:

- **Peptide segnale:** costituito da circa 17-29 aminoacidi, svolge un ruolo essenziale nel trasporto della MMP primitiva verso il Reticolo Endoplasmatico (RE) e verso l'esterno della cellula. Viene rimosso durante la via secretoria.
- **Prodominio inibitorio:** è formato da circa 80 aminoacidi, nella struttura è presente un tiolo e un residuo di Cisteina apparentemente conservato, che va a coordinare lo ione zinco presente nel sito catalitico. Questa interazione è nota con il nome di "cysteine switch", va ad impedire l'attivazione della forma latente delle MMPs. Quando si ha la rimozione del pro-dominio, viene meno l'interazione tra lo Zinco e la cisteina con la sostituzione del tiolo da parte di una molecola d'acqua, rendendo così lo ione zinco più accessibile e la MMP funzionalmente attiva.⁶
- **Dominio catalitico:** formato da circa 170 aminoacidi, si trova nella porzione C-terminale, è caratterizzato da una struttura terziaria composta da 5 β foglietti e 3 α -

eliche e anse di connessione. In questo dominio è presente lo ione zinco coordinato con tre residui di istidina e una molecola d'acqua. Il legame di un substrato all'enzima, sposta la molecola d'acqua dallo ione zinco. L'idrolisi del legame peptidico viene quindi facilitata dal gruppo carbossilico di un residuo di glutammato presente nel sito attivo, che estrae un protone dall'acqua rimossa, e consente un attacco nucleofilo dell'acqua polarizzata sul carbonio carbonilico del legame peptidico.⁷ Lo ione zinco inoltre va a stabilizzare la carica negativa del carbossilato che si forma dalla rottura del legame ammidico, mentre la carica positiva sull'azoto amminico viene stabilizzata grazie all'interazione con un residuo conservato di alanina. Vi sono diversi sottositi, importanti per la diversa specificità su vari substrati, precisamente: S1, S2, S3, Sn, S1', S2', S3' e Sn'. In particolare, la tasca S1' viene detta "specificity pocket" ed è un elemento altamente discriminante per le varie MMPs, in quanto la sua ampiezza rappresenta un importante fattore per la specificità di substrato.⁸

- **Dominio emopexinico:** costituito da 200 aminoacidi circa, è generalmente situato nella porzione C-terminale, tranne nelle matrilisine e nella MMP-23, e media l'interazione con gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMPs), dotati di diversa specificità per le varie MMPs. E' costituito da quattro moduli disposti attorno ad un poro al cui interno si trova uno ione calcio e uno ione cloro. È collegato con il dominio catalitico tramite un peptide linker denominato "peptide hinge", non presente in tutte le MMPs.

1.2.2 Regolazione delle MMPs

I processi di distruzione e rigenerazione della matrice extracellulare sono in uno stato di continuo equilibrio e un'alterata regolazione dell'attività proteolitica delle MMPs può favorire l'insorgere di una vasta gamma di patologie. L'espressione della maggior parte delle MMPs viene regolata, dal punto di vista trascrizionale, da fattori di crescita, citochine infiammatorie e ormoni. L'attività enzimatica delle MMPs è invece controllata dall'attivazione dello zimogeno mediante scissione del pro-peptide oppure dall'inibizione dell'attività enzimatica mediante inibitori endogeni.

Gli inibitori tissutali delle metalloproteasi (TIMPs) sono enzimi polipeptidici endogeni costituiti da un dominio C-terminale di 125 residui amminoacidici ed un dominio N-terminale di minori dimensioni (65 residui amminoacidici). Strutturalmente questi enzimi endogeni presentano una conformazione a cuneo e si legano al sito attivo dell'enzima che vogliono inibire, occupandolo e impedendo il legame con i substrati con cui normalmente interagisce.

In condizioni fisiologiche, l'espressione dei TIMPs nei tessuti viene regolata per mantenere un equilibrio nel metabolismo della matrice extracellulare. I TIMPs vanno a legarsi alle MMPs con un rapporto di 1:1 e ne sono stati identificati 4 tipi: TIMP-1, -2, -3, -4. Uno squilibrio di questo controllo può provocare un turn-over incontrollato della matrice con conseguente sviluppo di patologie come artrite, cancro, nefriti, disordini neurologici e disagi cardiovascolari.

1.2.3 La metalloelastasi MMP-12

La MMP-12 fu descritta per la prima volta nel 1981 come una metalloelastasi murinica, e solo nel 1992 venne identificata come membro della famiglia delle MMPs. Viene prodotta dai macrofagi alveolari sotto forma di zimogeno inattivo di 54 kDa, per poi essere attivata o da proteasi seriniche o tramite un processo autocatalitico. In quanto metalloelastasi il suo principale substrato è l'elastina, ma risulta essere in grado di degradare altre molecole componenti la ECM, come fibronectina, laminina, collagene IV, solfato condroitinico, oltre ad altre proteine non appartenenti alla matrice extracellulare. È caratterizzata dalla presenza di un pro-dominio di circa 9 kDa contenente un residuo conservato di cisteina, in grado di coordinare lo zinco all'interno del dominio catalitico. La "specificity pocket" S1' nel dominio catalitico è larga e si estende sottoforma di canale attraverso la proteina, per questo motivo viene chiamata "deep S1' pocket".⁹

La MMP-12 oltre alla capacità elastolitica, promuove indirettamente la degradazione dell'elastina, andando sia ad inattivare il principale inibitore di HLE (elastasi leucocitaria umana) sia attraendo neutrofili verso il sito di infiammazione. L'efficacia di MMP-12 sulla degradazione delle proteine di membrana la rende fondamentale in diversi processi come la migrazione dei monociti e macrofagi verso le membrane.

Il prevalente coinvolgimento di MMP-12 si ha nella degradazione dell'elastina a livello della parete degli alveoli polmonari e ciò ne spiega il ruolo predominante nelle patologie polmonari. È stata infatti osservata, una sua sovraespressione, collegata a numerose patologie come ad esempio l'enfisema polmonare e la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)¹⁰ oltre che nel cancro al polmone.¹¹ L'importanza clinica di MMP-12 sta nel fatto che risulta essere collegata al rimodellamento e nella degradazione dei tessuti in alcuni processi infiammatori, come nella broncopneumopatia ostruttiva (BPCO), nell'enfisema, artrite reumatoide, e aterosclerosi.¹² Infatti, MMP-12 come MMP-2, MMP-9, sono in grado di stimolare la migrazione e la proliferazione delle cellule della muscolatura

liscia dei vasi VSMC (vascular smooth muscle cells), che giocano un importante ruolo in patologie vascolari come restenosi e aterosclerosi. L'induzione di più MMPs in VSMC ad opera di una combinazione di fattori di crescita e citochine infiammatorie, è stato identificato come il meccanismo chiave. Ci sono molti studi che riportano un incremento dell'espressione di diverse MMPs tra cui MMP-12 nella regione incline alla rottura nelle placche aterosclerotiche. Le cellule infiammatorie presenti all'interno delle lesioni aterosclerotiche possono rilasciare fattori di crescita e citochine, che possono stimolare la sintesi e la secrezione di MMPs dalle VSMCs. Per quanto riguarda la MMP-12, è stato visto come una sua sovraespressione in conigli ipercolesterolemici, induca una più estesa aterosclerosi con prominente infiltrazione dei macrofagi. Infatti, nelle placche umane, l'mRNA dell'MMP-12 e le proteine vengono rilevati esclusivamente dai macrofagi saturati di lipidi. Queste scoperte suggeriscono quindi che la MMP-12 possa essere un ottimo target per la prevenzione della progressione e l'instabilità delle placche aterosclerotiche.¹³

1.2.4 Inibitori delle MMP-12

Grazie ad una sempre più dettagliata descrizione del sito catalitico e dei vari sotto siti di legame, sono stati sintetizzati numerosi inibitori sintetici delle MMPs nell'arco degli ultimi trent'anni. Tramite l'utilizzo di metodi cristallografici ai raggi X si è arrivati alla determinazione delle strutture tridimensionali di molte MMPs che hanno reso la progettazione di inibitori di MMPs sempre più efficace. Infatti sono stati utilizzati tre diversi possibili approcci nello sviluppo di nuove molecole. Il primo approccio si basa sull'utilizzo di uno zinc-binding group (ZBG), che consiste nell'inserire all'interno della molecola un gruppo funzionale che abbia a disposizione un doppietto elettronico in grado di coordinare lo ione zinco presente nel sito catalitico, l'inibitore in questo modo si lega al sito catalitico dell'enzima impedendo l'interazione con il ligando endogeno. Tra i principali ZBGs vi sono composti come i tioli, i carbossilati, acidi fosfonici e gli acidi idrossammici che risultano essere i chelanti più efficaci. La seconda strategia si basa sull'utilizzo di gruppi alternativi denominati non-ZBG; questo tipo di approccio esclude l'interazione con lo ione zinco catalitico. La maggior parte di questi composti è costituita da lunghe molecole legate a strutture cicliche aromatiche o planari, che presentano dei gruppi funzionali in grado di instaurare dei legami idrogeno con il sottosito S1'.

L'ultimo approccio utilizzato si basa sull'utilizzo di strutture in grado di legare covalentemente l'enzima, portando ad una modificazione strutturale dell'enzima stesso

provocando un'inibizione di tipo irreversibile. Questo tipo di interazione si ha grazie alla presenza di un gruppo funzionale in grado di formare un legame covalente con un residuo amminoacidico dell'enzima.¹⁴

Malgrado l'alta omologia all'interno della famiglia delle MMPs sia stata d'ostacolo nello sviluppo di inibitori specifici per i vari enzimi, negli ultimi anni sono stati individuati inibitori selettivi di MMP-12, testati in diversi studi clinici e preclinici. Uno studio di Devel et al. riporta uno dei primi inibitori selettivi di MMP-12: **RXP470 (Figura 2)**. Questo derivato è un peptide fosfinico in grado di ridurre significativamente l'area della sezione trasversale della placca aterosclerotica nei vasi in topi portanti il gene dell'apolipoproteina E.¹⁵ L'inibizione di MMP-12 ha dato una placca più fibrosa e meno complessa con una ridotta invasione di monociti e macrofagi. La selettività di questo inibitore nei confronti di MMP-12 è data dalla presenza della lunga catena laterale arilica in posizione P1 e i due glutammati in P2 e P3. Tenendo conto di queste caratteristiche, lo stesso gruppo di ricerca ha poi sintetizzato due analoghi (**A e B Figura 2**)¹⁶ con un gruppo idrossammato e un gruppo carbossilato in sostituzione al gruppo fosfinico. I due composti hanno dimostrato una buona attività verso l'enzima bersaglio ma una ridotta selettività.

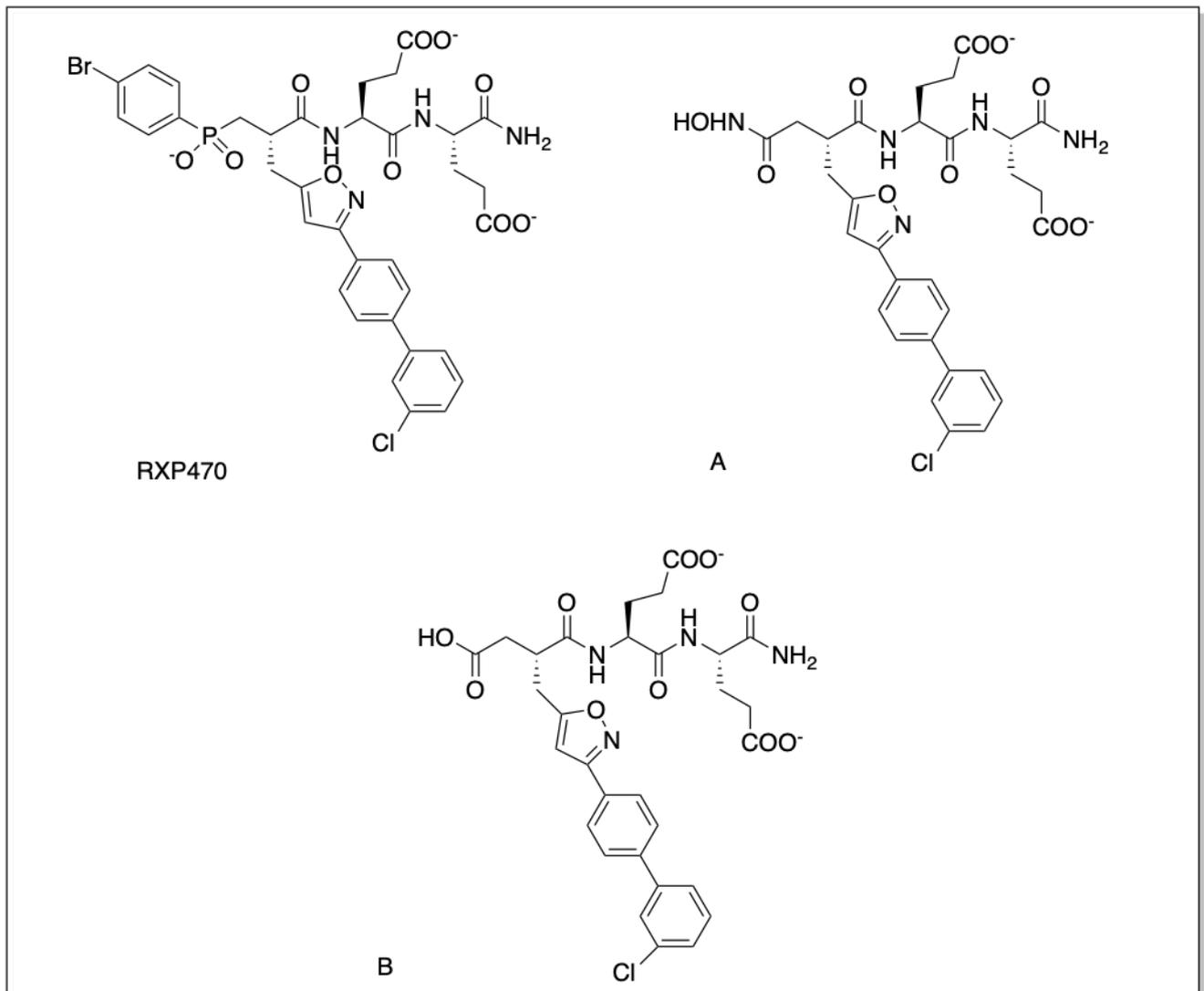


Figura 2. Inibitori selettivi di MMP-12.

1.3 ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinases)

Le ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinases) costituiscono una sottofamiglia delle metzincine, insieme alle ADAMTSs (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) e alle SVMP (Snake Venom Metalloprotease); sono delle proteine di circa 750 amminoacidi, la maggior parte delle quali sono glicoproteine di membrana di tipo I. Sono coinvolte in diversi processi biologici come l'adesione cellulare, fusione, proteolisi, proliferazione, migrazione cellulare e signaling. Sono coinvolte anche nel processo proteolitico, noto come "ectodomain shedding" che consiste nell'idrolisi del dominio extracellulare di proteine transmembranal. Questo processo è oggetto di vari studi e riguarda principalmente proteine transmembrana di tipo I e II, molecole di adesione cellulare chemochine, fattori di crescita e citochine. Un'alterata espressione di questi enzimi risulta essere correlata con la comparsa di diverse patologie come artrite, asma, patologie cardiovascolari, morbo di Alzheimer e cancro.¹⁷ Finora sono stati trovati 40 membri della sottofamiglia delle ADAMs nel genoma dei mammiferi, 22 di questi sono presenti nel genoma umano. Dei 22 geni di ADAMs trovati nel genoma umano, solo 12 vanno a codificare proteine che presentano nel dominio metalloproteasico la sequenza consenso HEXXH, responsabile dell'attività proteolitica (ADAM 8,9,10,12,15,17,19,20,21,28,30,33).¹⁸

1.3.1 Sintesi e struttura

Le ADAMs vengono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico rugoso (ER) e maturano all'interno di vescicole nell'apparato del Golgi. Vengono prodotte sotto forma di zimogeni inattivi, attivati tramite la rimozione del pro-dominio, per poi traslocare a livello della membrana cellulare dove vanno a svolgere la loro azione. Il processo di attivazione può avvenire in maniera differente a seconda della proteasi coinvolta. Può infatti avvenire grazie all'azione di particolari enzimi, ad esempio una convertasi, come la furina, per ADAM10 e ADAM17, o tramite autocatalisi, come ad esempio avviene per ADAM8 e ADAM28.^{19 20}

La struttura delle ADAMs è costituita da più domini principali: un pro-dominio, un dominio metalloproteasico, un dominio disintegrinico, un dominio ricco in cisteina ed EGF-simile, una regione transmembrana ed una coda citoplasmatica.²¹ Tutti i membri della famiglia delle ADAMs inoltre possiedono una sequenza segnale, nella porzione *N*-terminale, che li orienta verso una via secretoria responsabile del loro trasporto nell'apparato di Golgi, dove poi vengono attivati.

Nel dettaglio:

- Il **pro-dominio** si trova a livello dell'estremità *N*-terminale, e funge da "chaperone" intramolecolare, va a facilitare il corretto ripiegamento della proteina mantenendo la proteasi in uno stato inattivo.
Lo stato inattivo è dovuto all'interazione tra un singolo residuo cisteinico presente nel pro-dominio, e l'atomo di zinco presente invece nel sito catalitico. Questo legame viene rotto ad opera delle convertasi, tramite un meccanismo noto come "cysteine switch" in cui il pro-dominio viene rimosso e il sito catalitico torna così libero con il ripristino dell'attività catalitica della proteina.
- Il **dominio metalloproteasico** è il sito attivo dell'enzima; presenta una struttura globulare formata da foglietti- β a 5 filamenti e avvolti da 5 α -eliche. Sono presenti atomi di zinco e molecole d'acqua, necessari per il processo idrolitico dei substrati proteici che sono coordinati da un residuo di metionina e tre residui istidinici. In prossimità del dominio si trova il sito conservato HExxHxxGxxH, questo sito è importante perché implicato nel processo di legame dello zinco. Studi cristallografici hanno dimostrato come il dominio metalloproteasico presenti una forma ellisoidale²², e in realtà risulti essere costituito da due sottodomini distinti separati da una fenditura, il sito attivo. All'interno del sito attivo è situato lo zinco catalitico. Questa fenditura è simile a quella presente nelle MMP, ma presenta caratteristiche specifiche per ciascun membro della famiglia.
- Il **dominio disintegrinico** presente anche nelle "snake-venom metalloproteases" (SVMPs). È costituito da circa 90 amminoacidi, di questi 14 vanno a formare un loop che mima il sito di legame delle proteine della matrice (come la fibrinonectina), per i recettori integrinici delle piastrine.
- Il **dominio cisteino-ricco** è responsabile della regolazione dell'interazione tra le integrine e il dominio disintegrinico e partecipa alla captazione dei substrati specifici.
- Il **dominio EGF-simile** ha una lunghezza di circa 30-40 amminoacidi, in questo segmento è presente una sequenza conservata costituita da sei residui di cisteina, in grado di formare tra loro tre legami disolfuro, implicati nella formazione dei legami con gli O-glicani. Questo dominio non è presente in tutte le ADAMs, è mancante nelle isoforme di ADAM10 e 17.
- Il **segmento idrofobico transmembranale** sembra svolgere una funzione di ancoraggio tra le ADAMs e la membrana cellulare.

