



Alberto Minassi
Università del Piemonte Orientale - DiSCAFF
albertominassi@pharm.unipmn.it

LE SFIDE AI PRODOTTI NATURALI BIOATTIVI

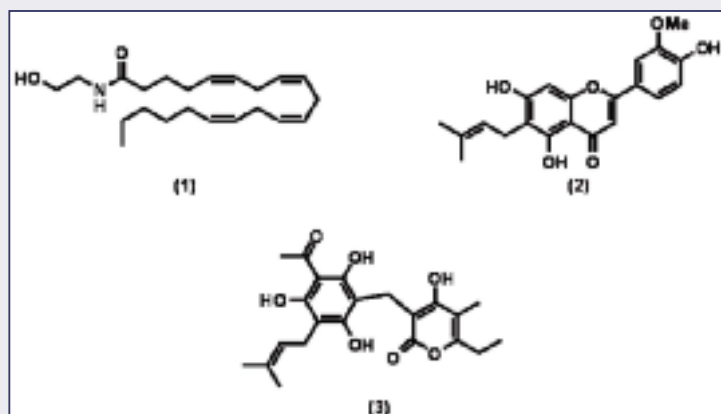
I composti naturali sono una fonte inesauribile di idee per la scoperta di nuovi farmaci per la cura delle malattie e rappresentano le sfide che i chimici, siano essi organici o farmaceutici, devono affrontare per scoprire nuovi “leads”.

Fin dall'antichità, i prodotti naturali sono stati alla base della medicina tradizionale con documenti che descrivono l'utilizzo di circa mille preparati di piante per la cura di vari disturbi e malattie in documenti datati dal 2900 al 2600 a.C. [1]. Ancora oggi i prodotti naturali contribuiscono in maniera determinante alla scoperta ed allo sviluppo di nuovi farmaci: si stima che circa il 40% di tutti i medicinali presenti sul mercato derivino direttamente o indirettamente da fonti naturali [2]. Generalmente, un composto naturale presenta attività biologica su uno o più importanti bersagli molecolari, ma porta con sé alcuni aspetti negativi come un'elevata complessità strutturale, bassa biodisponibilità e, talvolta, una difficile reperibilità della fonte naturale, soprattutto per i composti marini.

I prodotti naturali rappresentano quindi una sfida sia per i chimici farmaceutici che per i chimici organici, costituendo una sorta di pista d'atletica dove sfidare e superare i limiti che la natura ci impone. Semplificando, si può immaginare il chimico farmaceutico come un saltatore in alto all'inizio

di una gara: come l'atleta parte da un'altezza di entrata, così il chimico farmaceutico parte da certe caratteristiche del prodotto naturale, che cercherà di modificare e migliorare applicando nuove tecniche e metodologie per arrivare a quello che può essere un nuovo record: l'ottenimento di una molecola più attiva, più biodisponibile o con una struttura semplificata in grado comunque di mantenere l'attività biologica. Il chimico organico quando affronta la sintesi totale di un composto naturale può invece essere immaginato come un corridore al via di un “3000 siepi”: una gara lunga in cui dovrà superare ostacoli diversi. Con la scoperta e l'applicazione di nuove tecniche e nuove metodologie sintetiche, il chimico organico cercherà di velocizzare e accorciare il suo “3000 siepi” trasformandolo, se non in uno sprint da “100 metri”, almeno in un “200 metri”, evitando però che degeneri in una maratona.

Le sfide da noi affrontate hanno come protagoniste tre molecole naturali, anandamide (AEA) (1), cannflavina B (2) ed arzanolo (3), in grado



Schema 1

di interagire con importanti sistemi recettoriali (Schema 1).

