

UNIVERSITÀ DI PISA



DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea specialistica in Farmacia

I carbammati organici nel *drug design*

Candidato:

Francesco Barbieri

Relatori:

Prof.ssa Sabrina Taliani

Dott.ssa Silvia Salerno

Anno Accademico 2015-2016

INDICE

| | <i>Pag</i> |
|--|------------|
| <i>Introduzione</i> | 1 |
| <i>Carbammati: Applicazioni, Chimica e stabilità metabolica</i> | 3 |
| <i>Metodi per la sintesi di carbammati</i> | 9 |
| - <i>Mediante Metodo tradizionale</i> | 9 |
| - <i>Attraverso carbammati attivati</i> | 11 |
| - <i>Metodologie recenti</i> | 18 |
| <i>Carbammati con potenziale clinico</i> | 42 |
| - <i>Vari carbammati con rilevanza clinica</i> | 42 |
| - <i>Carbammati terapeutici quali inibitori della proteasi dell'HIV</i> | 47 |
| <i>Profarmaci carbammici e loro metabolismo</i> | 50 |
| - <i>Profarmaci carbammici di alcol e fenoli</i> | 51 |
| - <i>Profarmaci carbammici di ammine e ammidine</i> | 56 |
| <i>Derivati eterociclici carbammici inibitori dell'HIV-1 proteasi</i> | 59 |
| <i>Carbammati inibitori della β e γ secretasi</i> | 68 |
| - <i>Sviluppo di inibitori della β-secretasi</i> | 68 |
| - <i>Sviluppo di inibitori della γ-secretasi</i> | 75 |
| <i>Carbammati per la terapia dell'HCV</i> | 78 |
| - <i>Derivati carbammici inibitori della serina proteasi</i> | 78 |
| - <i>Inibitori HCV NS5A</i> | 85 |
| <i>Carbammati inibitori della cisteina proteasi</i> | 87 |
| <i>Carbammati inibitori degli enzimi metabolici degli endocannabinoidi</i> | 90 |
| <i>Conclusioni</i> | 94 |
| <i>Bibliografia</i> | 95 |

1. INTRODUZIONE

Le molecole con funzione carbammica svolgono un ruolo importante nel *Drug Discovery* ed in *Medicinal Chemistry*. I carbammati (o uretani) sono elementi strutturali di molti agenti terapeutici approvati. Strutturalmente la funzionalità carbammica è un ibrido che possiede le caratteristiche proprie dell'ammide-estere e in generale questi composti mostrano una buona stabilità chimica e proteolitica.

I carbammati sono ampiamente utilizzati come sostituti del legame peptidico in chimica farmaceutica. Questo è principalmente dovuto alla loro stabilità chimica e alla capacità di permeare le membrane cellulari. Un'altra caratteristica unica dei carbammati è la loro capacità di modulare le interazioni inter- e intramolecolari con gli enzimi o con i recettori bersaglio. La funzionalità dei carbammati impone un grado di restrizione conformazionale, a causa della delocalizzazione elettronica del doppietto sull'azoto nella funzione carbossilica. Inoltre, la funzione carbammica è capace di formare legami a idrogeno attraverso sia il gruppo carbossilico che il gruppo amminico NH.

Quindi le sostituzioni sull'ossigeno o sull'azoto del carbammato offrono opportunità di modulare le proprietà biologiche e di migliorare la stabilità e le proprietà farmacocinetiche.

I carbammati sono stati utilizzati nella progettazione di profarmaci per ottenere una maggiore stabilità al metabolismo di primo passaggio ed incrementare la stabilità idrolitica sistemica.

I derivati carbammici si ritrovano ampiamente nei prodotti chimici agricoli, come pesticidi, fungicidi ed erbicidi. Svolgono un ruolo importante nella chimica e nell'industria delle vernici come materiali di partenza, intermedi e solventi. Inoltre, i carbammati svolgono un ruolo molto importante come gruppi protettivi di ammine e amminoacidi in sintesi organica.

Recentemente, i derivati carbammici hanno ricevuto molta attenzione per la loro applicazione nel *Drug Design e Discovery*.

In questa tesi verrà fornita una panoramica riguardante il ruolo principale dei carbammati in *Medicinal Chemistry*, con particolare attenzione agli effetti

terapeutici e all'utilizzo nei profarmaci.

In questo contesto saranno riportate le metodologie chimiche adottate per la sintesi dei derivati carbammici. Inoltre, saranno riportati le progettazioni di carbammati, inclusi gli eterociclici carbammici, quale alternativa al legame ammidico, che hanno condotto ad un'ampia gamma di nuovi carbammati organici, potenti inibitori di HIV-1 proteasi, β -secretasi, serina e cisteina proteasi.