- La **coda citoplasmatica** presente solo nelle ADAMs transmembrana, è un segmento molto variabile sia rispetto alla sua lunghezza, sia nella sequenza. Sembra svolgere un importante ruolo nella regolazione della funzione proteasica e un ruolo chiave nell'accoppiamento di alcune ADAMs a specifici segnali.

Si evince che vi è un elevato grado di omologia strutturale tra i membri della famiglia delle ADAMs e MMPs, in particolare la sequenza segnale, il pro-dominio e il sito catalitico contenente lo Zn^{2+} (**Figura 3**). Questo rappresenta uno dei maggiori problemi nel sintetizzare nuovi inibitori che presentino un'alta selettività rispetto all'enzima di interesse.

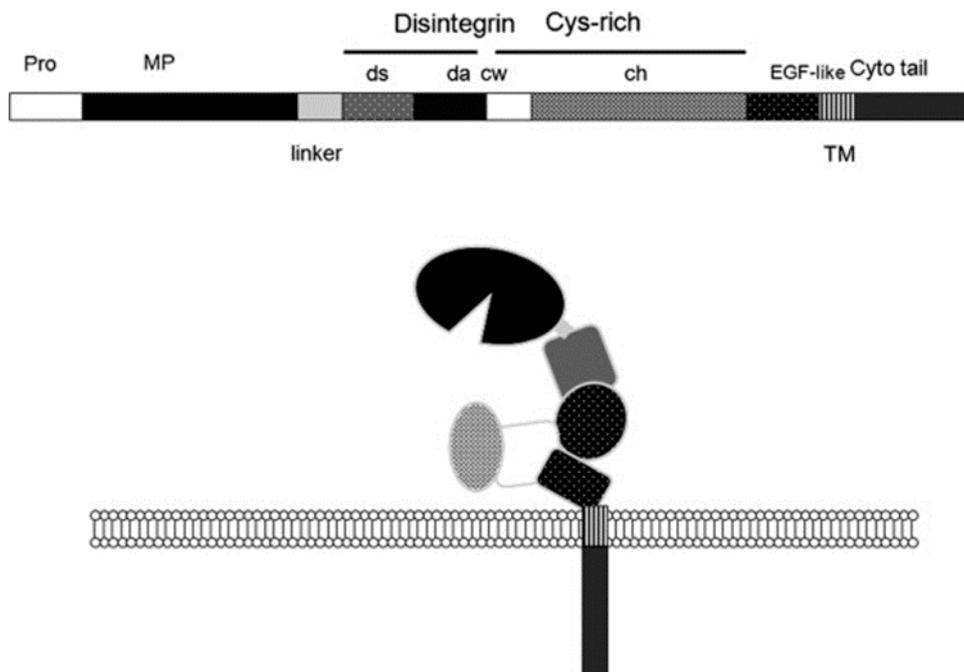


Figura 3. Rappresentazione schematica della struttura tipica delle ADAMs.

1.3.2 Funzioni fisiologiche delle ADAMs

La famiglia delle ADAMs è coinvolta in diversi processi biologici rilevanti come la proteolisi e l'adesione cellulare. I substrati sono principalmente proteine transmembrana integrali, come i precursori dei fattori di crescita, molecole di adesione e citochine.²³ Queste molecole vengono tagliate tramite un meccanismo noto come "ectodomain shedding"; le forme solubili di questi fattori di crescita e delle citochine vanno ad interagire con i propri recettori, promuovendo un signaling sia autocrino che paracrino. Inoltre l'attività proteolitica delle ADAMs può determinare l'attivazione di una via proteolitica intramembrana (RIP), una cascata proteolitica sequenziale. La via RIP vede prima la scissione dell'ectodominio sulla proteina transmembrana, e successivamente un'ulteriore scissione che determina il rilascio

del dominio intracellulare o del frammento transmembrana. Questi una volta rilasciati traslocano nel nucleo e influenzano la trascrizione genica.²⁴

I principali processi regolati dall'attività proteolitica delle ADAMs sono:

- **Migrazione e adesione cellulare:** grazie ai loro domini disintegrinico e cisteino-ricco, le ADAMs possono interagire con integrine, sindecani, glicoproteine implicate nel collegamento tra citoscheletro e matrice extracellulare; inoltre sono responsabili della solubilizzazione di diverse molecole come L-selectina, L1-CAM, CD44, v-CAM, E-caderina ed N-caderina-39 con importanti funzioni nei processi di adesione cellulare.
- **Regolazione degli ErbB:** il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) si lega con una proteina, chiamata fattore di crescita trasformante α (TGF α); il legame con queste molecole porta all'attivazione del recettore, che omodimerizza con un altro recettore EGFR o eterodimerizza con altre proteine facenti parte della famiglia dei recettori tirosin chinasi ErbB. ADAM17 e ADAM10 sono le proteasi maggiormente implicate in questa regolazione; una sovraespressione di quest'ultime può portare ad un'alterazione del signaling degli ErbB con conseguente squilibrio nella proliferazione e nella morte cellulare.
- **Regolazione del "NOTCH signaling":** il NOTCH signaling è una via altamente conservata che ricopre un ruolo cruciale nella regolazione della proliferazione cellulare, differenziazione e morte cellulare. Nei mammiferi sono stati identificati quattro recettori NOTCH e cinque corrispondenti ligandi (JAG1, JAG2, DLL1, DLL3, DLL4). L'attivazione di questi recettori, data tramite l'interazione con i propri ligandi, porta ad un cambio conformazionale del recettore stesso. Il recettore attivato viene poi idrolizzato in corrispondenza del sito S2 di NOTCH, da parte delle ADAM10 e ADAM17, tramite il meccanismo di ectodomain shedding, questo porta al rilascio del dominio intracellulare che trasloca all'interno del nucleo attivando la trascrizione degli inibitori della differenziazione cellulare.²⁵

1.3.3 ADAM8

ADAM8 venne descritta per la prima volta nel 1990 da Yoshida e collaboratori come MS2 (membrane-spanning 2) perché espressa sui macrofagi murinici.²⁶ Nota anche come CD156a (Cluster Differentiation antigen 156a) ADAM8 è una proteina transmembrana costituita da 856 aminoacidi e presenta la tipica struttura multidominio delle ADAM. Viene sintetizzata sotto forma di zimogeno inattivo (120kDa circa), ma essendo

sprovvista di un sito di riconoscimento per la scissione ad opera delle furine, la sua attivazione avviene tramite un meccanismo autocatalitico. L'attivazione, che ha luogo nel compartimento trans-Golgi, produce un enzima maturo (90 kDa circa) che trasloca sulla superficie cellulare. Un'ulteriore elaborazione da parte di diversi enzimi porta al rilascio di un dominio solubile MP nel compartimento extra cellulare e alla formazione di una forma residua dell'enzima (circa 60 kDa) nella membrana. In questa forma residua dell'enzima vi sono tutti i domini che caratterizzano la famiglia delle ADAMs: il dominio disintegrinico, il dominio cisteino-ricco, il dominio EGF-simile, il dominio transmembrana e la coda citoplasmatica che risulta coinvolta nella mediazione dell'adesione cellulare tramite interazione con le integrine.²⁷ Il dominio MP solubile è promotore della scissione delle proteine dell'ECM, inoltre a differenza di altre ADAMs e MMPs, ADAM8 non viene inibita dai TIMPs.²⁸

ADAM8 risulta espressa in maniera fisiologica negli adulti a bassi livelli in polmoni, ovaie, nel sistema linfatico, nel cervello e nel midollo osseo. È stata identificata anche nell'epitelio delle vie respiratorie, in monociti, basofili ed eosinofili, leucociti, osteoclasti e neuroni. Un'importante espressione di ADAM8 si ha durante lo sviluppo embrionale, anche se non sembra implicata nell'embriogenesi e nell'omeostasi.²⁹ Un'iperespressione della ADAM8 risulta invece essere implicata in diverse condizioni patologiche; in conseguenza a stati infiammatori di polmoni, ossa, articolazioni e sistema nervoso centrale che portano a patologie come asma, artrite reumatoide e neurodegenerazione; e in diversi tumori, come cancro alla prostata, cancro al seno, adenocarcinoma polmonare, osteosarcoma, glioma e cancro al pancreas.²²

Studi in vitro hanno dimostrato come ADAM8 sia in grado di interagire con diversi substrati, ed una sua iperespressione sia implicata in diverse patologie, in particolare patologie infiammatorie e neoplastiche.

Infatti, tramite la perdita del prodominio e la sua autocatalisi ADAM8 porta alla liberazione di molteplici proteine, tra cui: il recettore di TNF1, TNF α , TGF α , α -Selectina e la glicoproteina ligando 1 della P-selectina (PSGL-1), il recettore a bassa affinità per le IgE CD23; inoltre è implicato nel rilascio di differenti molecole di adesione cellulare come CHL-1, coinvolto nello sviluppo del sistema nervoso centrale. ADAM8 va a scindere vari substrati come il Tie-2, Flt-1, VE-caderina, Flk-1, EphB4, CD31, E-selectina e la Fibronectina implicate nelle patologie neoplastiche (**Tabella 1**).²²

Per quanto riguarda le patologie infiammatorie, un incremento di ADAM8 è stato riscontrato in pazienti affetti da asma moderato o grave, in particolar modo sull'epitelio

bronchiale e nelle cellule immunitarie (eosinofili, macrofagi, linfociti e monociti).³⁰ L'incremento di ADAM8 viene stimolato da molecole implicate nell'infiammazione come interferone, lipopolisaccaridi (LPS) e TNF α , questo suggerisce che ADAM8 svolga nell'infiammazione un ruolo regolatorio.

Avendo tra i suoi substrati diverse citochine e molecole implicate nell'adesione cellulare come CD23, L-Selectina sembra implicato anche nel reclutamento delle cellule immunitarie e nella risposta immunitaria nell'asma.

Come molte metzincine ADAM8 è coinvolta in vari processi maligni tra i quali cancro ai polmoni, tumori cerebrali, cancro alla prostata. Recenti studi hanno dimostrato come ADAM8 vada a promuovere la migrazione cellulare e di conseguenza l'invasività delle cellule tumorali, tramite l'attivazione di MMP e il signaling di ERK1/2. Inoltre ADAM8 incrementa la crescita tumorale tramite il rilascio di fattori angiogenici come EGF-A e promuove lo sviluppo di metastasi nel carcinoma mammario triplo negativo (TNBC).³¹ Svolge un ruolo anche nella resistenza alle terapie del cancro trattato con Temozolomide (TMZ) e con Cisplatino.^{32 33}

Substrato	Tipo	Funzione	Substrato	Tipo	Funzione
TNF	Recettore 1	Promozione dell'infiammazione	Tie-2	recettore	Promotore dell'angiogenesi
TNF- α	citochina	Promozione dell'infiammazione e	CXCL-1	chemochina	Regolazione risposta immunitaria
TGF- α	Fattore di crescita	Stimolo proliferazione cellulare	VE-caderina	Molecola di adesione	Promuove proliferazione cellulare
L-selectina	Molecola di adesione	Regolazione risposta immunitaria	E-selectina	Molecola di adesione	regolazione risposta infiammatoria
PSGL-1	recettore	Migrazione leucocitaria e adesione	APP	Proteina di membrana	Diminuzione della β -amiloide Effetto neuro protettivo
CD-23	recettore	Regolazione sintesi IgE	CD-31	Molecola di adesione cellulare	Migrazione cellulare
CHL-1	Molecola di adesione	Sviluppo neuronale			

Tabella 1. Principali substrati di ADAM8.

1.3.4 Inibitori di ADAM8

L'implicazione di ADAM8 in diverse patologie e il suo ruolo non essenziale in condizioni fisiologiche, lo rendono un ottimo target farmacologico. Il problema maggiore nello sviluppare un inibitore selettivo di ADAM8 è dato dall'alto livello di omologia nel sito catalitico tra i diversi membri delle ADAMs. Recentemente il dominio catalitico di ADAM8 umano è stato cristallizzato complessato con l'acido idrossammico Batimastat (BB94) (**Figura 4**). La soluzione della struttura cristallina ha descritto la presenza dello ione zinco (Zn^{2+}) e di un foglietto β centrale a cinque filamenti simile a quello presente in altri

membri della famiglia, invece ha evidenziato delle differenze a livello del sito di legame S1'.

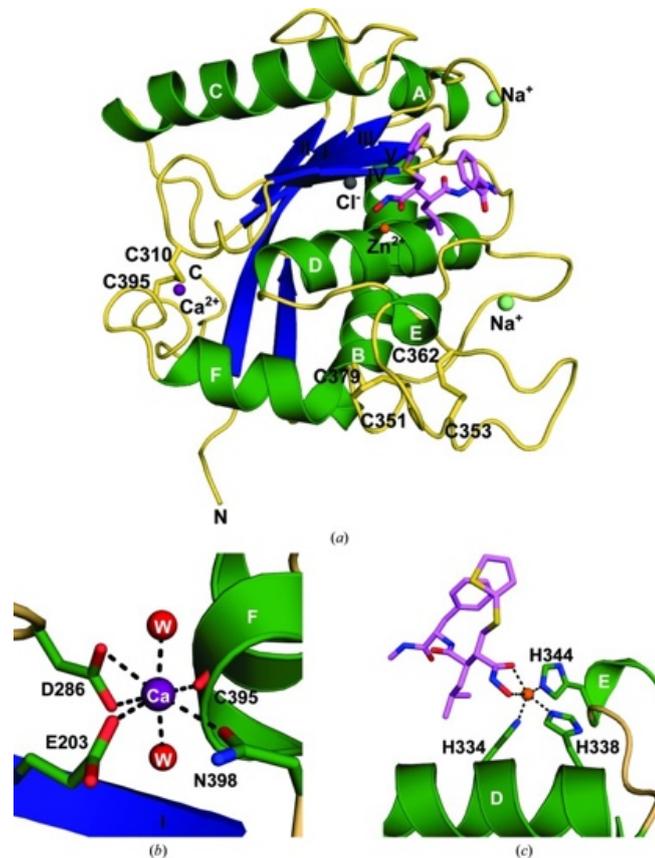


Figura 4. a) Struttura a nastro del complesso Batimastat e ADAM8. b) coordinazione con lo ione Ca^{2+} (in viola). c) Coordinazione con lo ione Zn^{2+} (arancio).³⁴

Un nuovo approccio per il “targeting” di ADAM8 si basa sul blocco del legame multimerico in modo da inibire l’attivazione di ADAM8. I domini coinvolti nella multimerizzazione sono il dominio cisteino-ricco e il dominio disintegrinico. Scholoman et al riporta una serie di peptidi ciclici contenenti 6 aminoacidi come inibitori selettivi di ADAM8, tra questi il più efficace è risultato essere il BK-1361 (o cyclo(RLsKDK)).³⁵ (**Figura 5**) Quest’ultimo è stato testato su cellule di adenocarcinoma duttale pancreatico andando a ridurre significativamente i tassi di migrazione, l’invasività, l’attività delle MMP extracellulare e l’attivazione della via ERK1/2. È stato testato anche *in vivo* su cellule tumorali di pancreas xenotrapiantate andando a ridurre la progressione del tumore e delle metastasi con assenza di effetti collaterali tossici. BK-1361 è stato testato anche come possibile agente terapeutico alternativo nella cura dell’asma, dando buoni risultati, con un’attenuazione dell’iperattività bronchiale (BHR) e dell’infiammazione bronchiale. ADAM8 risulta avere dei profili di substrato sovrapponibili

con quelli di ADAM10 e ADAM17, che a differenza di ADAM8 presentano un ruolo importante nell'omeostasi, per via di questa similarità sono stati testati diversi inibitori idrossammici di ADAM17 per valutarne il loro effetto su ADAM8.