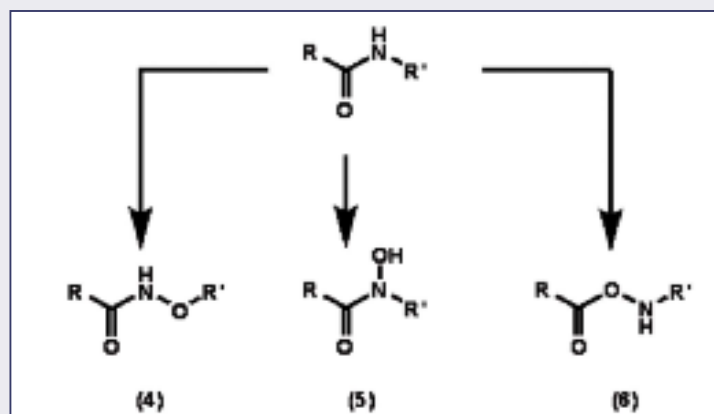
Abbiamo affrontato lo studio di queste molecole da punti di vista diversi: l'anandamide (1) da un punto di vista farmaceutico, mentre arzanolo (3) e cannflavina B (2) da un punto di vista prettamente sintetico.

Anandamide

L'anandamide (1) è grado di interagire con due sistemi recettoriali diversi che vengono ormai considerati come facce diverse di una stessa medaglia: il sistema endocannabinoide e quello vanilloide. Il sistema dei cannabinoidi è noto soprattutto per la sua attivazione "a livello ricreazionale", grazie alla marijuana ed al Δ^9 -THC, il suo composto meglio noto, ed è formato da due isoforme recettoriali denominate CB1 [3] e CB2 [4]. Questi sono recettori metabotropici legati a proteine G di membrana, clonati agli inizi degli anni Novanta e diffusi in modo ubiquitario nell'organismo. Subito dopo la scoperta dei recettori, nel 1992 è stato identificato il primo ligando endogeno: l'anandamide (1) [5]. Il CB1 è espresso principalmente nei neuroni, sia del sistema nervoso centrale che periferico, mentre il CB2 è espresso a livello del sistema immunitario e nelle immunocellule di tipo B. L'attivazione del CB1, porta ad effetti sulla psiche simili a quelli indotti dalla marijuana, al contrario la modulazione del CB2 è utile per il trattamento del dolore neuropatico, per il controllo dell'infiammazione e per il trattamento dell'osteoporosi, rendendo il CB2 un bersaglio importante per la scoperta di nuovi farmaci [6]. Il recettore dei vanilloidi è invece un canale ionico non selettivo, con una

maggior affinità per gli ioni bivalenti, in particolare per il calcio, formata da 6 domini trans-membrana con il canale posto fra il quinto ed il sesto dominio ed il sito di riconoscimento di liganti intracellulare. È attivato da stimoli chimici, fisici e termici ed il primo e più famoso agonista di questo recettore è la capsaicina (CPS) il principio pungente del peperoncino. Il sistema dei vanilloidi è regolato da quello dei cannabinoidi sia per azione diretta dell'anandamide sul TRPV1, sia in modo indiretto con il legame dell'anandamide al CB1.

Il TRPV1 è presente a livello periferico nel sistema nocicettivo sensoriale ed è coinvolto nel trattamento del dolore neuropatico e cronico, con minori effetti