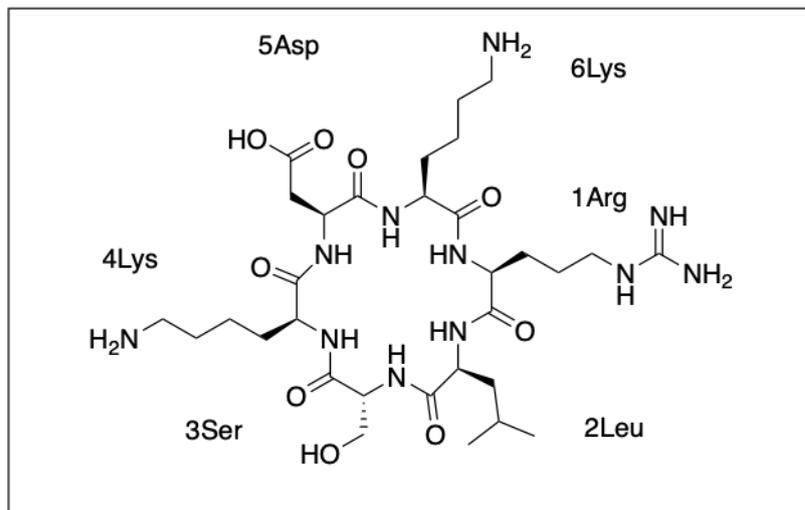


Figura 5. Struttura chimica dell'inibitore ADAM8 BK-1361

Da saggi di attività svolti utilizzando la proteina ricombinante (hA8Dis) è stata descritta un'efficace inibizione del rilascio di CD23 solubile da parte dei composti BB94 (Batimastat, IC_{50} : 15nM), GW208264 (IC_{50} : 7,5 nM) e dai derivati solfonamidici FC387 (IC_{50} : 45nM) e FC143 (IC_{50} : 20 nM) (**Figura 6**).^{36 37}

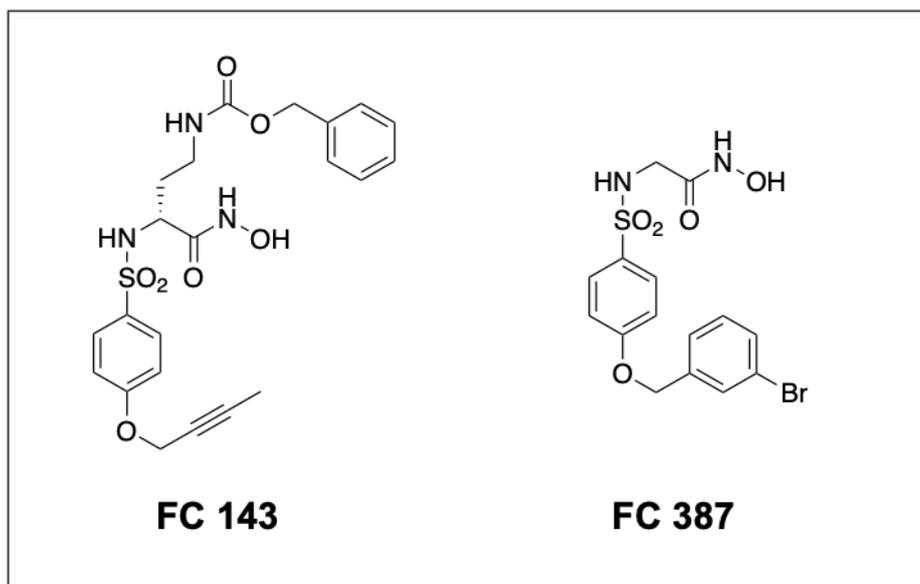


Figura 6. Struttura FC143 e struttura FC387

Le interazioni tra il sito di legame di ADAM17 e FC143 sono risultate: il gruppo idrossammato va a legare lo ione zinco, il gruppo butilossi va ad inserirsi nella cavità S1' dove va ad avere dei contatti idrofobici multipli con dei residui lipofili. Un ossigeno della solfonammide va a formare un legame idrogeno con l'azoto dei residui L348 e Gly349, mentre la porzione del benzilcarbammato si inserisce nella tasca S1 e forma un legame idrogeno con la catena laterale di T347. Quest'ultimo risulta essere un punto chiave per l'ancoraggio e favorisce le interazioni lipofile dell'anello benzenico con le catene laterali dei residui V314, F343 e M345. L'interazione tra ADAM8 e FC143 è stata valutata comparandola a l'interazione tra FC143 e ADAM17, infatti nella cavità S1' i residui L401, V402, V434 e A439 presenti in ADAM17 sono sostituiti con C330, T331, I363 e G369 in ADAM8, queste sostituzioni consentono comunque l'interazione della porzione butilossi della molecola poiché i residui presentano dimensioni simili. Nella regione che va ad interagire con il gruppo benzilcarbammato, il residuo di V314 è sostituito da P262 e M345 da G248, pertanto le interazioni lipofile del gruppo benzilico risultano conservate. Si è avuta perciò un'ulteriore conferma dell'attività di FC143 su ADAM8.³⁸

Capitolo 2: I liquidi ionici (ILs)

Ad oggi il concetto di chimica sostenibile è sempre più presente nell'industria chimica, la necessità di trovare nuovi criteri di gestione ambientale hanno portato allo sviluppo della "green chemistry". Questo nuovo approccio tecnologico scientifico applica principi innovativi nella progettazione di processi chimici industriali e ad oggi, costituisce uno strumento fondamentale per conseguire uno sviluppo industriale sostenibile, andando a prevenire e a ridurre sostanzialmente l'inquinamento e l'impatto ambientale dato dall'industria. Attualmente la maggior parte delle reazioni chimiche viene condotta in solventi organici o acquosi. La sintesi di nuove molecole richiede l'uso di grandi quantità di energia, di composti chimici, di catalizzatori, di solventi e di vari step di purificazione dei prodotti, questo porta al rilascio di numerose quantità di sostanze chimiche, spesso volatili e sufficientemente solubili in acqua da contaminare l'ambiente.

Per la sintesi di determinate molecole sono necessari dei processi multistadio che impiegano reagenti in quantità stechiometriche, spesso questi agenti sono tossici e/o nocivi, con la formazione anche di ingenti volumi di rifiuti come solventi o sottoprodotti di reazione, che a loro volta richiedono complessi trattamenti di purificazione ed elevati costi di smaltimento. La chimica si prefigge quindi come obiettivo la preparazione di questi intermedi sintetici, di materie prime, di principi attivi ed enzimi per le diverse industrie, tra le quali l'industria farmaceutica.

I liquidi ionici, grazie alle loro diverse proprietà chimico fisiche vengono presi in considerazione come solventi eco compatibili. Vi sono diversi prerequisiti che determinano la scelta di un solvente: deve essere commercialmente disponibile, con un prezzo accettabile, di una qualità garantita e la sua tossicità deve essere ben documentata. La modifica di un processo quindi andrà a richiedere una nuova procedura di approvazione, che va ad implicare dei tempi e dei costi elevati, pertanto spesso vengono prese in considerazione solo le nuove metodiche i cui procedimenti vanno a determinare delle modifiche minime e questo è particolarmente vero nell'ambito farmaceutico. Tuttavia numerosi dati di letteratura evidenziano la possibilità di condurre la maggior parte delle reazioni anche in presenza di liquidi ionici e di poter recuperare il prodotto di sintesi, e cosa molto importante di poter riciclare il solvente e/o il catalizzatore con una conseguente diminuzione dell'impatto ambientale e dei costi. Inoltre, l'elevato numero di liquidi ionici e la possibile modulazione delle loro proprietà chimico-fisiche attraverso un'appropriata modificazione strutturale, specifica per la reazione da condurre costituisce un innegabile vantaggio.³⁹

2.1 Struttura e proprietà dei liquidi ionici

I liquidi ionici (ILs) sono dei sali organici a basso punto di fusione, solitamente inferiore ai 100 °C. In generale il liquido ionico è un composto chimico costituito esclusivamente da ioni, con una notevole varietà e combinazioni di cationi e anioni.⁴⁰ La combinazione di un'ampia varietà di cationi e anioni porta teoricamente ad un grandissimo numero di liquidi ionici, tuttavia il numero reale è molto inferiore a causa dell'incompatibilità chimica di questi.

Ad oggi, sono stati descritti circa 1000/2000 liquidi ionici e approssimativamente sono circa 300 quelli commercialmente disponibili.⁴¹ Negli ultimi 10 anni le ricerche sui liquidi ionici si sono focalizzate sulle loro specifiche proprietà chimico-fisiche e sono stati determinati importanti parametri come: transizione di fase, viscosità, conducibilità, densità e le correlazioni tra queste e la struttura molecolare. Una notevole importanza hanno avuto gli studi il cui scopo è stato la comprensione di come le proprietà chimico fisiche vadano a influenzare, a livello molecolare, l'andamento delle reazioni condotte in questi mezzi, e cercare di utilizzare queste informazioni per poter sintetizzare dei liquidi ionici ad hoc in grado di influenzare positivamente la reattività e la selettività dei processi. Il primo liquido ionico risale al 1914 anche se l'interesse verso questi composti è emerso solo verso la fine del 20° secolo. Negli anni '90 Wilkes e collaboratori misero a punto la sintesi di una serie di liquidi ionici con cationi a base di imidazolio e anioni come BF_4^- e PF_6^- .⁴² La particolarità di questi liquidi ionici era data dal fatto che erano stabili all'aria e potevano essere utilizzati in un ambiente non controllato. Da questa scoperta nasceva la chimica moderna dei liquidi ionici e a partire dal 2000 i liquidi ionici sono divenuti oggetto di un notevole interesse.

2.2 Struttura dei liquidi ionici

I liquidi ionici hanno un'ampissima variabilità strutturale, determinata dalla natura del catione opportunamente sostituito e dall'anione. Tra i cationi quelli maggiormente utilizzati sono: il catione Pirrolidinio, Imidazolio, Piridinio, Fosfonio e Ammonio; tra gli anioni invece si usano maggiormente BF_4^- , PF_6^- , NO_3^- , AlCl_4^- , CH_3SO_3^- e CF_3SO_3^- (**Figura 7**). Le basse temperature di fusione dei liquidi ionici sono legate alle dimensioni ed alla simmetria degli ioni:

- le dimensioni: a parità di carica, più grandi sono le dimensioni dell'anione e del catione minore sarà la temperatura di fusione;
- la simmetria: meno simmetrica è la struttura degli ioni minore sarà la loro possibilità di organizzarsi in un reticolo cristallino.

I liquidi ionici presentano energia reticolare piuttosto bassa che va a determinare una bassa temperatura di fusione. Vale quindi la regola generale che a parità di anione, maggiori sono le dimensioni e la simmetria del catione, minore sarà la temperatura di fusione del composto. Selezionando opportunamente anioni e cationi, tramite funzionalizzazione della catena alchilica normalmente presente sul catione, vengono preparati liquidi ionici di natura acida, basica, neutra, coordinati, polimerizzabili.

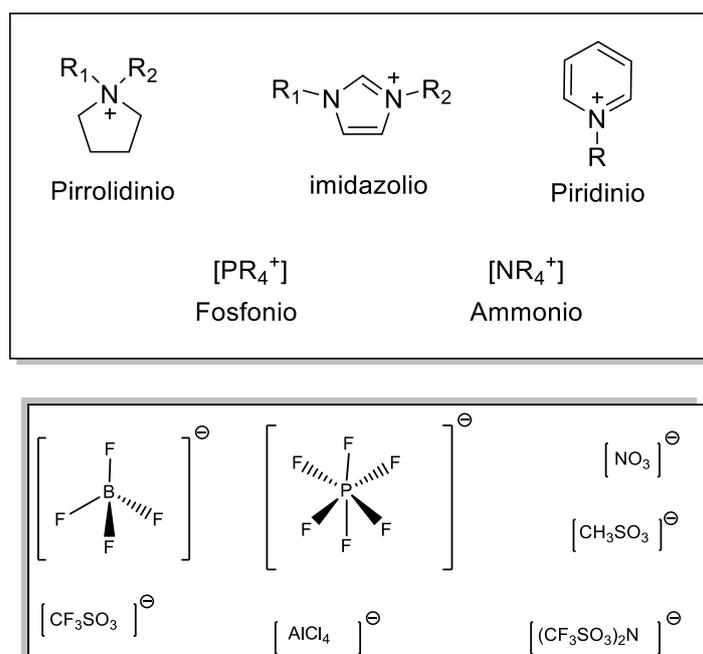


Figura 7. Strutture dei cationi e anioni.

2.3 Proprietà chimico-fisiche

I liquidi ionici hanno proprietà chimico-fisiche notevolmente diverse che li rendono dei composti versatili per una vasta gamma di impieghi. Alcune proprietà come ad esempio la quasi inesistente tensione di vapore e l'elevata stabilità termica sono comuni a tutti i liquidi ionici, altre caratteristiche invece dipendono fortemente dalla struttura. La bassa volatilità è la proprietà primaria che evita la loro dispersione nell'ambiente aereo ed è uno dei motivi per cui i liquidi sono considerati dei solventi *green*.

- **Punto di fusione:** Il punto di fusione dei liquidi ionici dipende principalmente dalla facilità di impacchettamento ione-ione nel reticolo cristallino; questo rappresenta il limite minimo di intervallo liquido e, insieme alla stabilità termica, definiscono l'intervallo di temperature entro il quale è possibile utilizzare il liquido ionico come solvente. I punti di fusione di molti liquidi ionici sono però incerti e questo è dovuto

alla tendenza di alcuni ILs a dare delle transazioni vetrose che nel raffreddamento provocano la formazione di solidi amorfi. Analizzando comunque una serie di liquidi ionici a varia struttura cationica è stato possibile stabilire che: il punto di fusione diminuisce all'aumentare delle dimensioni e della simmetria del catione, mentre un aumento della ramificazione della catena alchilica lo va ad incrementare. L'effetto invece dato dalla natura dell'anione è meno facilmente razionalizzabile infatti nei liquidi ionici imidazolici con anioni simili come triflati (TfO^-) e bistrifluorosulfonilimmidi (Tf_2N^-) il basso punto di fusione di quest'ultimo è attribuibile alla delocalizzazione elettronica e alla conseguente impossibilità di questo anione di dare dei legami idrogeno con i protoni del catione in particolare a quello del C_2 .⁴³

La lunghezza invece della catena alchilica presente sul catione imidazolio va ad influenzare la temperatura di fusione dei liquidi ionici. Si è visto infatti che l'aumento del numero dei carboni sulla catena laterale fino ad un massimo di 7, diminuisce la temperatura di fusione, a causa della ridotta simmetria del catione, mentre un incremento della catena quindi sopra i 7 carboni porta ad un aumento della temperatura di fusione a causa invece delle forze di Van der Waals che diventano preponderanti rispetto alla simmetria.

- **Stabilità termica:** I liquidi ionici hanno un'elevata stabilità termica e le loro temperature di decomposizione riportate in letteratura superano in alcuni casi i 400 °C. L'insorgenza della decomposizione termica a parità di catione dipende dall'idrofilia dell'anione. Le temperature di decomposizione possono risultare inferiori a quanto riportato in letteratura se il liquido ionico viene mantenuto a temperature elevate per periodi di tempo prolungati (circa 10 ore). La diminuzione invece della stabilità termica di solito avviene attraverso la de-alchilazione degli anioni o tramite decomposizione del catione che generalmente subisce delle migrazioni di alchili ed eliminazioni.
- **Viscosità** L'elevata viscosità dei liquidi ionici può influenzare negativamente l'andamento di molte reazioni organiche. Questa è normalmente più elevata di quella dell'acqua, è simile a quella degli oli ma diminuisce fortemente con l'aumentare della temperatura. La viscosità dei liquidi ionici viene influenzata dalla presenza di eventuali impurezze, come la presenza di acqua, mentre la presenza di cloruri o eventuali residui organici derivanti dalle reazioni di metatesi hanno un effetto

opposto. L'aumento della viscosità è stato attribuito all'incremento delle forze di Van der Waals e si è visto che a parità di anione aumenta all'aumentare del numero di atomi di carbonio del gruppo alchilico presente sul catione imidazolio. La ramificazione della catena alchilica in uno stesso tipo di sale va a ridurre la viscosità.

- **Densità:** La densità è una proprietà dei liquidi ionici più frequentemente riportata, questo perché ogni nuova loro applicazione necessita della conoscenza della densità. In generale sono più densi dell'acqua, i valori variano infatti solitamente da 1 a 1,6 g/cm³ e questa proprietà fisica risulta meno dipendente dalla variazione di temperatura. Questo perché l'impaccamento è migliore quando il catione e l'anione hanno dimensioni simili, la massa molare dell'anione influenza quindi in maniera significativa la densità complessiva dell'intero liquido ionico.
- **Miscibilità con l'acqua:** Il comportamento idrofilo o idrofobo dei liquidi ionici diventa importante quando si va a considerare sia le proprietà di solvatazione, quindi la loro capacità di solubilizzare reagenti necessari per poter effettuare una specifica reazione, che il recupero dei prodotti mediante estrazione con solvente. Il contenuto di acqua nel liquido ionico può influenzare la selettività della reazione. La solubilità in acqua dei liquidi ionici dipende principalmente dalla natura dell'anione, dalla temperatura e dalla lunghezza della catena alchilica sul catione. Indipendentemente dalla loro solubilità, tutti i liquidi ionici sono igroscopici e vanno ad assorbire acqua dall'atmosfera: studi di spettroscopia IR indicano che l'acqua assorbita dal liquido ionico è presente sia come acqua libera che legata ad almeno due anioni mediante un legame idrogeno, la cui forza determina l'idrofilia del liquido ionico stesso.
- **Polarità:** Per poter interagire con i soluti un liquido deve possedere delle caratteristiche specifiche. Nel caso dei solventi molecolari questa proprietà è definita come polarità del solvente e viene espressa tramite la costante dielettrica. Le costanti dielettriche però non possono essere utilizzate nella caratterizzazione della polarità dei liquidi ionici. Per i solventi molecolari si è cercato di creare delle scale empiriche basandosi sull'effetto del solvente nei processi solvente-dipendenti, come ad esempio la velocità di reazione, che potessero dare un aiuto nello spiegare l'andamento delle reazioni, le rese e i rapporti tra prodotti e reagenti. Si è cercato di applicare queste metodiche anche ai liquidi ionici, ma non sempre è risultato possibile correlare la polarità alla struttura del IL.