Schema 2

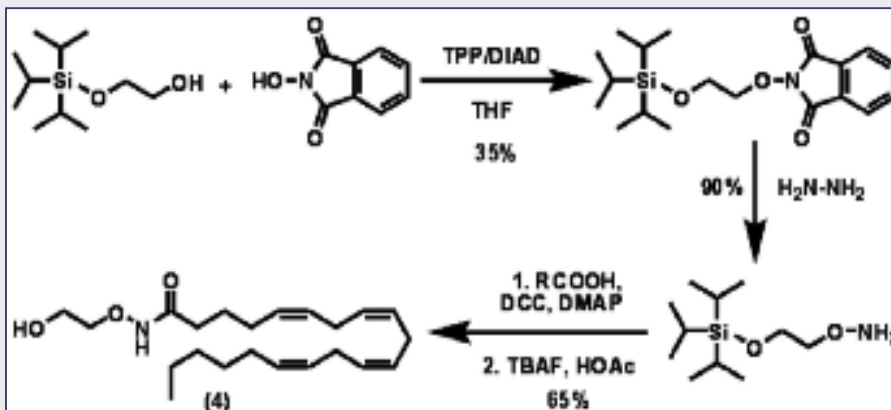
collaterali poiché l'azione è a livello periferico e non interviene sul SNC. L'anadamide (1) è un composto strutturalmente semplice formato da due parti: una testa polare etanol-amminica coniugata ad una coda acilica poli-insatura apolare, attraverso un legame ammidico. Gli studi si sono concentrati dapprima sul legame ammidico e in seconda battuta sulla coda etanol amminica.

Diversamente dai neuromediatori, i coniugati ammidici degli acidi grassi non sono accumulati nel cervello, ma sono sintetizzati a richiesta e rapidamente inattivati per idrolisi enzimatica ad opera della FAAH, un'ammidasi serinica ad ampia tolleranza di substrato. Per aumentare la stabilità biologica delle endoammidi, sono stati perseguiti vari approcci, principalmente basati sull'aumento dell'ingombro sterico intorno al carbonile ammidico.

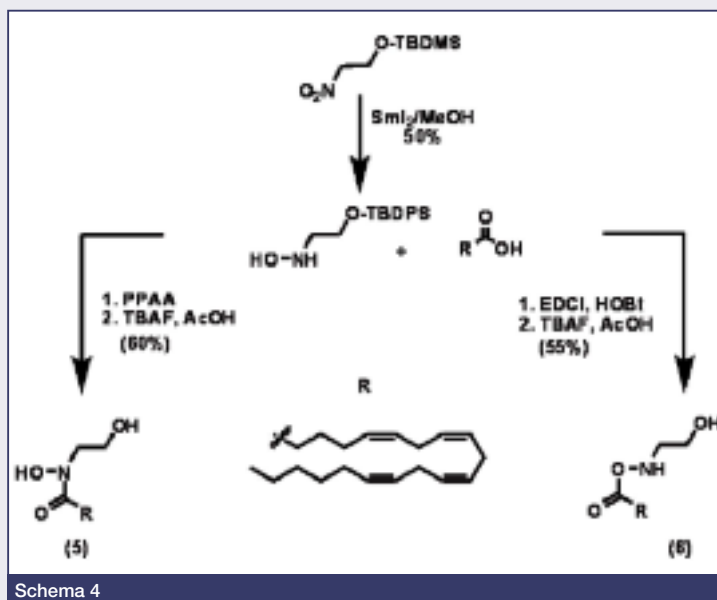
Per questo studio si è seguito un approccio diverso basato sull'ossimologazione del legame ammidico.

In base a pure considerazioni di topologia, sono possibili tre ossimologazioni di un legame ammidico *N*-alchil sostituito. L'ossigeno può essere infatti inserito fra il gruppo *N*-alchilico e l'azoto ammidico (4), sull'azoto ammidico (5), o fra l'azoto ammidico ed il carbonile acilico (6) (Schema 2).

La sintesi delle *N*-acilidrossilammine (4) è semplice, dato che l'acilazione delle *O*-alchilidrossilammine non pone problemi di selettività. Le *O*-alchilidrossilammine si preparano a loro volta in modo generale, per alchilazione di Mitsunobu di *N*-OH-immidi (Schema 3).



Schema 3



La sintesi delle *N*-idrossiammidi (5) e delle *O*-acilidrossilammine (6) è invece complicata da problemi di regiochimica.

L'analisi retrosintetica per la sintesi di questi derivati può prevedere due approcci: uno alchilativo con alchilazione chemo e regioselettiva di un acido idrossamico, ed un approccio acilativo con acilazione chemoselettiva di una *N*-alchil idrossilammina.

Lo studio della letteratura, in particolare del lavoro svolto dal gruppo di Leggio, ha permesso di scartare l'approccio alchilativo in favore di quello acilativo.

La reazione tra l'*N*-idrossietanolammina protetta e l'acido arachidonico, in presenza di EDCI ed HOBT ha fornito esclusivamente il prodotto di *O*-acilazione, mentre il trattamento con PPAA, un'anidride fosfonica mista, ha fornito esclusivamente il prodotto di *N*-acilazione. La deprotezione finale non ha dato problemi, ottenendo i due ossimologi mancanti dell'anandamide (Schema 4).

Tutti i prodotti sintetizzati si sono rivelati metabolicamente resistenti, ma l'unico derivato attivo è risultato essere il prodotto (4) che ha mostrato una buona selettività fra CB1 e CB2 con un'attività nano molare sul CB2 [7].

Terminati gli studi sulla componente ammidica, la nostra attenzione si è rivolta verso la testa polare della molecola. Il recettore dei vanilloidi e quelli dei cannabinoidi non sono strutturalmente correlati e presentano siti di legame differenti. Si può assumere che la promiscuità d'azione dell'anandamide sia dovuta all'elevata flessibilità conformazionale della coda polare, che permette alla molecola di adattarsi ai diversi siti di legame delle proteine target.

Questo è stato lo spunto per la sintesi di derivati bloccati conformazionalmente, con l'inserimento di un ponte metilenico, in modo da valutare l'importanza della posizione dell'ossidrilco alcolico nel legame coi

vari sistemi recettoriali. Infatti, mentre gli endocannabinoidi e gli endovanilloidi sono achirali, il THC ed altri potenti derivati sintetici interagiscono col CB1 ed il CB2 in maniera enantioselettiva.

Le ciclopropanammidi racemiche sono state ottenute partendo dal derivato commerciale *N*-ftaloilamminoaldeide trasformato in sillenol etere in miscela 1:1 di isomeri *cis/trans*, facilmente separabili per via cromatografica. Entrambi i sillenol eteri sono stati sottoposti parallelamente a ciclopropanazione di Simmon-Smith stereoselettiva, quindi deprotetti selettivamente sull'ammina in presenza di idrazina. Le ammine libere sono state acilate con acido arachidonico ed i derivati sono stati deprotetti all'ossidrilco alcolico con TBAF in ambiente tamponato (Schema 5).

Le miscele racemiche così ottenute sono state risolte con HPLC chirale e la configurazione assoluta assegnata via metodo di Mosher. I prodotti enantiopuri sono stati testati su saggi di binding per i recettori dei cannabinoidi e dei vanilloidi.

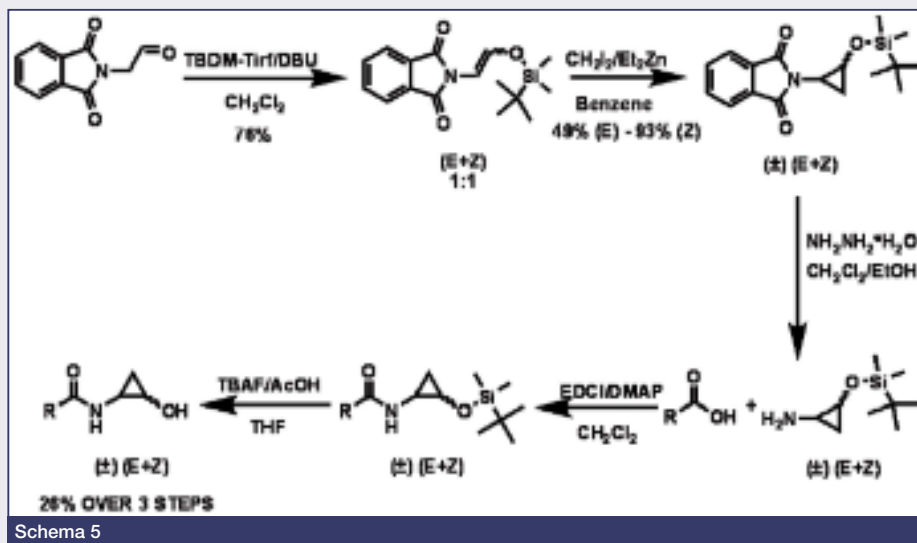
Dai risultati ottenuti, la posizione dell'ossidrilco non risulta essere fondamentale per il legame con il CB1 ed il CB2: i derivati ciclopropanati enantiopuri presentano infatti un'attività simile fra loro e di pari grado rispetto all'anandamide, evidenziando come per i recettori dei cannabinoidi il gruppo alcolico sia ridondante.