2.4 Reazione di Ullmann

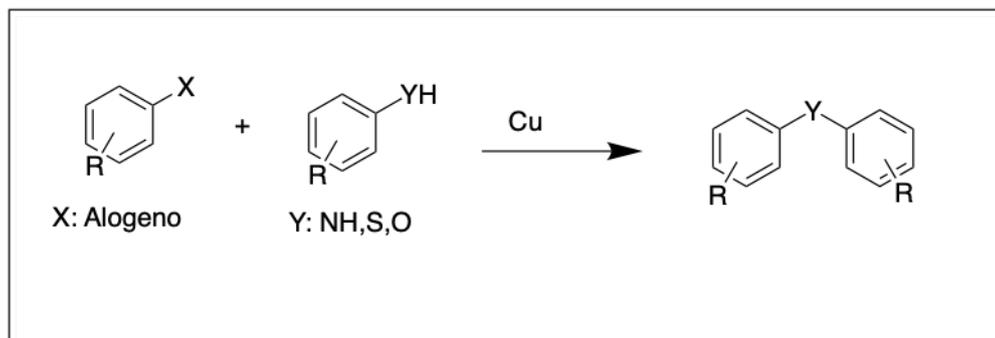


Figura 8. Condensazione di Ullmann

La reazione di Ullmann è generalmente utilizzata per sintetizzare composti diarilici o poliarilici tramite condensazione con alogenuri arilici, fatta eccezione per i fluoruri arilici, con anilina o fenolati. Nei primi del '900 Fritz Ullmann e Irma Goldberg pubblicarono uno studio che riguardava la sostituzione nucleofila aromatica rame catalizzata. La reazione di Ullmann richiede l'uso di quantità stechiometriche di sali di rame, alte temperature di reazione (maggiore 200 °C) e tempi lunghi di reazione. Negli ultimi anni questa reazione è stata oggetto di numerose applicazioni industriali, come ad esempio la sintesi di intermedi in campo farmaceutico, nella chimica fine e dei polimeri. Attualmente si fa una distinzione tra il termine "condensazione di Ullmann" e "reazione di Ullmann"; nel primo caso si fa riferimento ad una reazione rame catalizzata a livello stechiometrico o catalitico tra un alogenuro arilico e un derivato amminico, fenolico o tiofenolico, utilizzato per sintetizzare Arilamine, arileteri e ariltioeteri; con il secondo termine si intende invece la sintesi rame catalizzata di derivati bi-arilici a partire da alogenuri arilici. Le reazioni di coupling tra C-S catalizzate da rame, sono state attentamente studiate, questo perché i tioeteri sono una classe di composti largamente utilizzata, in quanto intermedi di sintesi di numerose molecole che presentano un notevole interesse biologico e farmacologico. Vari altri metalli di transizione vengono utilizzati per catalizzare le reazioni di cross-coupling, ma l'utilizzo del rame risulta essere il più adatto, poiché è meno tossico ed economico. Tra le varie metodiche per ottenere il legame C-S, la reazione di Ullmann catalizzata da rame, risulta essere una delle migliori vie per sintetizzare queste molecole, grazie alle buone rese.⁴⁴ Alcuni liquidi ionici come riportato in letteratura, possono essere utilizzati come solventi in reazioni di cross-coupling compresa la reazione di Ullmann. La bassa solubilità di alcuni composti organici nel liquido ionico e la solubilità del liquido ionico invece in acqua, facilita

la separazione dei prodotti mediante estrazione.⁴⁵ Le reazioni di coupling C-S sono spesso accompagnate da reazioni indesiderate come l'ossidazione dei tioli a disolfuri, e la formazione di prodotti secondari come solforati che sono in grado di interagire con il catalizzatore metallico, andando a modificare o disattivare il catalizzatore stesso.⁴⁶

2.5 Reazioni di Suzuki

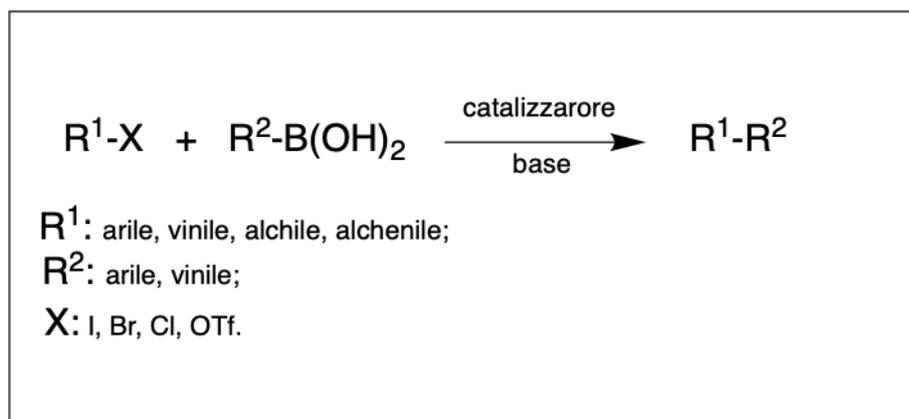


Figura 9. Reazione di Suzuki

Le reazioni di cross-coupling catalizzate dal Palladio (Pd) sviluppate nel corso degli ultimi decenni, come quella di Suzuki, vengono considerate tra le più potenti e versatili metodologie di sintesi impiegate nell'industria chimica e farmaceutica per la formazione, in fase omogenea, di legami C-C. Generalmente in queste reazioni si ha un catalizzatore omogeneo che va a mediare la reazione tra un elettrofilo organico meno reattivo, tipicamente un alogenuro arilico, e differenti nucleofili al carbonio. La reazione di Suzuki fu descritta per la prima volta nel 1979 da Suzuki e Miyaura, ad oggi è uno dei metodi sintetici più utilizzati per la formazione di legami C-C non simmetrici.

Questa reazione consiste in un cross-coupling tra un composto organo-boronico, spesso un acido boronico, ed un elettrofilo organico meno reattivo, tipicamente un alogenuro arilico o vinilico, in presenza di Palladio (0) che si forma in situ e una base in grado di neutralizzare l'acido alogenidrico formatosi durante il ciclo catalitico. È considerata una delle reazioni più versatili soprattutto nella sintesi derivati diarilici, alchenilarilici e 1,3-dienici.

Nella reazione di Suzuki le problematiche maggiori sono dovute alla bassa attività dei catalizzatori generalmente utilizzati, e per poter ottenere dei risultati soddisfacenti, bisogna impiegare quantità elevate di catalizzatore e prolungati tempi di reazione.

2.6 Liquidi ionici e tecnologia microonde (MW)

Negli ultimi anni i liquidi ionici sono diventati composti di grande interesse nella sostituzione dei solventi organici, principalmente a causa delle loro proprietà uniche di non infiammabilità, non volatilità, possibilità di riutilizzo, alta stabilità termica, e di fattori chimici come la stabilizzazione delle cariche formate durante il corso delle reazioni, e la promozione della catalisi.⁴⁷

Il loro utilizzo come mezzo di reazione è stato segnalato per essere un'alternativa efficiente e pratica rispetto all'uso di solventi organici volatili e tossici, e portano a una riduzione dei tempi di reazione e rese più elevate. La combinazione tra l'utilizzo dei liquidi ionici e l'irradiazione microonde (MW) è una tecnica che è stata ampiamente esplorata⁴⁸. Questo sistema combinato è risultato essere molto efficiente nella sintesi di eterocicli differenti, dato che i ILs sono polari e ionici, favoriscono le interazioni nell'irradiazione con MW e sono più efficaci rispetto ai normali solventi. In differenti tipi di reazioni in cui questa combinazione è stata utilizzata sono stati ottenuti prodotti con rese molto buone, ma la vera differenza si è vista con il tempo di reazione, infatti rispetto alle normali metodiche svolte con riscaldamento tradizionale e solventi organici, il tempo di reazione è stato ridotto notevolmente a conferma di un effetto sinergico⁴⁹

Capitolo 3: Introduzione alla parte sperimentale

3.1 Progettazione, sintesi e valutazione biologica di inibitori selettivi di ADAM8

La Matrice extracellulare (ECM) rappresenta la più complessa unità di organizzazione strutturale degli organismi viventi. Costituisce la componente acellulare dei tessuti ed è formata da un'intricata rete di macromolecole organizzate in una struttura tridimensionale.¹ Le Metzincine costituiscono una superfamiglia di endopeptidasi zinco-dipendenti implicate nel rimodellamento e nella degradazione della ECM. Il loro nome deriva dalla presenza all'interno del sito catalitico di uno ione zinco (II) e di un residuo di metionina conservato. Questa famiglia di proteasi è suddivisa in cinque sottofamiglie: Serralisine, Astacine, Pappalisine, Metalloproteinasi della matrice extracellulare (MMPs) e Adamalisine (ADAMs e ADAMTSs). Tra queste, le MMPs e le Adamalisine sono le zinco-endopeptidasi più importanti e più studiate, perché ricoprono un importante ruolo in numerose condizioni patologiche di tipo neoplastico e non neoplastico.²

Le ADAMs (A Disintegrin and Metalloproteinases) sono una famiglia di glicoproteine transmembrana di tipo I e sono caratterizzate da una struttura multidominio. Svolgono la loro attività principalmente a livello cellulare mediando i processi di migrazione, adesione, fusione e proliferazione, oltre ad esplicare un'elevata attività proteasica. Tra i loro principali substrati troviamo proteine transmembrana di tipo I e II, molecole di adesione cellulare, citochine, chemochine e fattori di crescita.¹⁷ Le ADAMs e le MMPs presentano un'elevata omologia strutturale a livello del sito catalitico dove è presente uno ione Zn^{2+} coordinato con tre residui di istidina e una molecola di acqua. Negli ultimi anni, ADAMs e MMPs sono state studiate come potenziali bersagli terapeutici. Recentemente, sono stati sintetizzati numerosi inibitori in grado di mimare gli specifici substrati peptidici naturali. La sintesi di nuovi inibitori selettivi risulta però difficile a causa dell'elevato grado di omologia tra le diverse isoforme di enzimi appartenenti alle MMPs e delle ADAMs, nonché della complessità delle loro funzioni fisiologiche.

ADAM8 è una delle proteasi appartenente alla famiglia delle Adamalisine, implicata in processi biologici responsabili dello sviluppo di diverse patologie infiammatorie, quali asma allergico e artrite, e patologie tumorali. Un'espressione anomala di ADAM8 è stata identificata in tumori solidi, come glioma, cancro ai polmoni, cancro al pancreas, carcinomi renali e nel carcinoma prostatico. Un'iperespressione di ADAM8 è stata inoltre associata ad una prognosi sfavorevole nel carcinoma epatico, nel cancro al seno e nell'adenocarcinoma

pancreatico. ADAM8 risulta coinvolta nella carcinogenesi, in quanto stimola l'angiogenesi, aumenta la capacità di migrazione e invasione cellulare e va ad inibire l'apoptosi nelle cellule tumorali.⁵⁰

L'iperespressione di ADAM8 in diversi tipi di tumori e la sua espressione a bassi livelli nei tessuti in condizioni fisiologiche, ha reso negli ultimi anni ADAM8 un interessante target farmacologico. Pochi esempi di inibitori sintetici di ADAM8 sono stati riportati in letteratura fino ad oggi. I principali sono rappresentati da una serie di peptidi ciclici sviluppati nel 2015 da Bartsch et al.³⁵ a partire dalla sequenza di amminoacidi situati nel dominio disintegrinico di ADAM8, ritenuto responsabile del legame con l'integrina $\beta 1$ sulla membrana citoplasmatica. Il peptide ciclo(RLsKDK), detto anche BK-1361 (**Figura 10**), dimostrò di bloccare l'attivazione di ADAM8 con elevata potenza e alta selettività ($IC_{50} = 182$ nM) e risultò efficace *in vivo* in un modello di tumore al pancreas. BK-1361 è stato testato anche in un modello murino di asma risultando efficace nell'attenuare l'iperattività bronchiale (BHR) e l'infiammazione bronchiale.⁵¹ In seguito sono stati sviluppati dei derivati peptidomimetici di BK-1361⁵² senza tuttavia ottenere miglioramenti significativi rispetto all'attività biologica del composto lead.

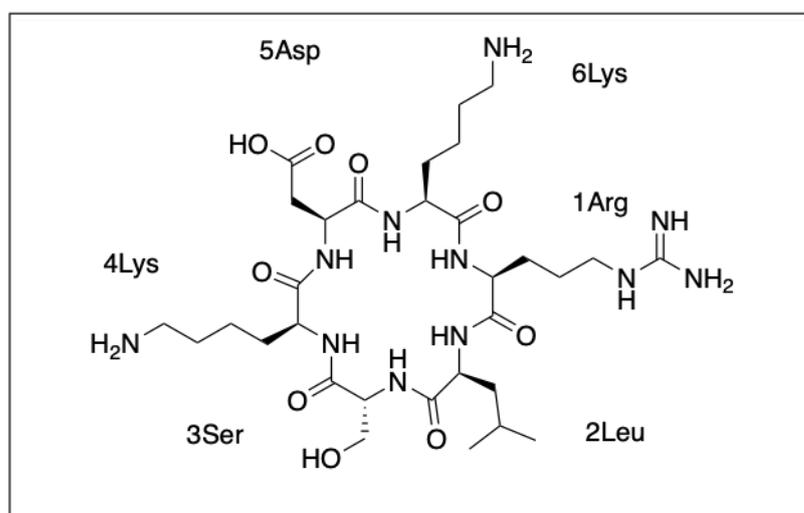


Figura 10. Struttura chimica di BK-1361

Recentemente sono stati riportati da Schlomann et al³⁸ degli acidi idrossammici a struttura arilsolfonammidica in grado di inibire l'attività proteolitica di ADAM8 mediante legame al suo sito catalitico. Inizialmente è stato condotto uno screening preliminare su inibitori noti di ADAM17, sfruttando le similarità strutturali tra i domini catalitici di queste due proteasi. Tra i vari composti testati, sono stati individuati due inibitori nanomolari di ADAM8, i derivati

FC143³⁶ e FC387³⁷ (**Figura 11**). La forte affinità di questi acidi idrossammici per ADAM8, valutata su enzima ricombinante umano, è stata confermata da ulteriori saggi *in vitro* condotti su cellule HEK 293 dove è stata evidenziata un'inibizione del rilascio di CD23 solubile nello spazio extracellulare, processo solitamente promosso da ADAM8.

Le attività di FC143 e FC387 su ADAM8 e ADAM17 sono risultate molto simili. Infatti l'acido idrossammico FC143 ha mostrato una IC₅₀ 6 nM su ADAM8 e 5.1 nM su ADAM17, mentre FC387 ha mostrato una IC₅₀ su ADAM8 9.2 nM e 6 nM su ADAM17.

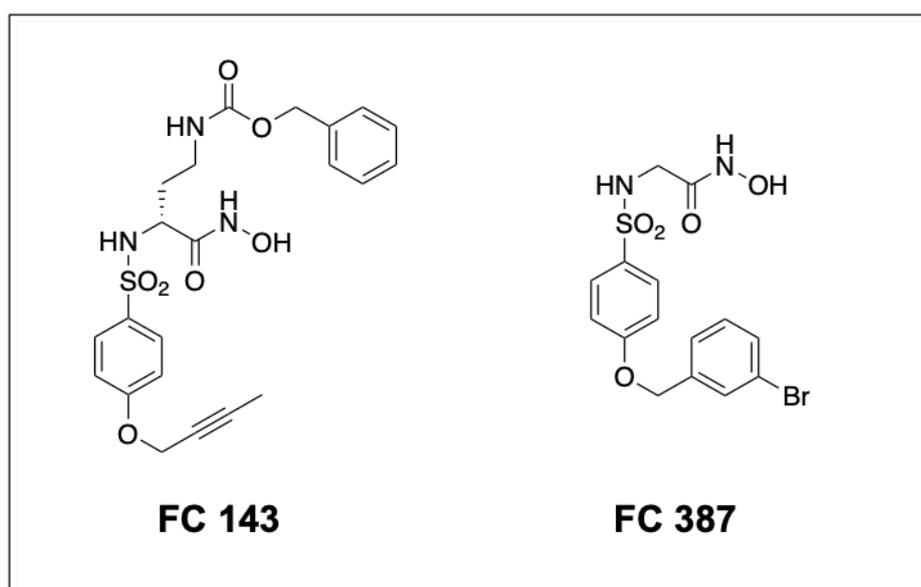


Figura 11. Strutture degli acidi idrossammici **FC143** (1) e **FC387**.

Questa similarità, è stata anche confermata da un'analisi di docking di FC143 nel sito catalitico di ADAM8 e ADAM17, dove si è evidenziata un'analogia modalità di interazione del ligando con entrambi gli enzimi (**Figura 12**).

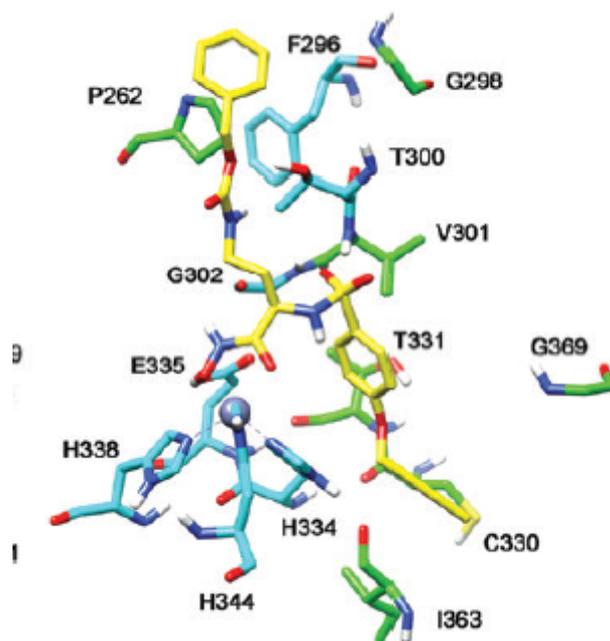


Figura 12. Docking di FC143 (in giallo) all'interno del sito catalitico di ADAM17 sovrapposto al il sito catalitico di ADAM8. I residui non conservati di ADAM8 rispetto a ADAM17 sono colorati in verde mentre quelli conservati sono colorati in turchese.

Sulla base dei dati promettenti ottenuti per l'idrossammato 4-butinilossibenzen sostituito FC143, nella prima parte del presente lavoro di tesi si è ritenuto interessante proseguire l'ottimizzazione strutturale di questo composto al fine di migliorarne il profilo di selettività per ADAM8 nei confronti di ADAM17.

In quest'ottica è stato inizialmente effettuato uno studio structure-based di ottimizzazione di FC143 nel sito catalitico di ADAM8 e di ADAM17, visto che di entrambi questi enzimi sono disponibili le strutture tridimensionali ottenute tramite cristallografia ai raggi X.³⁴⁵³ Questo studio, effettuato dal Prof. Tiziano Tuccinardi, ha portato ad ipotizzare che la sostituzione del gruppo benzilossi carbonilico di FC143 con un anello aromatico potesse orientare la selettività d'azione verso la ADAM8. E' stato dunque progettato il derivato **2** con un sostituito etil fenilico in P1 che sembrava capace di dare un'interazione forte (pi-pi stacking) con la fenilalanina F303 (**Figura 13**), risultata essere non conservata in ADAM10 e ADAM17. Infatti in questi enzimi nella stessa posizione si trova una leucina.

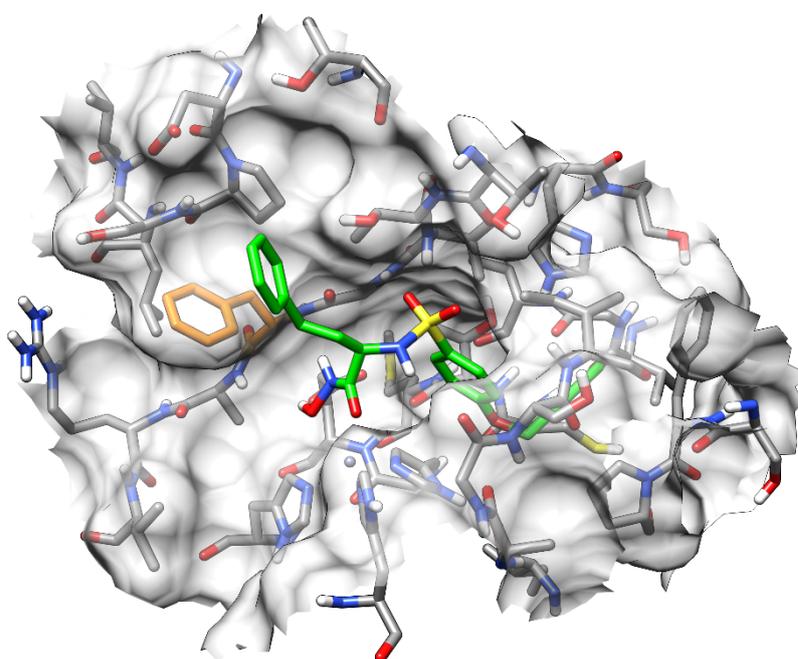


Figura 13. Docking di **2** nel sito catalitico di ADAM8 (F303 colorata in arancione)

Oltre al composto **2** si è poi deciso di sintetizzare il derivato *n*-propil fenilico **3** e il derivato **4**, con un sostituito arilico in P1 ancora più ingombrante, per valutare i possibili effetti sull'attività inibitoria e sulla selettività nei confronti di ADAM8 (**Figura 14**).

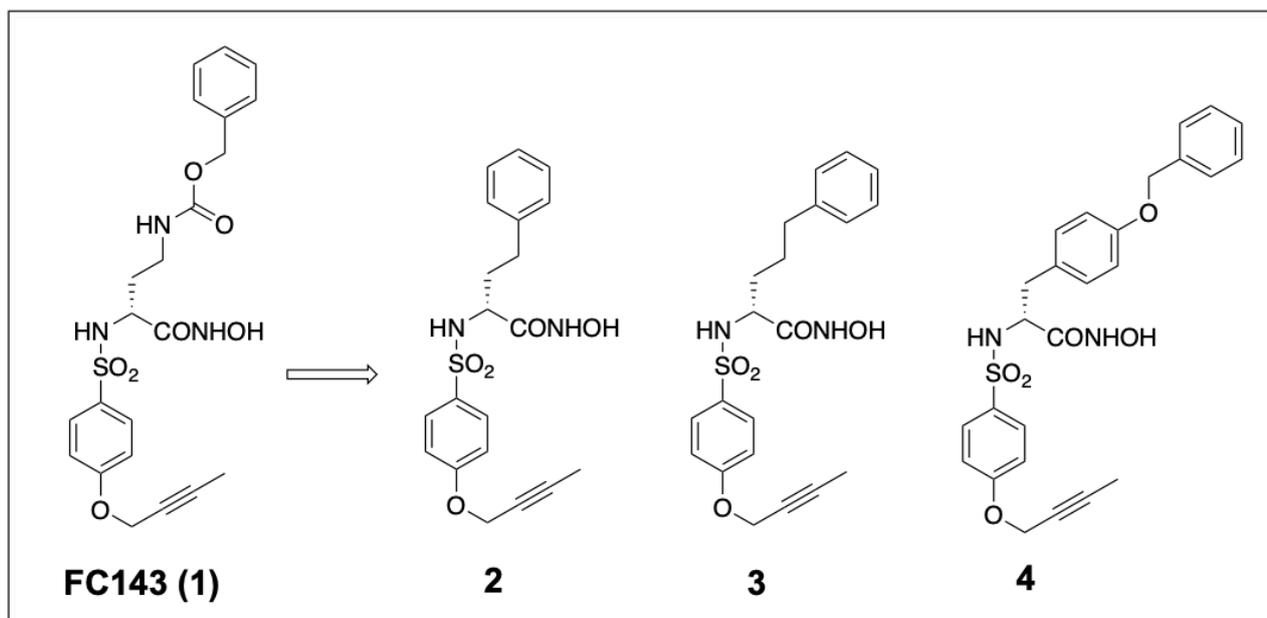
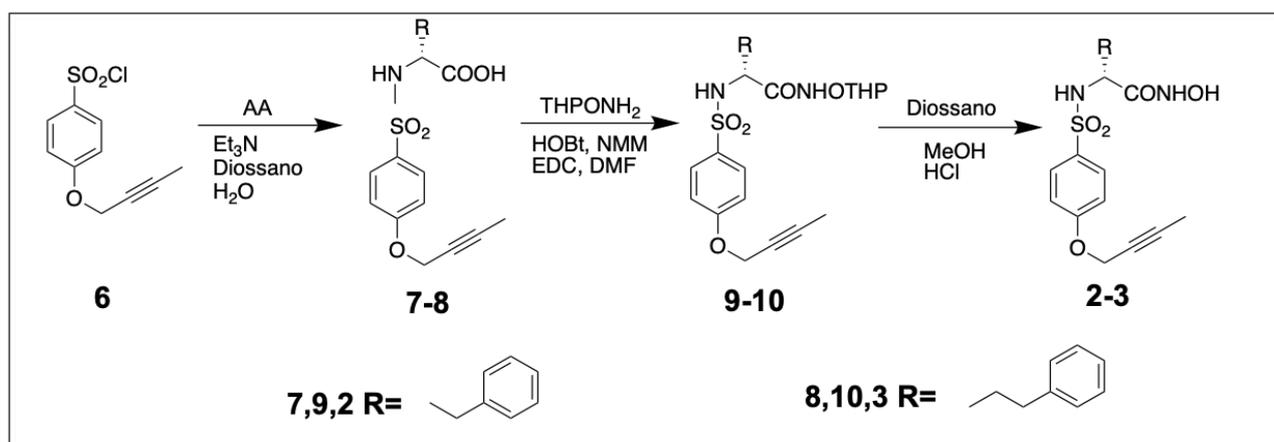


Figura 14. Strutture dei derivati di FC143 (**2-4**) sintetizzati nella tesi.

3.1.1 Sintesi

I composti **2**, **3** e **4** sono stati sintetizzati come riportato negli **Schemi 1** e **2** a partire dal 4-butinilossibenzen solfonilcloruro **6**, preparato come descritto in precedenza.³⁶

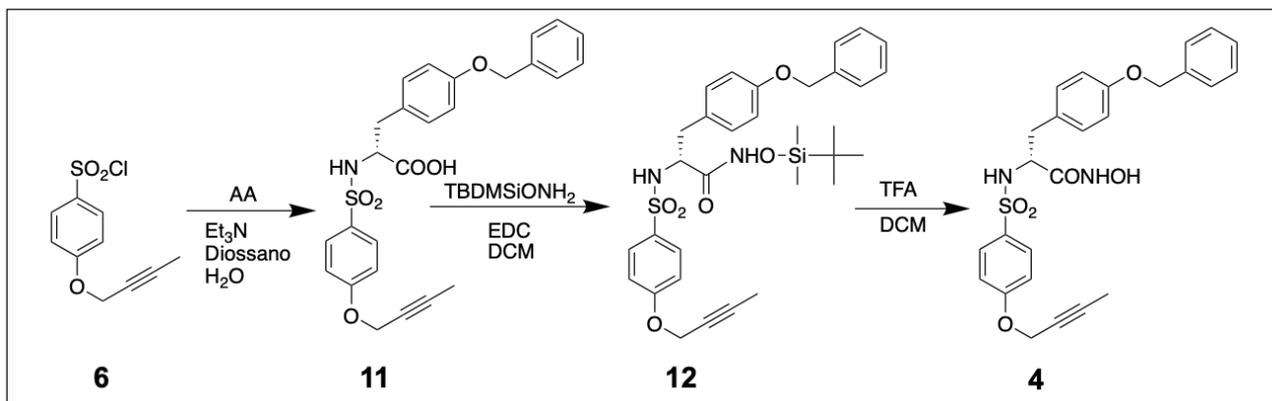
Gli acidi carbossilici **7**, **8** e **11** sono stati ottenuti tramite una reazione di coniugazione tra il solfonilcloruro **6** ed il rispettivo amminoacido non-naturale commerciale in presenza di H₂O e Et₃N. Gli amminoacidi utilizzati sono stati: la D-omofenilalanina per l'acido carbossilico **7** (**Schema 1**, resa **7**: 81.5%), l'acido D-2-ammino-5-fenilico per l'acido carbossilico **8** (**Schema 1**, resa **8**: 86%) e l' O-Benzil-D-Tirosina per l'acido carbossilico **11** (**Schema 2**, resa 45%).



Schema 1. Sintesi dei composti **2** e **3**.

Successivamente i composti **7** e **8** sono stati protetti nella loro funzione carbossilica tramite trattamento con O-(Tetraidro-2H-piran-2-il) idrossilammina (THPONH₂), *N*-Etil-3-dimetilamminopropilcarbodiimmide cloridrato (EDC), 1-Idrossibenzotriazolo (HOBT) e *N*-Metilmorfolina (NMM) in DMF anidra sotto atmosfera inerte (vedi **Schema 1**) ottenendo i derivati idrossammici tetraidropiranilici protetti **9** e **10**. La successiva deprotezione dei derivati **9** e **10** è stata eseguita tramite idrolisi acida con HCl 4N, in una miscela di dioxano e MeOH (**Schema 1**) ottenendo i corrispondenti acidi idrossammici **2** e **3** (resa **2**: 48,04%; resa **3**: 18,63%).

L'acido carbossilico **11** stato convertito nel corrispondente idrossammato **4** mediante condensazione con *tert*-butil-dimetil-silil-idrossilammina (TBDMSiONH₂), in presenza di EDC in diclorometano (CH₂Cl₂) e successiva deprotezione con acido trifluoroacetico (TFA) in CH₂Cl₂ (**Schema 2**, resa 56,12%).



Schema 2. Sintesi del composto **4**.

3.1.2 Risultati biologici

I derivati di FC143, **2**, **3** e **4**, così sintetizzati sono stati poi testati attraverso saggi *in vitro* per valutarne l'attività inibitoria verso ADAM8. I saggi biologici sono stati effettuati dal gruppo di ricerca del professor Jörg W. Bartsch dell'Università di Marburg (Germania). I nuovi composti sono stati saggiati sia sull'ADAM8 umana ricombinante che su cellule HEK293 in cui il rilascio di CD23 solubile (sCD23) dipende unicamente dall'attività proteolitica (shedding) di ADAM8 sulla membrana plasmatica. Infatti CD23 (low-affinity receptor FcεRII) è una glicoproteina transmembranale di tipo II ed è un substrato riconosciuto di ADAM8. I risultati ottenuti sono riportati in **Tabella 2**.

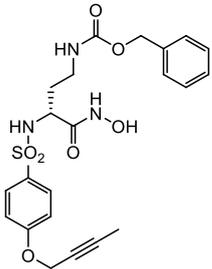
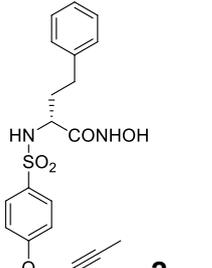
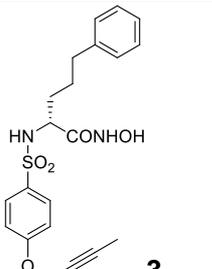
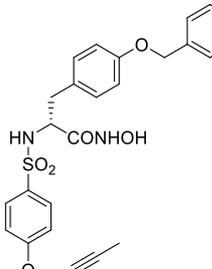
Compd	IC ₅₀ nM		
	ADAM8 (attività enzimatica) ^a	ADAM17 (attività enzimatica) ^a	CD23 shedding (attività in cellula) ^b
 1	50	<10	200
 2	200	-	>1000
 3	50	<10	500
 4	>200	-	>1000

Tabella 2. Attività biologica dei nuovi composti **2-4**.

^a Attività proteolitica di ADAM8 umana ricombinante determinata per idrolisi del peptide fluorogeno di sintesi PepDAB13. ^b Determinata attraverso saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) su cellule HEK 293.

I migliori risultati in termini di attività sono stati ottenuti con il derivato **3**, con il sostituito *n*-propilfenilico in P1, il quale ha mostrato un'attività inibitoria sull'enzima isolato paragonabile a quella del composto lead FC143 sia su ADAM8 (IC₅₀= 50 nM) che su ADAM17 (IC₅₀< 10 nM) ed un'attività inibitoria sullo shedding di CD23 solo lievemente inferiore a quella del

lead. Più deludenti sono stati i dati di attività del composto **2** e soprattutto del composto **4** che probabilmente presenta un sostituente benzilossifenilico troppo ingombrante in P1. Quest'ultimo ha perso affinità per l'enzima target ADAM8 sia nel saggio enzimatico che in quello su cellula. Inoltre, nessuno dei tre derivati di FC143 ha migliorato il profilo di selettività di quest'ultimo per ADAM8 rispetto ad ADAM17.

Ulteriori studi di modeling saranno necessari in futuro per ottimizzare ulteriormente questa classe promettente di inibitori di ADAM8.

3.2 Messa a punto di metodologie “green” per la sintesi di inibitori selettivi di MMP-12

Le procedure di sintesi per la preparazione di composti biologicamente attivi comportano percorsi multistep che spesso presentano lunghi tempi di reazione e richiedono alte temperature. Inoltre, spesso i successivi processi di trattamento e/o purificazione richiedono l'uso di solventi tossici e non ecologici. Come approcci innovativi, sono stati studiati diversi mezzi reazione più rispettosi dell'ambiente (come ad esempio fluidi supercritici⁵⁴, solventi fluorurati⁵⁵, alcoli⁵⁶, polimeri liquidi, solventi eutettici profondi (DES) e liquidi ionici (IL)) rispetto all'utilizzo di comuni solventi organici. Dall'inizio di questo secolo, i liquidi ionici sono stati considerati delle alternative promettenti ai solventi organici convenzionali, venendo classificati come mezzi sostenibili e “green”. I liquidi ionici sono dei sali organici fusi, liquidi a temperatura ambiente o comunque inferiore ai 100 °C dotati di proprietà chimico/fisiche uniche che includono: pressione di vapore trascurabile, buona stabilità termica e chimica, polarità regolabile, infiammabilità nulla e buon potenziale di solvatazione.⁵⁷ Una recente tecnica di grande impatto è la sintesi assistita da microonde (MW) combinata con l'utilizzo dei liquidi ionici come solventi, co-solventi, catalizzatori. Per la loro natura ionica, l'elevata polarità e l'aumento della loro complessa permittività in funzione della temperatura, i liquidi ionici supportano perfettamente la tecnologia a microonde, offrendo quindi delle alternative valide per sintesi che risultano difficili da effettuare con altri mezzi. La combinazione sinergica del microonde e dei liquidi ionici può essere cruciale per convertire processi chimici “non green” e/o processi con basse rese in processi sostenibili ad alto rendimento. Vale la pena ricordare che grazie alla suddetta tensione di vapore nulla, i liquidi ionici rappresentano i sistemi più sicuri per la tecnologia a microonde.

I diaril tioeteri sono degli intermedi di reazione fondamentali per la sintesi di nuove molecole biologicamente attive.⁵⁸ Recentemente, il gruppo di ricerca del Prof Rossello ha riportato lo sviluppo di nuovi inibitori di MMP-12 di natura diaril tioarilica, composti **18-23 (Figura 15)**.⁵⁹ In particolare gli esteri **17a** e **17b** sono risultati intermedi chiave per l'intera sintesi, portando all'ottenimento di diversi inibitori di MMP-12 con attività nanomolare (**Figura 15**).

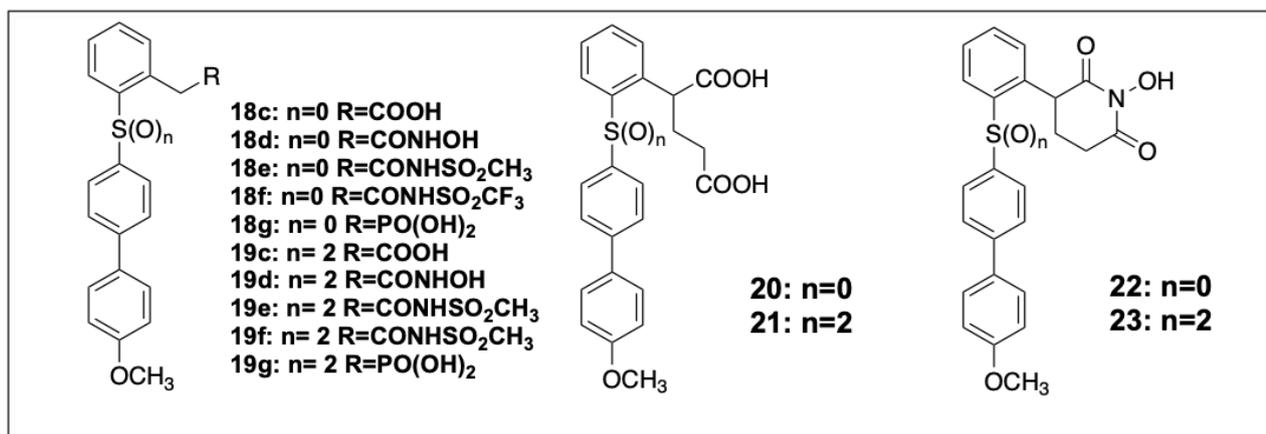


Figura 15. Inibitori MMP-12 recentemente pubblicati.⁵⁹

La via sintetica riportata per l'ottenimento dei derivati diaril tioeterei **17a,b** è basata su due passaggi consecutivi comprendenti una reazione di tipo Ullmann e una reazione di cross-coupling di Suzuki (**Schema 3**).

La condensazione di Ullmann è una reazione rame-catalizzata tra un alogenuro arilico e un derivato amminico, fenolico o tiofenolico, utilizzata per la sintesi di arilammine, arileteri o ariltioeteri, rispettivamente. Purtroppo, le condizioni di reazione richieste sono drastiche e spesso ne limitano l'utilizzo per certe classi di composti. Infatti questo tipo di reazione richiede temperature superiori ai 150°C per arrivare ad avere rese soddisfacenti.

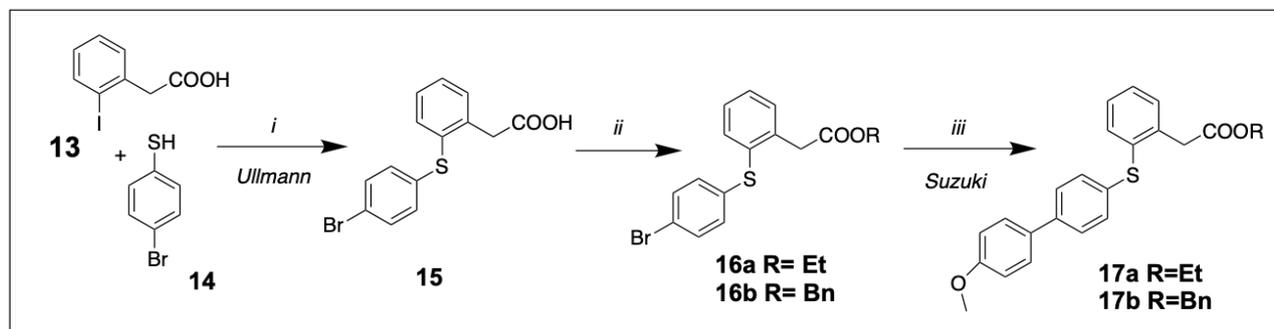
La reazione di Suzuki è una cross-coupling tra un acido boronico e un alogenuro arilico, catalizzata da Pd⁰. L'ottimizzazione di questo tipo di reazione in condizioni "green" è stato oggetto di studio negli ultimi anni. In particolare, sono stati valutati diversi sistemi catalitici basati sull'uso di Pd con differenti ILs come solventi.⁶⁰

L'utilizzo di liquidi ionici nelle reazioni di cross-coupling consente di operare a temperatura più basse, di ridurre il tempo di reazione e talvolta di eliminare l'uso della base.