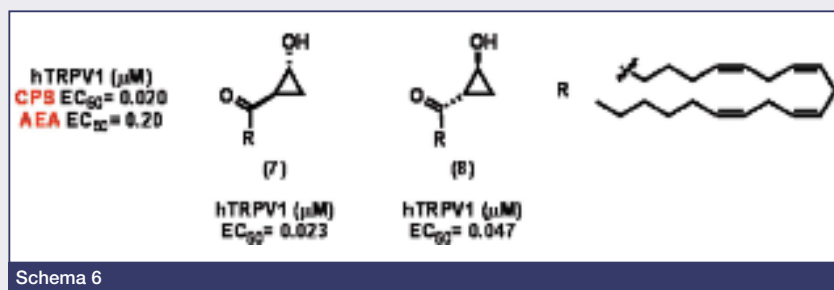
Risultati differenti sono stati ottenuti nei saggi sul recettore dei vanilloidi: i derivati *trans* sono risultati molto più attivi dei corrispettivi *cis*, evidenziando una certa dipendenza diastereomerica del recettore TRPV1, in particolare il composto (7) presenta un EC50 pari a quella della CPS, l'agomista naturale del sistema dei vanilloidi [8] (Schema 6).

Gli studi sull'anandamide hanno fornito importanti informazioni su due sistemi recettoriali implicati in molteplici processi biologici. Informazioni che potrebbero essere utilizzate per la progettazione e la sintesi di nuovi prototipi (leads).

Cannflavina B

Gli estratti di alcune varietà di *Cannabis* sono ricchi in derivati polifenolici con diverse proprietà biologiche, tra questi composti i più importanti sono le cannflavine A e B, responsabili delle proprietà COX-inibitrici degli estratti





ti di questa pianta. Le due cannflavine sono 30 volte più potenti dell'acido acetil-salicilico come inibitori della COX1 [9]. L'attività biologica e le ridotte quantità ottenibili per isolamento hanno ispirato la messa a punto di una via sintetica originale e complementare, che potesse non solo portare all'ottenimento della cannflavina B (2) e del suo derivato non naturale isocannflavina B (9), ma che potesse essere anche utile per la sintesi di altri derivati flavonoidici.

Dal punto di vista retro-sintetico è stato identificato come prodotto commerciale di partenza il 2,4,6-triidrossi-acetofenone. La via sintetica messa a punto prevede l'ottenimento di due acetofenoni prenilati complementari, come intermedi chiave per l'ottenimento del prodotto naturale e dell'isomero non naturale.

I due acetofenoni complementari (10) e (11) sono stati sottoposti alla reazione Baker-Venktraman in presenza di NaH e del cloruro dell'acido vanillico protetto come pivaloile, a dare i derivati 1,3-dicarbonilici (12) e (13) (Schema 7).

Per la ciclizzazione a flavoni sono stati testati diversi acidi di Lewis, in alternativa a quelli di Brønsted normalmente utilizzati per questo tipo di reazioni. Tra i vari acidi provati, alcuni sono risultati inattivi ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), altri hanno portato a degradazione completa del prodotto (BF_3 , BBr_3 , Eu(fod)_3), altri ancora hanno fornito una miscela equimolare di 7-TBDMS-4'-pivaloil cannflavina B, isocannflavina B (9) e i loro derivati 7-desillati. Sono stati inoltre isolati i piranileteri derivanti dalla ciclizzazione del gruppo prenilico con l'ossidril in posizione 7.

L'analisi dei prodotti ottenuti ha evidenziato come la rimozione dei gruppi protettori in orto (pivaloile e TBDMS) sia molto più veloce della ciclizzazione; inoltre la deprotezione risulta irreversibile al contrario della ciclizzazione che è una reazione di equilibrio. Questi fattori spiegano quindi la formazione di miscele equimolari di 7-TBDMS-4'-pivaloil cannflavina B, isocannflavina B (9). Il fattore che influisce sull'equilibrio della reazione di ciclizzazione è, presumibilmente, la rimozione dell'acqua; l'aggiunta di TMS-Cl come agente disidratante al CuCl_2 è risultato il miglior compromesso nella studio delle condizioni di reazione. Con questo sistema il composto (12) ha fornito una miscela di 7-TBDMS-4'-pivaloil cannflavina B (2) ed isocannflavina B (9) in rapporto 5:1, che dopo deprotezione ha fornito la cannflavina B (2). Il derivato (13) è stato ciclizzato selettivamente e dopo deprotezione ha dato l'isocannflavina B (9) [10].

Concludendo è stata messa a punto una sintesi regio-divergente di prenilflavoni, basata sull'ottenimento di una coppia di acetofenoni complementari che potrebbero essere utilizzati, anche per la sintesi di altri derivati flavonoidici.