Nella seconda parte del mio progetto di tesi mi sono occupata dell'ottimizzazione della sintesi dei derivati diaril tioeterei **17a,b** sviluppando una via sintetica più "green" ed ecosostenibile tramite l'utilizzo di ILs come solventi e combinando le migliori condizioni di reazione con l'uso della tecnologia di irradiazione a microonde.

Questo progetto era già stato iniziato in un precedente lavoro di tesi (Tesi di laurea di Gioia Lorenzini, Università di Pisa, luglio 2016) ed è stato condotto in collaborazione con il gruppo

di ricerca della Prof. Felicia D'Andrea, portando ad una pubblicazione su rivista open access.⁶¹



Schema 3. Schema di sintesi dei diaril tioeteri **17a** e **17b**. *Reagenti e condizioni di reazione:* i) Cu, [BMIM]Br, K₂CO₃, MW, 130 °C, 40 min, 85%; ii) a) SOCl₂, EtOH, 60 °C, 85%; b) BnBr, K₂CO₃, diossano, H₂O, RT, 72%; iii) acido 4-metossifenilboronico, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, [BMIM]BF₄, MW, 110 °C, 30 min, 56-58%.

L'acido carbossilico **15** è stato sintetizzato secondo quanto precedentemente riportato in letteratura⁴⁵, tramite reazione di Ullmann tra l'acido 2-iodofenil acetico e il *p*-bromo tiofenolo, utilizzando rame a diversi stati di ossidazione come catalizzatore e l'1-butil-3-metilimidazolio bromuro ([BMIM]Br) come solvente, a differenti tempi di reazione e temperature (**Tabella 2**). L'acido **15** è stato sottoposto ad esterificazione ottenendo gli esteri **16a** e **16b**, (vedi parte sperimentale). Questi ultimi sono stati poi convertiti nei loro corrispondenti derivati bifenilici **17a** e **17b** mediante una reazione cross-coupling di Suzuki utilizzando il [BMIM]BF₄ come mezzo di reazione (**Schema 3**).

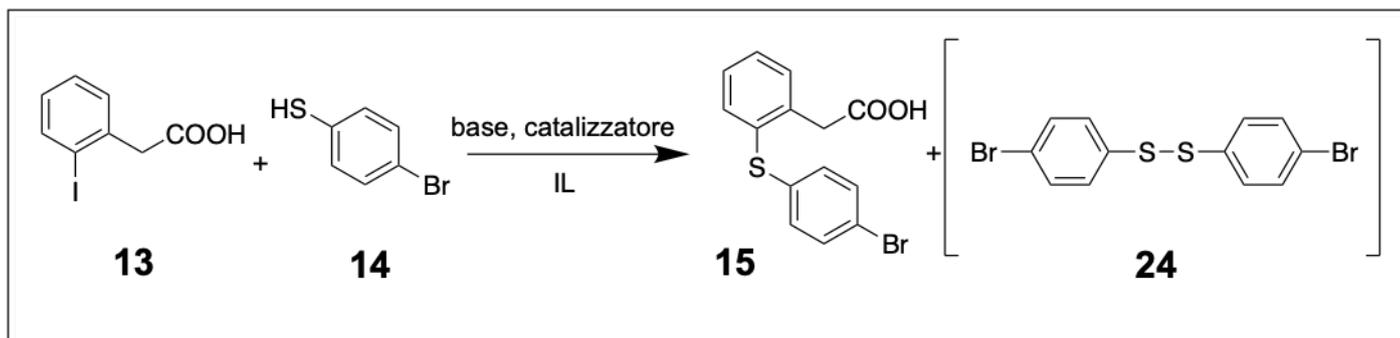
3.2.1 Reazione di Ullmann utilizzando ILs

L'ottimizzazione di questo primo step di reazione ha come punto di partenza delle condizioni di reazione riportate in letteratura da Luo et al.⁴⁵ per l'ottenimento di diaril tioeteri attraverso la reazione di Ullmann. Seguendo questo metodo, le condizioni di reazione da cui siamo partiti con il nostro studio di reattività prevedono: ILs come solventi ([BMIM]Br o l'1-butil-3-metilimidazolio cloruro ([BMIM]Cl)), K₂CO₃ come base, sali di rame come catalizzatori e la reazione viene condotta alla temperatura di 110°C.

Tutti i tentativi condotti sono stati valutati tramite analisi NMR (¹H) del grezzo di reazione (**Tabella 3**, prove R1-R13) costituito prevalentemente da una miscela degli acidi carbossilici

13 e **15**. In particolare, i segnali diagnostici sono stati i protoni metilenici (CH_2CO , δ 3.82 (**13**) and δ 3.84 (**15**)).

Il primo parametro analizzato è stato l'effetto dato dall'utilizzo di diverse basi (**Tabella 3**, prove R1-R6). La reazione tra l'acido 2-iodofenilacetico (**13**) e il 4-bromotiofenolo (**14**) è stata eseguita a 120°C (riscaldamento convenzionale) utilizzando CuI come catalizzatore e [BMIM]Br come solvente, con tempi di reazione variabili (9-29 h). Per quanto riguarda le basi, sono state utilizzate il K_2CO_3 (prove R1-R2), il tetrabuttilammonio idrossido (TBAOH) (prove R5-R6) e l'idrossido di colina (prove R3-R4), al fine di valutare come la solubilità della base nel liquido ionico potesse influenzare l'esito della reazione. Infatti il TBAOH e l'idrossido di colina sono solubili nei liquidi ionici mentre il carbonato di potassio è insolubile.



	IL ^a	Base ^a	Catalizzatore ^a	T (°C)	Tempo (h)	Conversione (%) ^b	
R1		K ₂ CO ₃	Cul	120	9	70	
R2					colina idrossido	20	65
R3		TBAOH				29	56
R4						21	35
R5		TBAOH MeOH				21	Tracce ^c
R6					29	Tracce ^c	
R7		K ₂ CO ₃	Cu ⁰	120	27	66	
R8				100	22	55	
R9				100	27	70	
R10				100	68	67	
R11				120	115	85	
R12				150	22	90 ^d	
R13			150	22	95 ^d		

Tabella 3. ^a Condizioni di reazione: acido 2-iodofenilacetico **13** (0.6 mmol), 4-bromotiofenolo **14** (0.7 mmol), base (0.7 mmol), catalizzatore (0.11 mmol), IL (2.5 mmol). ^b Resa del composto **15** è stata determinata con dati ¹H NMR del grezzo di reazione. ^c In accordo con le analisi TLC e NMR effettuate sulla reazione. ^d Composto **15**, rese isolate dopo triturazione con Et₂O/n-esano sul prodotto grezzo; prova 12: 81%; prova 13: 85%

L'analisi NMR ha individuato le condizioni della prova R1 come le condizioni più performanti con una conversione del 70% in 9 ore e utilizzando K_2CO_3 come base.

In tutti i tentativi è stata trovata una quantità sensibile di disolfuro **24** come sottoprodotto della reazione con un evidente effetto dannoso sulla resa del composto target. Inoltre la contemporanea disattivazione del catalizzatore metallico a causa delle forti proprietà di coordinamento e adsorbimento dello zolfo hanno causato una diminuzione dell'attività catalitica.⁶² Come riportato⁶³ questo inconveniente viene favorito dalle condizioni di reazione non anidre e dalla presenza di O_2 . Per ovviare a questa problematica, le successive prove sono state eseguite in atmosfera inerte di argon.

Nella prova R7 è stato valutato un cambiamento a livello del ILs sostituendo il [BMIM]Br con il [BMIM]Cl. La conversione del tioetere è stata solo del 66% dopo 27 ore a 120 °C, utilizzando CuI, K_2CO_3 e cambiando il liquido ionico, quindi non ha portato a nessun miglioramento.

Nelle prove dalla R8 alla R12 è stata variata la temperatura di reazione. In condizioni anidre e utilizzando K_2CO_3 come base la combinazione di un tempo di reazione più lungo (22 ore) e una temperatura più elevata (150 °C) ha dato la resa migliore con una conversione del 90% (prova R12).

Infine è stato studiato l'effetto di diversi catalizzatori (prova R13) mantenendo inalterati gli altri parametri (K_2CO_3 come base, [BMIM]Br come solvente e riscaldamento convenzionale a 150 °C per 22 ore) e variando lo stato di ossidazione del rame (Cu^0 e Cu^+). I risultati ottenuti sono stati ottimi con entrambi i catalizzatori raggiungendo una percentuale del 90-95% del diaril tioetere **15** nel grezzo di reazione. Il processo di purificazione mediante triturazione ha fornito una resa del 85% (Cu^0 , prova R13) e del 81% (CuI, prova R12) per il composto **15**.

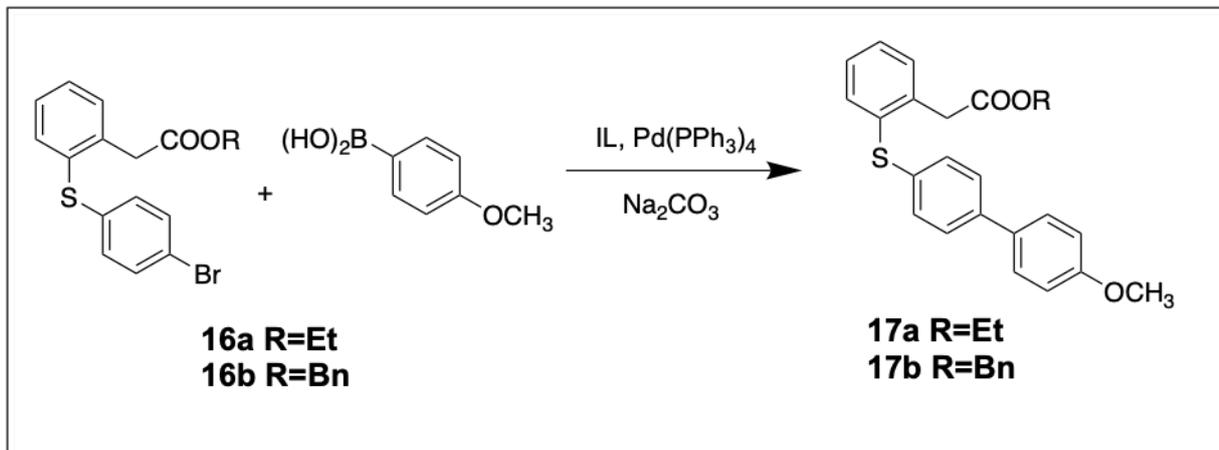
Le condizioni di reazione delle prove R12 e R13 sono state individuate come le più efficienti. Quindi partendo da questi parametri è stata valutata la combinazione dell'irradiazione a microonde rispetto al riscaldamento convenzionale con lo scopo di ridurre i tempi di reazione (**Tabella 4**). Infatti i tentativi R14-R16 riportano una riduzione della durata di reazione da 22h a 25/40 min variando i catalizzatori ma mantenendo rese elevate. I risultati mostrati nella **Tabella 3** dimostrano come una combinazione dell'irradiazione a microonde con l'uso di un liquido ionico come mezzo di reazione sia un metodo efficiente per promuovere le reazioni di Ullmann per ottenere il diaril tioetere **15** in alte rese (85%) e breve tempo (40 minuti).

Prova	Catalizzatore ^a	T (°C)	Tempo (min)	Resa (%) ^b
R14	Cu ^o	130	40	85
R15	CuI	130	25	70
R16	Cu	100	40	38

Tabella 4. ^a Condizioni di reazione: acido 2-iodofenilacetico **13** (0.56 mmol), 4-bromotiofenolo **14** (0.7 mmol), K₂CO₃ (0.7 mmol), catalizzatore (0.11 mmol), [BMIM]Br (2.5 mmol). ^b Prodotto **15**, resa isolata.

3.2.2 Reazione di Suzuki-Miyaura utilizzando ILs.

La reazione di cross-coupling di Suzuki in ILs è stata ampiamente riportata in letteratura.⁶⁴ Il nostro punto di partenza è stata la procedura riportata da Matthews et al.⁶⁵ utilizzando l'1-butil-3-metilimidazolio tetrafluoroborato ([BMIM]BF₄) come solvente. Le reazioni sono state condotte sull'estere etilico **16a** e sull'estere benzilico **16b** (**Tabella 5**, prove R17-20), poiché le rese migliori per questa reazione erano state precedentemente ottenute su acidi carbossilici protetti. Le reazioni sono state eseguite mediante riscaldamento convenzionale a 110 °C utilizzando Na₂CO₃ come base, Pd(PPh₃)₄ come catalizzatore e [BMIM]BF₄ come solvente, per ottenere i derivati bifenilici **17a** e **17b** con una resa del 15/25% dopo 36-48 ore (**Tabella 4** prove R17 e R19). Con l'obiettivo di andare a migliorare la resa e di ridurre i tempi di reazione, è stato combinato l'uso dei liquidi ionici con le radiazioni a microonde. I bromuri arilici **16a** e **16b** e l'acido 4-metossifenilboronico sono stati fatti reagire sotto irradiazione microonde (**Tabella 5**, prove R18 e R20) fornendo dopo il trattamento della miscela i derivati bifenilici **17a** e **17b** in buone rese senza la necessità di purificazioni cromatografiche.



Prova	Substrato ^a	Prodotto	T (°C)	Tempo	Metodo	Resa (%) ^b
R17	16a	17a	110	48 h	convenzionale	15
R18				30 min	MW	56
R19	16b	17b		36 h	convenzionale	25
R20				30 min	MW	58

Tabella 5. ^a Condizioni di reazione: Aril bromuro (**16a** or **16b**) (0.14 mmol), acido 4-metossifenil boronico (0.16 mmol), Na₂CO₃ 2M (0.29 mmol), [BMIM]BF₄ (1 mL, 5.35 mmol), Pd(PPh₃)₄ (0.002 mmol). ^b Resa isolata.

In particolare l'estere etilico **17a** è stato ottenuto con una resa del 15% tramite il riscaldamento convenzionale (prova R17) e con una resa del 56% mediante irradiazione microonde (prova R18) con una riduzione del tempo di reazione che va da 48 ore a 30 minuti. Allo stesso modo per l'estere benzilico **17b** la resa è stata aumentata dal 25% (riscaldamento convenzionale, prova R19) al 58% (reazione assistita da microonde, prova R20) con una riduzione del tempo di reazione da 36 ore a 30 minuti. Le radiazioni microonde hanno determinato un miglioramento significativo del tempo di reazione e delle rese rispetto al riscaldamento convenzionale. La combinazione dell'uso di ILs e della tecnologia MW pertanto ha fornito un'alternativa valida ed eco-friendly rispetto alle reazioni di Suzuki tradizionalmente condotte in toluene o diossano.

Concludendo sono stati ottimizzati due step fondamentali per la sintesi degli intermedi chiave **17a** e **17b** comprendenti una reazione di Ullmann e una reazione di Suzuki. Infatti,

dopo il processo di ottimizzazione, la reazione di Ullman è stata condotta in [BMIM]Br at 130°C ottenendo il diaril tioetere **15** in buone rese e brevi tempi di reazione (40 min). La reazione di Suzuki è stata invece condotta in soli 30 min a 110°C con rese soddisfacenti in [BMIM]BF₄.

Questa nuova metodologia di sintesi ha permesso quindi di ridurre tempi di reazione ed eliminare i solventi organici garantendo un'alternativa eco-sostenibile per la sintesi di importanti building blocks di interesse farmaceutico.

Capitolo 4: Parte sperimentale

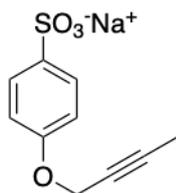
4.1 Materiali e metodi

La struttura di tutti i composti è stata definita per mezzo dell' ^1H -NMR e ^{13}C -NMR. Gli spettri di Risonanza Magnetica Nucleare sono stati determinati con uno spettrometro Bruker Avance III HD 400 operante a 400 MHz in CDCl_3 , DMSO-d_6 o in CD_3OD ; i chemical shift (δ) sono espressi in ppm. Tutti i composti sintetizzati presentano dati spettroscopici in accordo con le strutture loro assegnate. L'evaporazione ha avuto luogo sottovuoto in evaporatore rotante, usando come agente disidratante Na_2SO_4 anidro. Le Cromatografie Liquide preparative sono state effettuate mediante cromatografia flash utilizzando: colonne in vetro contenenti gel di silice 230-400 Mesh, colonne pre-impaccate ISOLUTE® Si II (Biotage) oppure Isolera Four SV (Biotage, un sistema automatizzato unito di detector UV a lunghezza d'onda variabile (200-400 nm)). Le Cromatografie su Strato Sottile (TLC) sono state effettuate usando lastre di alluminio con gel di silice Macherey-Nagel 254 (Merck) di 0.25 mm, contenenti un indicatore fluorescente (60 F254). Le varie macchie sono state evidenziate per mezzo di una lampada UV (254 nm); le sostanze non cromofore sono state evidenziate con una soluzione di acido Fosfomolibdico e visualizzate dopo riscaldamento. I punti di fusione sono stati determinati al microscopio di Kofler e non sono stati corretti. Tutti i reattivi chimici commerciali sono stati acquistati da Sigma-Aldrich.

4.2 Sintesi di 4-(pent-3-in-1-il) benzensolfonil cloruro (6)

4.2.1 Sintesi di sodio 4-(but-2-in-1-ilossi) benzensolfonato (5)

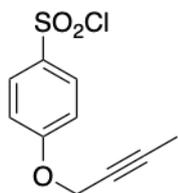
Ad una soluzione di 4-idrossibenzensulfonato sale sodico (2000 mg, 8.6mmol, 1 eq.) in isopropanolo (38 mL) e NaOH (1 N, 9 mL) viene aggiunto 1-bromo-2-butino (1.5 mL, 17.23 mmol, 2 eq.). La miscela di reazione viene scaldata a 70°C per 15 h. Al termine l'isopropanolo viene fatto evaporare, il precipitato bianco è stato raccolto per filtrazione, lavato con isopropanolo ed etere ed evaporato. Si ottiene il composto **5** (resa 95%) chimicamente puro come solido bianco cristallino.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, MeOD): δ 7.78-7.74 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7.00-6.97 (d, $J=9$ Hz, 2H), 4.72-4.69 (q, $J=2.2$ Hz, 2H), 1.83-1.81 (t, $J=2.2$ Hz, 3H).