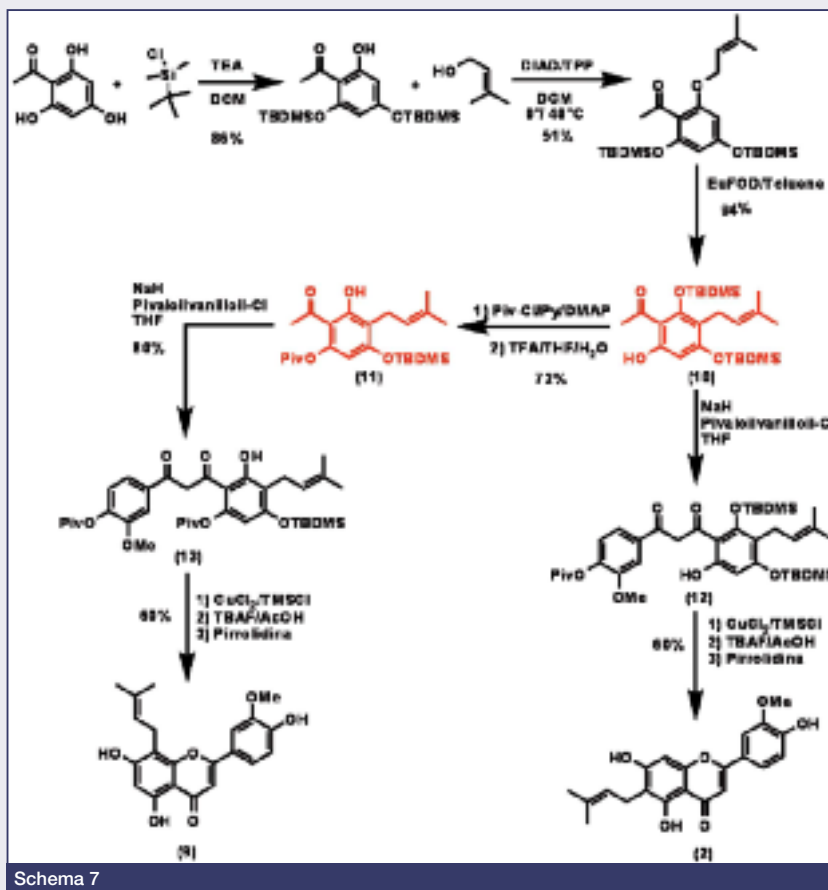
Arzanolo

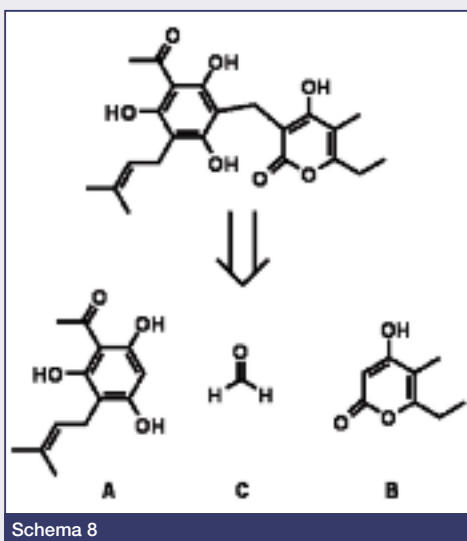
L'*Helychrysum Italicum* è una delle piante medicinali più note dell'area mediterranea. Era già usato sia dai Greci che dai romani come pianta antinfiammatoria. I suoi metaboliti

secondari sono stati caratterizzati qualche anno fa, e l'arzanolo (3) si è rivelato il composto più interessante sia da un punto di vista biologico che chimico [11].

L'arzanolo (3) ha mostrato un'azione antiossidante in tutti i saggi cellulari a cui è stato sottoposto, in particolare nell'inibizione della perossidazione lipidica, dell'ossidazione termica del colesterolo e nell'inibizione del danno ossidativo indotto da tert-butildroperossido. La sua attività infiammatoria è notevole, essendo in grado di agire sia a livello dei fattori di trascrizione (NfKb) che a livello della mPGE2 sintasi. Accanto alle ottime caratteristiche biologiche, l'arzanolo (3) presenta alcuni aspetti negativi: come la difficoltà nell'isolamento e la scarsa reattività verso le modifiche chimiche. L'insieme di questi aspetti hanno ispirato un progetto per la sua sintesi totale.

In natura sono conosciuti molti composti a struttura dimerica, sia omo che etero dimeri, collegati da un ponte metilenico. Alcuni di questi presentano importanti proprietà biologiche, come ad esempio il dicumarolo, l'arche-





vece ricevuto una scarsa attenzione nonostante potessero svolgere un ruolo importante nella SAR dei derivati omodimerici.

Da un punto di vista strutturale l'arzanolo (3) può essere diviso in tre componenti principali: a) una componente aromatica prenilata elettronicamente, b) una componente 1,3-dicarbonilica e c) il ponte metilenico di raccordo (Schema 8).

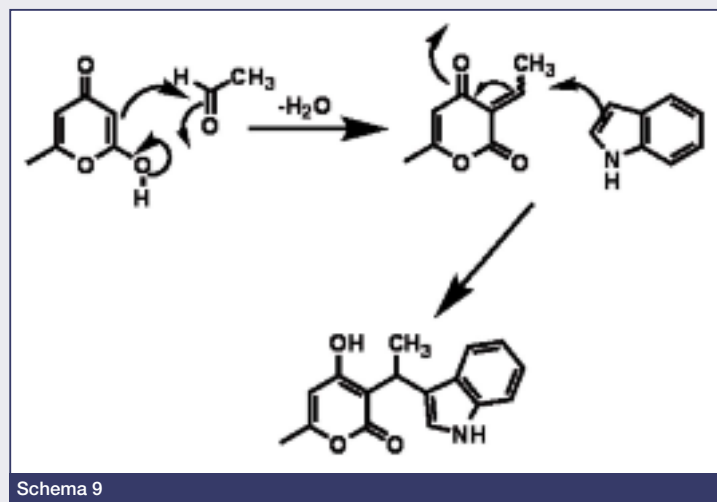
Per la sintesi è stata pensata una reazione multicomponente biomimetica versatile che vedesse la contemporanea partecipazione di tutte e tre le componenti nel sistema di reazione. Lo spunto è stato suggerito dalla reazione multicomponente tra il pirone dell'acido deidroacetico, l'indolo e l'acetaldeide che in cloroformio forniscono come prodotto principale il derivato eterodimerico in buona resa. La selettività della reazione verso la formazione del prodotto eterodimero risiede nella complementarietà elettronica degli attori. L'aldeide, un elettrofilo hard, è attaccata dalla componente 1,3-dicarbonilica, un nucleofilo hard, a dare un derivato chinon-metidico, un elettrofilo soft, intrappolato dall'indolo, un nucleofilo soft [13] (Schema 9).