4.2.2 Sintesi di 4-(pent-3-in-1-il) benzensolfonil cloruro (6)

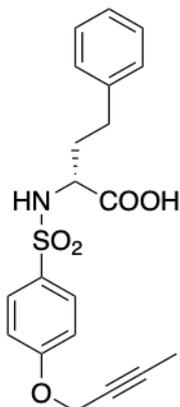
Ad una soluzione a 0°C di ossalilcloruro (2.7 mL, 32.15 mmol, 3 eq.) in DCM anidro (10.7 mL) è stata aggiunta goccia a goccia DMF (2.5 mL, 32.15 mmol, 3 eq.) e infine aggiunto 5 (2660 mg, 10.72 mmol, 1eq.). La miscela di reazione viene lasciata per 10' a 0°C , poi a temperatura ambiente per 48 h. Al termine la reazione viene trattata in ghiaccio ed estratta con n-Esano, la fase organica è stata lavata con acqua e brine, anidrificata (Na_2SO_4) e concentrata a pressione ridotta. Si ottiene un grezzo oleoso giallo che viene purificato tramite cristallizzazione sciogliendo il composto in n-Esano sotto corrente di Azoto a -15°C . Si ottiene il composto **6** (resa 71,3%) puro come solido bianco.



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.98 (m, 2H), 7.12 (m, 2H), 4.76 (q, $J=2.4$ Hz, 2H), 1.87 (t, $J=2.4$ Hz, 3H).

4.3. Sintesi dell'acido (*R*)-2-((4-(but-2-in-1-ilossi) fenil) solfonamido)-4-fenilbutanoico (7) (Schema 1).

Ad una soluzione del solfonilcloruro **6** (150 mg, 0.65 mmol, 1eq.) in acqua (2.53 mL), diossano (0.86 mL) e Et_3N (0.18 mL, 1.3 mmol, 2 eq.) viene aggiunta la D-homofenilalanina (116.49 mg, 0.65 mmol, 1eq.). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione per 12h. Al termine il solvente di reazione è evaporato e il grezzo è ripreso con NaOH 1N ed estratto con AcOEt (3x100 mL). La fase acquosa viene acidificata fino a pH fortemente acido e quindi viene nuovamente estratta con AcOEt (3x100 mL). Le fasi organiche sono riunite, anidificate (Na_2SO_4), filtrate e concentrate a pressione ridotta. Si ottiene il composto **7** (resa 81,5%) chimicamente puro come solido bianco.

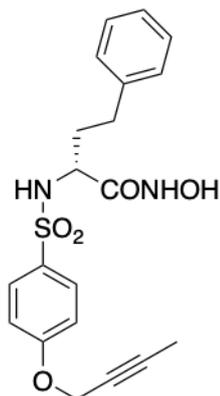


$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 7.76 (m, 2H), 7.28-7.24 (m, 2H), 7.19-7.16 (m, 1H), 7.11-7.09 (m, 2H), 7.00 (m, 2H), 5.17 (d, $J=9.2$ Hz, 2H), 4.72 (q, $J=2.4$ Hz, 2H), 3.95- 3.90 (m, 1H), 2.55-2.52 (m, 2H), 1.85 (t, $J=2.4$ Hz, 3H), 1.75-1.65 (m, 2H).

4.3.2 Sintesi dell'acido idrossammico (*R*)-2-((4-(but-2-in-1-ilossi) fenil) solfonamido)-4-fenilbutanoico (2) (Schema 1).

Ad una soluzione di **7** (205mg, 0.527 mmol, 1 eq.) in DMF anidro (1.165 mL) sotto atmosfera di N_2 , si aggiungono in successione HOBt (85.45 mg, 0.632 mmol, 1.2 eq.), THPONH₂ (191.38 mg, 1.633 mmol, 3.1 eq.), NMM (0.173 mL, 1.581 mmol, 3 eq.), infine viene aggiunto EDC (141.44 mg, 0.737 mmol, 1.4 eq.). La miscela di reazione si presenta di colore giallo, lascio in agitazione a temperatura ambiente per 12h. Al termine della reazione si riprende il grezzo con AcOEt, e si effettua un lavaggio con H_2O (1x100 mL), con NaHCO_3 ss (1x100 mL), con Brine (1x100 mL). La fase organica viene anidrificata (Na_2SO_4), filtrata e concentrata a pressione ridotta. Si ottiene il composto **9** (resa 45%) chimicamente puro come solido bianco che viene utilizzato direttamente nella reazione successiva.

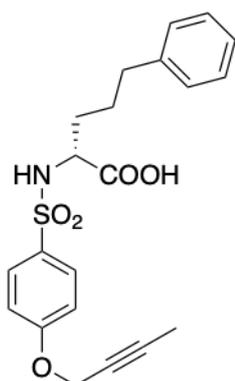
Ad una soluzione di **9** (0.587 mmol, 1 eq.) in Diossano (0.5 mL), si aggiungono in successione HCl 4N (9 mL) e MeOH (1.5 mL). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2h, dopodichè il solvente è evaporato. Il grezzo (123 mg) è purificato tramite Flash cromatografia (Isolera Biotage miscela eluente CHCl_3 95: MeOH 5) ottenendo il prodotto **2** (98.2 mg; resa 41,1%) chimicamente puro come solido bianco.



PF: 118-121°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.63 (s, 1H), 8.82 (bs, 1H), 7.98 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.22 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 7.16-7.10 (m, 3H), 6.98 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.83 (d, $J=2.0$ Hz, 2H), 3.55 (dd, $J_1=2.4$ Hz, $J_2=6.8$ Hz, 2H), 2.40-2.36 (m, 1H), 2.31-2.27 (m, 1H), 1.8 (t, $J=2.4$ Hz, 3H), 1.74-1.68 (m, 3H), 1.60-1.57 (m, 1H). ^{13}C NMR (100MHz, DMSO- d_6): δ 167.6, 160.6, 141.4, 134.1, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 126.3, 115.4, 84.6, 74.6, 56.8, 54.2, 35.1, 31.6, 3.6. Analisi elementare (%) per $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C, 53.43; H, 5.82; N, 7.35.

4.4. Sintesi dell'acido (*R*)-2-((4-(but-2-in-1-ilossi)fenil)solfonamido)-5-fenilpentanoico (**8**) (Schema 1).

Ad una soluzione di solfonilcloruro **6** (150 mg, 0.65 mmol, 1 eq.) in acqua (1.95 mL) Diossano (0.65 mL) e Et_3N (0.18 mL, 1.3 mmol, 2 eq.) viene aggiunto l'acido D-2-ammino-5-fenilpentanoico (125.60 mg, 0.65 mmol, 1 eq.). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione per 12h. Al termine il solvente è evaporato e il grezzo è ripreso con HCl 1N (50 mL) ed estratto con AcOEt (3x50 mL). La fase organica viene anidrificata (Na_2SO_4), filtrata e concentrata a pressione ridotta. Si ottiene il composto **8** (resa 86%) chimicamente puro come solido bianco.



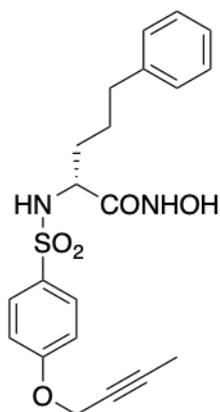
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.76 (m, 2H), 7.28-7.24 (m, 2H), 7.19-7.16 (m, 1H), 7.11-7.09 (m, 2H), 6.99 (m, 2H), 5.17 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 4.68 (q, $J=2.4$ Hz, 2H), 3.96-3.92 (m, 1H), 2.50 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.85 (t, $J=2.4$ Hz, 3H), 1.85-1.75 (m, 1H), 1.70-1.66 (m, 3H).

4.4.1 Sintesi dell'acido idrossammico (*R*)-2-((4-(but-2-in-1-ilossi)fenil)solfonamido)-5-fenilpentanoico (**3**) (Schema 1).

Ad una soluzione di 159.8 mg di **8** (0.412 mmol, 1 eq.) in DMF anidro (0.910 mL) sotto atmosfera di N_2 , si aggiungono in successione HOBt (64.33 mg, 0.494 mmol, 1.2 eq.), THPONH $_2$ (149.62 mg, 1.277 mmol, 3.1 eq.), NMM (0.135 mL, 1.36 mmol, 3 eq.), infine

viene aggiunto EDC (111 mg, 0.576 mmol, 1.4 eq.). La miscela di reazione si presenta di colore giallo, lascio in agitazione a temperatura ambiente per 12h. Al termine della reazione si riprende il grezzo con AcOEt, e si effettua un lavaggio con H₂O (1x100 mL), con NaHCO₃ ss (1x100 mL), con Brine (1x100 mL). La fase organica viene anidrificata (Na₂SO₄), filtrata e concentrata a pressione ridotta. Si ottiene il composto **10** (66 mg, resa 35%) chimicamente puro come solido bianco ed è utilizzato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

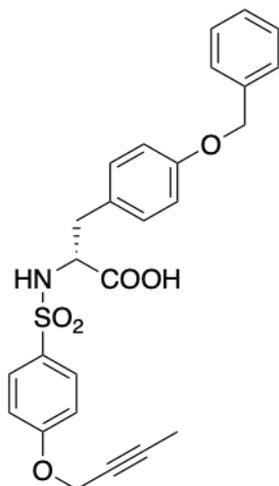
Ad una soluzione di 56 mg di **10** (0.125 mmol, 1 eq.) in Diossano (0.11 mL), si aggiungono in successione HCl 4N (2.25 mL), MeOH (1.16 mL). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 2h. Al termine si fa evaporare il solvente, e si esegue una triturazione con Et₂O. Si ottiene il prodotto **3** (35.2 mg, resa 38%) chimicamente puro come solido bianco.



PF: 234-237°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10.58 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 7.85 (m, 1H), 7.69 (m, 2H), 7.24 (t, J=7.2 Hz, 2H), 7.22-7.13 (m, 1H), 7.08-7.04 (m, 4H), 4.81 (d, J=2.4 Hz, 2H), 3.55 (m, 1H), 2.42-2.38 (m, 2H), 1.82 (t, J=2.4 Hz, 3H), 1.44-1.33 (m, 4H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ 162.8, 142.1, 134.2, 128.8, 128.6, 126.1, 115.3, 84.6, 74.6, 56.7, 54.1, 36.2, 32.6, 3.6. Analisi elementare (%) per C₂₁H₂₄N₂O₅S: C, 53.42; H, 5.83; N, 7.36.

4.5. Sintesi dell'acido (*R*)-3-(4-(benzilossi)fenil)-2-((4-(but-2-in-1-ossi)fenil)sulfonamide)propanoico (**11**) (Schema 2).

Ad una soluzione del solfonilcloruro **6** (150 mg, 0.65 mmol, 1 eq.) in acqua (2.58 mL) Diossano (0.86 mL) e Et₃N (0.18 mL, 1.3 mmol, 2 eq.) viene aggiunto l'H-D-Tyr(bzl)-OH (176.24 mg, 0.65 mmol, 1eq.). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione per 12h. Al termine della reazione, viene fatto evaporare il Diossano, quindi il grezzo è ripreso con una soluzione di NaOH 1N (1x100 mL) ed estratto con DCM (3x100 mL). La fase organica viene anidrificata (Na₂SO₄), filtrata e concentrata a pressione ridotta. Si ottiene il composto **11** (resa 45%) chimicamente puro come solido bianco.

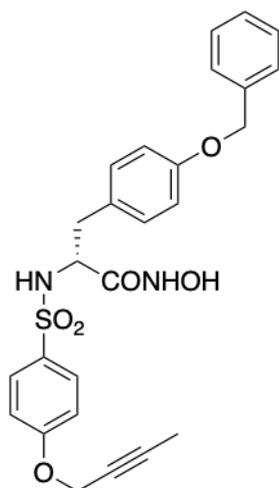


$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.64(m, 2H), 7.46-7.43 (m, 2H), 7.39 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.34-7.31 (m, 1H), 7.08 - 7.04 (m, 4H), 6.82-6.80 (m, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.82 (d, $J=2.04$ Hz, 2H), 3.16 (t, $J=11.2$ Hz, 1H), 2.97 (dd, $J_1=3.6$ Hz, $J_2=13.2$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J_1=5.2$ Hz, $J_2=13.3$ Hz, 2H), 1.84 (t, $J=2.4$ Hz, 2H)..

4.5.1 Sintesi dell'acido idrossamico (*R*)-3-(4-(benzilossi)fenil)-2-((4-(but-2-in-1-ilossi)fenil)sulfonamide)propanoico (**4**) (Schema 2).

Ad una soluzione di 136 mg di **11** (0.2923 mmol, 1 eq.) in DCM anidro (4.6 mL) sotto atmosfera di Ar, si aggiungono in successione TBDMSiONH₂ (43 mg, 0.2923 mmol, 1 eq.), EDC (84 mg, 0.4384 mmol, 1.5 eq.). La miscela di reazione si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 12h. Al termine della reazione si riprende il grezzo con DCM e si effettua un lavaggio con H₂O e DCM (3x250 mL). La fase organica viene anidrificata (Na₂SO₄), filtrata e concentrata a pressione ridotta. Si ottiene il composto **12** (41 mg, resa 23%) chimicamente puro come solido bianco utilizzato direttamente nella reazione successiva.

Ad una soluzione di **12** (41 mg, 0.07 mmol, 1 eq.) in DCM anidro (0.52 mL) viene aggiunto TFA (0.29 mL, 3.81 mmol, 57 eq.). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 1h. Al termine della reazione si fa co-evaporare il solvente per tre volte con DCM. Si effettua una purificazione del grezzo tramite Flash cromatografia utilizzando colonne pre-impaccate Isolute da 2 g (miscela eluente CHCl₃ 50: MeOH 1). Si ottiene il composto **4** (18,2 mg, resa 56,12%) chimicamente puro come solido bianco.



PF:176-178°C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.58 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.01 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.49-7.33 (m, 7H), 6.95 (dd, $J_1=2.4$ Hz, $J_2=6.8$ Hz, 4H), 6.79 (m, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.79 (d, $J=2.4$ Hz, 2H), 3.67 (q, $J=6.8$ Hz, 1H), 2.71 (dd, $J_1=6.2$ Hz, $J_2=13.6$ Hz, 1H), 2.51-2.48 (m, 1H) 1.81 (t, $J=2.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 167.5, 160.3, 157.4, 137.6, 134.0, 130.6, 129.5, 128.9, 128.6, 128.2, 128.1, 115.1, 114.7, 84.6, 74.6, 69.6, 56.7, 56.1, 38.0, 3.6. Analisi elementare (%) per $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$: C, 53.42; H, 5.84; N, 7.37.

4.6 Ottimizzazione della sintesi del derivato 15 tramite Reazione di Ullmann (Schema 3) in ILs

4.6.1 Sintesi del derivato 15 tramite reazione di Ullman in ILs condotta in condizioni standard

4.6.1 Tentativi R1-R6

Ad una sospensione di acido 2-iodofenilacetico (13) (150 mg, 0.56 mmol), 4-bromotiofenolo (14) (130 mg, 0.7 mmol), e l'opportuna base (0.7 mmol) in [BMIM]Br viene addizionato CuI (21 mg, 0.11 mmol). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione, alla temperatura di 120°C per 9/29 h. Al termine della reazione si effettua triturazione con Et₂O (10x20 mL).

4.6.2 Tentativi R7-R11

Ad una sospensione di acido 2-iodofenilacetico (13) (150 mg, 0.56 mmol), 4-bromotiofenolo (14) (130 mg, 0.7 mmol), K₂CO₃ (97 mg, 0.7 mmol) in 2.5mmol di [BMIM]Cl (composto 7) o [BMIM]Br (composto 8) viene addizionato CuI (21 mg, 0.11 mmol). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione, alla temperatura opportuna (100-150 °C) per 27/115 h. Al termine della reazione, la miscela viene porzionata in Et₂O (20 mL) e H₂O (20 mL), la fase acquosa viene trattata con HCl 1 N fino al raggiungimento di un pH=4 e successivamente estratta con Et₂O (5x2 mL). La fase organica viene anidrificata (Na₂CO₃) filtrata e concentrata a pressione ridotta.

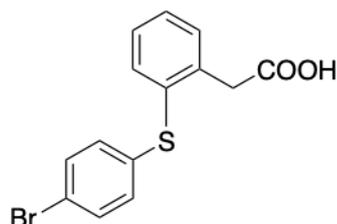
4.6.3 Tentativi R12-R13.

Ad una sospensione di acido 2-iodofenilacetico (13) (150 mg, 0.56 mmol), 4-bromotiofenolo (14) (130 mg, 0.7 mmol), K₂CO₃ (97 mg, 0.7 mmol) in 2.5mmol di [BMIM]Br viene addizionato CuI o polvere di Cu (0.11 mmol). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione, alla temperatura di 150 °C per 22 h. Al termine la miscela viene triturata in Et₂O/ n-esano, con ottenimento dell'acido carbossilico, come solido bianco (composto R12: 81% di resa; composto R13: 85% di resa).

4.7 Sintesi del derivato 15 tramite reazione di Ullman in ILs utilizzando tecnologia MW (R14-R16).

Ad una sospensione di acido 2-iodofenilacetico (13) (150 mg, 0.56 mmol), 4-bromotiofenolo (14) (130 mg, 0.7 mmol), K₂CO₃ (97 mg, 0.7 mmol) in di [BMIM]Br (547 mg, 2.5 mmol) viene addizionato CuI o polvere di Cu (0.11 mmol). La miscela di reazione viene posta in una vial

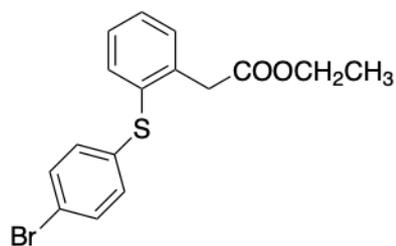
da MW, alla temperatura di 110-130°C per 25/40 min. Al termine della reazione, la miscela viene porzionata in Et₂O (20 mL) e H₂O (20 mL), la fase acquosa viene trattata con HCl 1 N fino al raggiungimento di un pH=4 e successivamente estratta con Et₂O (5x10 mL). La fase organica viene anidrificata (Na₂CO₃) filtrata e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato tramite triturazione in Et₂O/ n-esano, con ottenimento dell'acido carbossilico, come solido bianco (composto R14: 85% di resa; composto R15: 70% di resa).



¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 13.26 (bs, 1H), 7.91 (dd, J₁=7.7 Hz, J₂=1.5 Hz, 1H), 7.71-7.65 (m, 2H), 7.49-7.36 (m, 3H), 7.28-7.20 (m, 1H), 6.77 (d, J=7.3 Hz, 1H).

4.7 Sintesi di etil 2-(2-(4-Bromofenil)tio)fenil)acetato **16a** (Schema 3).

Ad una sospensione dell'acido 15 (250 mg, 0.773 mmol) in EtOH (1 mL), SOCl₂ (73.16 μL, 1.005 mmol) viene aggiunto goccia a goccia. La miscela di reazione è stata lasciata per 4 h, sotto reflusso. Al termine della reazione, il solvente viene rimosso a pressione ridotta. Il grezzo viene ripreso con H₂O, ed estratto con DCM (3x50 mL). Le fasi organiche vengono lavate con H₂O e Brine, anidificate (Na₂SO₄), filtrata e concentrata a pressione ridotta. Si effettua una purificazione cromatografica (n-esano/EtOAc 80:1) tramite Isolut Flash Si II, con ottenimento dell'estere **16a** come olio giallo (231.9 mg, resa 85%).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.31 (m, 6H), 7.29-7.24 (m, 2H), 7.03-7.00 (m, 2H), 4.08 (q, J=7.2Hz, 2H), 3.81 (s, 2H), 1.2 (t, J=7.2Hz, 3H).

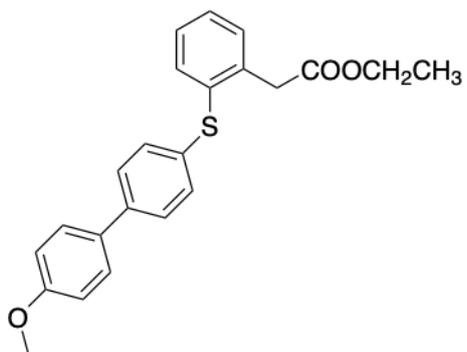
4.8 Ottimizzazione della sintesi del derivato 17a tramite reazione di cross-coupling Suzuki Miyaura (Schema 3).

4.8.1 Sintesi del derivato 17a tramite Suzuki cross coupling in ILs condotta in condizioni standard (R17-R18)

Ad una soluzione dell'opportuna aril-bromide (16a o 16b), acido 4-metossifenilboronico (24 mg, 0,16 mmol), Na₂CO₃ 2M (0.14 mL, 0.29 mmol), in [BMIM]BF₄ (1 mL, 5.35 mmol) viene aggiunto Pd(PPh₃)₄ (1.95 mg, 0.002 mmol). La miscela di reazione viene lasciata in agitazione, alla temperatura di 110°C per 36-48 h. Al termine della reazione, la miscela viene porzionata in Et₂O (5.0 mL) e H₂O (5.0 mL), la fase acquosa viene trattata con HCl 1N fino al raggiungimento di un pH=4 ed estratta con Et₂O (3x5 mL). La fase organica viene anidrificata (Na₂CO₃), filtrata ed evaporata. Il grezzo viene purificato tramite triturazione con n-esano, seguita da una purificazione cromatografica (per il 17a: 15:1 n-esano/EtOAc; per il 17b: 9:1 n-esano/EtOAc) con ottenimento dell'estere puro 17a (resa: 15%) o 17b (resa: 25%) come solido bianco.

4.8.2 Sintesi del derivato 17a tramite Suzuki cross coupling in ILs condotta tramite tecnologia MW (R18 e R20)

Ad una soluzione dell'opportuna aril-bromide (16a o 16b, 0.14 mL), acido 4-metossifenilboronico (24 mg, 0.16 mmol), Na₂CO₃ 2M (0.14 mL, 0.29 mmol), [BMIM]BF₄ (1 mL, 5.35 mmol) e Pd(PPh₃)₄ (1.95 mg, 0.002 mmol) è stata posta in una vial da MW a 110°C per 30 min. Al termine della reazione, la soluzione porzionata con Et₂O (5.0 mL) e H₂O (5.0 mL), la fase acquosa è stata trattata con HCl 1N fino al raggiungimento di un pH=4 ed estratta con Et₂O (3x5 mL). La fase organica è stata anidrificata (Na₂SO₄), filtrata e concentrata a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato tramite triturazione in n-esano con ottenimento dell'estere puro 17a (resa: 56%) o 17b (resa: 58%) come solido bianco.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.50-7.43 (m, 5H), 7.36-7.21 (m, 5H), 6.98-6.94 (m, 2H), 4.10 (q, J=7.2 Hz, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.21 (t, J=6.8 Hz, 3H).

5 Bibliografia

- ¹ Bonnas C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2014**;15(12):786-801.
- ² Shiomi T, Lemaitre V, D'Armiento J, Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol. Int.* **2010**; (60):477-96.
- ³ Tokito A, Jougasaki M. Matrix Metalloproteinases in Non-Neoplastic Disorders. *Int. Journal Mol. Sci.* **2016**; 17(7):1178.
- ⁴ Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **2003**; 92(8):827.
- ⁵ Kang Li, Franklin R. Tay, Cynthia Kar Yung Yiu. The past, present and future perspectives of matrix metalloproteinase inhibitors. *J. Pharm. Thera.* **2019**, 107465.
- ⁶ Pelmeshnikov V, Siegbahn P.E. Catalytic mechanism of matrix metalloproteinases: two-layered ONIOM study. *Inorg. Chem.* **2002**, 41(22):5659-66.
- ⁷ Gur P. Kaushal, Sudhir V. Shah. The new kids on the block: ADAMTSs, potentially multifunctional metalloproteinases of the ADAM family. *J. Clin. Invest.* **2000**, 105, 1335-1337.
- ⁸ Brewa K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Reseaech.* **2010**, 1803(1):55-71.
- ⁹ Nar H, Werle K. Crystal structure of human macrophage elastase (MMP-12) in complex with a hydroxamic acid inhibitor. *J. Mol. Biol.* **2001**, 312(4):743-51.
- ¹⁰ Molet S, Belleguic C, Lena H, Germain N, Bertrand C.P, Shapiro S.D, Planquois J, Delaval P, Lagente V. Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Inflamm. Res.* **2005**, 54, 31-36.
- ¹¹ Nam Hoon Cho, Kyi Pyo Hong, Sung Hui Hong, Suki Kang, Kyung Young Chung, Sang Ho Cho. MMP expression profiling in recurred stage IB lung cancer. *Oncogene.* **2004**, 23, 845-851.
- ¹² Nuti E, Panelli L, Casalini F, Avramova S.I, Orlandini E, Santamaria S, Nencetti S, Tuccinardi T, Martinelli A, Cercignani G, D'Amelio N, Maiocchi A, Uggeri F, Rossello A. Designin, synthesis, biological evaluation, and NMR studies of a new series of arylsulfones as a selective and potent matrix metalloproteinase 12 inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**; 52(20):6347-61.

-
- ¹³ Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research.*, **2006**, 69, 566-567.
- ¹⁴ Jacobsen J, Major J.J. To bind zinc or not to bind zinc: an examination of innovative approaches to improved metalloproteinase inhibition, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2010**, 1803(1):72-94.
- ¹⁵ Devel L, Rogakos V, David A, Makaritis A, Beau F. Development of Selective Inhibitors and Substrate of Matrix Metalloproteinase-12. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 11152-11160.
- ¹⁶ Rouanet-Mehouas C, Czarny B, Beau F, Cassar-Lajeunesse E, Stura E.A, Dive V, Devel L. Zinc–Metalloproteinase Inhibitors: Evaluation of the Complex Role Played by the Zinc-Binding Group on Potency and Selectivity. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 403-414.
- ¹⁷ Takeda S. ADAM and ADAMTS Family Proteins and Snake Venom Metalloproteinases: A Structural Overview. *Toxins (Basel)*. **2016**; 8(5). Pii: E155.
- ¹⁸ Reiss K, Saftig P. The “A Disintegrin and Metalloproteinase” ADAM family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Seminars Cell. Devel. Biol.* **2009**; 20:126-137.
- ¹⁹ Scholomann U, Wildeboer D, Webster A, Antropova O, Zeuschner D, Knight C.G, Docherty A.J.P, Lambert M, Skelton L, Jockusch H, Bartsch J.W. The Metalloprotease Disintegrin ADAM8: processing by autocatalysis is required for proteolytic activity and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277(50), 48210-48219.
- ²⁰ Howard L, Maciewicz R.A. Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem. J.* **2000**, 348(1), 21-27.
- ²¹ Seals DF, Courtneidge S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions, *Genes Dev.* **2003**; 17(1):7-30.
- ²² Camodeca C, Cuffaro D, Nuti E, Rossello A. ADAM metalloproteinases as potential drugs target. *Curr. Med. Chem.* **2019**;26(15):2661-2689.
- ²³ Wolfsberg T.G, Bazan J.F, Blobel C.P. The precursor region of protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: structural, functional, and evolutionary implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, 90(22), 10783-10787.
- ²⁴ Murphy G. The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Cancer.* **2008**;8(12):929.

-
- ²⁵ Joseph P, Toonen J.A. A Disintegrin and metalloproteinase10 (ADAM10) Regulates NOTCH Signaling during Early Retinal Development. *PLoS One*. **2016**; 11(5), 0156184.
- ²⁶ Yoshida S. Molecular cloning of cDNA encoding MS2 antigen, a novel cell surface antigen strongly expressed in murine monocytic lineage. *Int. Immunol.* **1990**, 2(6), 585-591.
- ²⁷ Koller G, Scholomann U. ADAM8/MS2/CD156, an Emerging Drug Target in the Treatment of Inflammatory and Invasive Pathologies. *Curr. Pharm. Des.* **2009**,15(20), 2272-2281.
- ²⁸ Amour A, Knight C.G. The enzymatic activity of ADAM8 and ADAM9 is not regulated by TIMPs. *FEBS Lett.* **2002**, 524(1-3), 154-158.
- ²⁹ Kelly K, Hutchinson G, Nebenius-Oosthuizen D, Smith A.J.H, Bartsch J.W. Metalloprotease-disintegrin ADAM8: Expression analysis and targeted deletion in mice; *Dev. Dyn.* **2005**, 232(1), 221-231.
- ³⁰ Knolle M.D, Owen C.A. ADAM8 a new therapeutic target for asthma. *Expert Opin. Ther. Targets.* **2009**, 13(5), 523-540.
- ³¹ Conrad C, Gotte M, Scholomann U. ADAM8 expression in breast cancer derived brain metastases: Functional implications on MMP-9 expression and transendothelial migration in breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* **2018**, 142, 779-791.
- ³² Dong F, Eibach M. The metalloprotease-disintegrin ADAM8 contributes to temozolomide chemoresistance and enhanced invasiveness of human glioblastoma cells. *Neuro. Oncol.* **2015**, 17, 1474-1485.
- ³³ Zhang W, Wan M. Protective effects of ADAM8 against cisplatin-mediated apoptosis in non-small-cell lung cancer. *Cell. Biol. Int.* **2013**, 37, 47-53.
- ³⁴ Hall T, Shieh H.S, Day J.E, Caspers N. Structure of human ADAM8 catalytic domain complex with batismat. *Acta Crystallogr. F.* **2012**, 68(6),616-621.
- ³⁵ Scholomann U, Koller G, Conrad C, Ferdous T, Golfi P, Molejon Garcia A, Höfling S, Parsons M, Costa P, Soper R, Bossard M, Hagemann T, Roshani R, Sewald N, Ketchem R.R, Moss L.M, Rasmussen F.H, Miller M.A, Lauffenburger D.A, Tuveson D.A, Nimsky C, Bartsch J.W. ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 6175.
- ³⁶ Nuti E, Casalini F, Avramova S.I. Potent arylsulfonamide inhibitors of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme able to reduce activate leukocyte cell adhesion molecule shedding in cancer cell models. *J. Med. Chem.* **2010**,53,2622-2635.
- ³⁷ Nuti E, Casalini F, Santamaria S. Selective arylsulfonamide inhibitors of ADAM17: hit optimization and activity in ovarian cancer cell models. *J. Med. Chem.* **2013**, 56,8089-8103.

-
- ³⁸ Schlomann U, Dorzweiler K, Nuti E, Tuccinardi T, Rossello A, Bartsch J.W. Metalloprotease inhibitor profiles of human ADAM8 in vitro and in cell-based assays. *Biol. Chem.* **2019**, 27;400(6):801-810.
- ³⁹ Ballini R. Eco Friendly Synthesis of Fine Chemicals, **2009**, 4,156.
- ⁴⁰ Holbrey J.D, Roger R.D. Green chemistry and ionic liquids: Synergies and ironies. *ACS Symp. Ser.* **2002**, 818, 2-14.
- ⁴¹ Freemantle M. Designer solvent-ionic liquids may boost clean technology development *Chem. Eng. News*, **1998**, 76: 32-37.
- ⁴² Wilkes J.S., Zaworotko M.J.J, *J. Chem. Soc., Chem Commun.*,**1999**, p. 956.
- ⁴³ Chiappe C, Pieraccini D. Ionic Liquidis: solvent properties and organic reactivity. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, 18:275-297.
- ⁴⁴ Sujatha A, Thomas A.M, Thankachan A.P, Anilkumar G. Recent avances in cooper-catalyzed C-S cross-coupling reactions. *ARKIVOC.* **2015**, (i) 1-28.
- ⁴⁵ Yunting Luo, Jeff Xin Wu, Rex X. Ren. Ullmann Diaryl Ether Synthesis in Ionic Liquids. *Synlett.* **2003**,11, 1734-173.
- ⁴⁶ Xin Lv, Zhiming Wang, Weiliang Bao. Cul catalyzed C-N bound forming reactions between aryl/heteroaryl bromides and imidazoles in [Bmim]BF₄. *Tetrahedon.* **2006**, 62, 4756-4761.
- ⁴⁷ Jiuxi Chen, Weike Su, Huayue Wu, Miaochang Liu and Can Jim. Eco friendly synthesis of 2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ones in ionic liquids or ionic liquid-water without additional catalyst. *Green Chem.* **2007**, 9, 972-975.
- ⁴⁸ Chanda K, Maiti B, Tseng C.C, Sun C.M. Microwave-assisted linear approach toward highly substituted benzo[d]oxal-5-yl-1H-benzo[d]imidazole on ionic liquid support. *ACS Comb Sci.*, **2012**, 14:115-123
- ⁴⁹ Valquiria P. Andrade, Mateus Mittersteiner, Mârcio M. Lobo. A comparative study using conventional methods, ionic liquids, microwave irradiation and combinations thereof for synthesis of 5-trifluoroacetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridines. *Thetraedron Letters.* **2018**, 59, 891-894.
- ⁵⁰ Zuli Y, Yang B, Lijun H, Hao C, Jintuan H, Jizheng L, Xinjuan F, Zihuan Y, Lei W, Jianping W. Expression of A disintegrin and metalloprotease 8 is associated with cell growth and poor survival in colorectal cancer. *BMC Cancer* **2014**, 14:568.

-
- ⁵¹ Chen J, Deng L, Dreytmüller D, Jiang X, Long J, Duan Y, Wang Y, Luo M, Lin F, Mao L, Müller B, Koller G, Bartsch J.W. A novel peptide ADAM8 inhibitor attenuates bronchial hyperresponsiveness and Th2 cytokine mediated inflammation of murine asthmatic models. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 30451.
- ⁵² Yim V, Noiser A, Hung KY, Bartsch J.W, Scholomann U, Brimble M.A. Synthesis and biological evaluation of analogues of the potent ADAM8 inhibitor cyclo(RLsKDK) for the treatment of inflammatory diseases and cancer metastasis. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 24(18):4032-4037.
- ⁵³ Hall T, Shieh H.S, Day J.E, Caspers N, Chrencik J.E, Williams J.M, Pegg L.E, Pauley A.M, Moon A.M, Krahn J.M, Fisher D.H, Kiefer J.R, Tomasselli A.G, Zack M.D. Structure of human ADAM8 catalytic domain complexed with batismat. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **2012**, 68(Pt 6):616-21.
- ⁵⁴ Jessop, P.G.; Leitner, W. *Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids*; Wiley-VCH, **2008**.
- ⁵⁵ Handbook of fluorine chemistry, 2nd ed.; Gladysz, J.A., Curran, D.P., Horváth, I.T., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
- ⁵⁶ Keim, W. Oligomerization of Ethylene to α -Olefins: Discovery and Development of the Shell Higher Olefin Process (SHOP). *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, 52, 12492-12496.
- ⁵⁷ (a) Angell, C. A., Byrne, N., Belieres, J. P. Parallel Developments in Aprotic and Protic Ionic Liquids: Physical Chemistry and Applications. *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 1228-1236; (b) Greaves, T.L., Drummond, C.J. Protic ionic liquids: properties and applications. *Chem. Rev.* **2008**, 108, 206–237.
- ⁵⁸ (a) Liu, L.; Stelmach, J. E.; Natarajan, S.R.; Chen, M.-H.; Singh, S.B.; Schwartz, C.D.; Fitzgerald, C.E.; O’Keefe, S.J.; Zaller, D.M.; Schmatz D.M.; Doherty, J.B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3979-3982; (b) De Martino, G.; Edler, M.C.; La Regina, G.; Cosuccia, A.; Barbera, M.C.; Barrow, D.; Nicholson, R.I.; Chiosis G.; Brancale, A.; Hamel, E.; Artico M.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 947-954.
- ⁵⁹ Nuti, E., Cuffaro, D., Bernardini, E., Camodeca, C., Panelli, L., Chaves, S., Ciccone, L., Tepshi, L., Vera, L., Orlandini, E., Nencetti, S., Stura, E.A., Santos, M.A., Dive, V., Rossello, A. Development of Thioaryl-Based Matrix Metalloproteinase-12 Inhibitors with Alternative Zinc-Binding Groups: Synthesis, Potentiometric, NMR, and Crystallographic Studies. *J. Med. Chem.* **2018**, 61, 4421-4435.

-
- ⁶⁰ Hooshmand, S.E.; Heidari, B.; Sedghi, R.; Varma, R.S. *Green Chem.* **2019**, *21*, 381-405.
- ⁶¹ Cuffaro D, D'Andrea F, Mezzetta A, Guazzelli L, Chiappe C, Nuti E, Rossello A. Ionic liquid-promoted green synthesis of biologically relevant dyaril thioethers. *Green Chemistry Letters and Reviews.* **2020**, *13*:4,31-38.
- ⁶² Kondo, T., Mitsudo, T.A., Metal-catalyzed carbon-sulfur bond formation. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3205-3220.
- ⁶³ Mezzetta, A., Poderelli, L., D'Andrea, F., Pomelli, C.S., Chiappe, C., Guazzelli L. Unexpected Intrinsic Lability of Thiol-Functionalized Carboxylate Imidazolium Ionic Liquids. *Molecules* **2019**, *24*, 3571;
- ⁶⁴ Li, J., Yang, S., Wu, W., Jiang, H. Recent Advances in Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reaction in Ionic Liquids. *Eur. J. Org. Chem.*, **2018**, 1284-1306.
- ⁶⁵ Matthews, C., Smith, P.J., Welton, T. Palladium catalysed Suzuki cross-coupling reactions in ambient temperature ionic liquids. *Chem Commun.*, **2000**, 1249-1250.