tipo dei moderni anti-coagulanti, ed il bis-indolimetano (BIM), un agente chemopreventivo estratto da piante della famiglia delle crucifere. Mentre la sintesi di omodimeri basata sulla condensazione tra aldeidi con nucleofili al carbonio elettron ricchi è stata utilizzata da Hanschutz fin dal 1909 [12], i derivati eterodimerici (β -dicarbonil) arilmetani hanno invece

La reazione tra il triidrossi-acetofenone prenilato, la paraformaldeide ed il pirone dell'elicriso nelle condizioni di letteratura, ha fornito come unico prodotto l'omodimero pirone-pirone lasciando inalterata la componente aromatica probabilmente non sufficientemente attivata per intrappolare il derivato chinon-metidico. Tra le varie possibili strategie di attivazione quella con acidi è stata scartata per la sensibilità del gruppo prenilico, mentre quella con basi non ha dato nessun risultato. La soluzione è stata infine l'utilizzo della attivazione fluorosa di derivati acetofenonici siliati. La via sintetica sviluppata, ancora in corso di ottimizzazione, ha fornito una via d'accesso concettualmente semplice al prodotto naturale, applicabile anche alla sintesi di analoghi per lo studio delle relazioni struttura attività.

Conclusioni

I composti naturali rappresentano uno stimolo ad "andare oltre" sia per il chimico farmaceutico, che applica questo concetto alle proprietà biologiche, sia per il chimico di sintesi, che invece lo coniuga in senso di metodologico, e gli esempi che ho descritto, nella loro relativa semplicità, esemplificano questi concetti.



Bibliografia

- [1] P.A.G.M. De Smet, *Drugs*, 1997, **54**, 801.
- [2] M. Blumethal, *Heral. gram.*, 1999, **45**, 67.
- [3] L.A. Matsuda, S.J. Lolait, *Nature*, 1990, **346**, 561.
- [4] S. Munro, K.L. Thomas, *Nature*, 1993, **365**, 61.
- [5] W.A. Devane et al., *Science*, 1992, **258**, 1946.
- [6] W. Karin et al., *Curr. Top. Med. Chem.*, 2008, **8**, 173.
- [7] G. Appendino et al., *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 2333.
- [8] G. Appendino et al., *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 3001.
- [9] M.L. Barret et al., *Biochem. Pharmacol.*, 1985, **34**, 2019.
- [10] A. Minassi et al., *Org. Lett.*, 2008, **10**, 2267.
- [11] G. Appendino et al., *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, 608; b) A. Rosa et al., *Chem. Biol. Interact.*, 2007, **165**, 177.
- [12] R. Hanschutz, *Liebigs Ann. Chem.*, 1909, **367**, 169.
- [13] G. Appendino et al., *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 5559.

RIASSUNTO

Challenges to Bioactive Natural Products

The natural compounds are an endless source of ideas for the discovery of new drugs to treat diseases and they represent a challenge faced by the chemists, both organic and medicinal, to discover new "leads". The chemist who studies natural products is as an athlete at the beginning of a race in search of a new record. Herein we report some challenges faced by studying anandamide, arzanol and cannflavin B.