Queste informazioni potranno essere utili per la progettazione futura di carbammati organici quali farmaci e profarmaci.⁽¹⁾

2. CARBAMMATI: APPLICAZIONI, CHIMICA E STABILITÀ METABOLICA

Le molecole di natura peptidica sono un importante punto di partenza per la scoperta di nuovi farmaci, soprattutto per la progettazione degli inibitori enzimatici. A causa della loro elevata affinità e specificità verso le funzioni biologiche, questo tipo di molecole servono anche come prezioso strumento di ricerca. Tuttavia, la scarsa stabilità *in vivo*, le proprietà farmacocinetiche insufficienti e la bassa biodisponibilità hanno in genere limitato il loro ampio utilizzo.

E' stata stata sviluppata una gamma di peptidomimetici al fine di migliorare le caratteristiche *drug-like*, incrementare la potenza, la specificità verso il bersaglio, e la durata d'azione.⁽²⁾

A tal fine, diverse classi di peptidomimetici sono stati modificati sostituendo i legame peptidici nativi con gruppi quali⁽³⁾ la retro-ammide, l'urea, i carbammati e eterocicli di varia natura. Queste funzionalità conferiscono una maggiore resistenza alle aminopeptidasi, enzimi coinvolti nel metabolismo del legame peptidico dei farmaci.

Il ruolo emergente dei carbammati in *Medicinal Chemistry* è dovuto anche alla loro stabilità chimica e alla loro capacità di aumentare la permeabilità attraverso le membrane cellulari. Queste loro caratteristiche sono state sfruttate nella progettazione di farmaci. Come risultato, la funzione carbammica sta diventando un gruppo privilegiato come sostituto del legame peptidico.

Altri usi dei carbammati sono ben noti. In particolare vengono impiegati in varie industrie come quella agrochimica, in quella dei polimeri e anche nella sintesi dei peptidi.⁽⁴⁾

Inoltre, tra i vari gruppi protettivi delle ammine, i carbammati sono usati per aumentare la loro stabilità chimica verso gli acidi, le basi e l'idrogenazione.

Una caratteristica importante dei carbammati è rappresentata dalla risonanza della parte ammidica. Questa risonanza è stata studiata nel dettaglio attraverso una metodologia sia teorica che sperimentale stimando il grado di rotazione del legame C-N.⁽⁵⁾ A livello energetico, la risonanza del carbammato è 3-4 kcal mol⁻¹,

minore rispetto a quella dell'ammide a causa dell'ingombro sterico dovuto alla presenza dell'atomo di ossigeno nel carbammato. Ci sono tre possibili strutture di risonanza che contribuiscono alla stabilità del carbammato (A, B e C, figura 1).

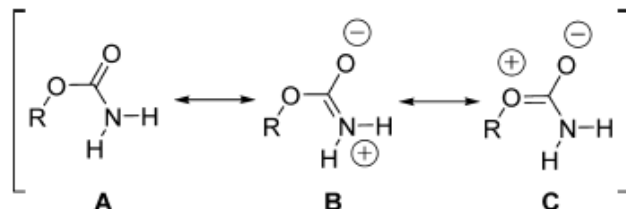


Figura 1. Possibili strutture di risonanza della funzione carbammica.

Il dominio carbammico è caratterizzato da pseudo doppi legami. Questo implica la presenza di legami σ e legami π tra il C e gli eteroatomi, e questo porta ad una limitazione della libera rotazione rispetto ad un legame singolo σ .

Quindi nel carbammato sono presenti due forme isomeriche *syn* e *anti* (Figura 2).

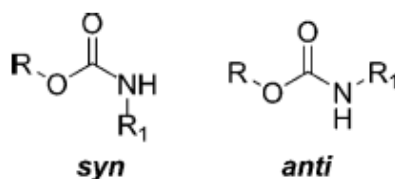


Figura 2. Conformazioni *syn* e *anti* dei carbammati.

Sebbene i carbammati abbiano delle somiglianze strutturali con le ammidi, mostrano una preferenza per la conformazione *anti*. L'isomero *anti* è generalmente favorito a livello energetico di 1.0–1.5 kcal mol⁻¹ rispetto all'isomero *syn* per ragioni steriche ed elettrostatiche. Tuttavia, in molti casi le differenze energetiche possono essere vicine allo zero. Di conseguenza i carbammati si trovano approssimativamente come miscela 50:50 di isomeri *syn* e *anti*, come nel caso di derivati amminoacidici protetti dal gruppo *tert*-butilossicarbonile (Boc).

Questo equilibrio tra i rotameri e la bassa energia di attivazione rende i carbammati ottimali per scambi di conformazione nelle molecole.⁽⁶⁾

È stata studiata l'influenza dei sostituenti in R e R₁ sull'energia libera e la differenza tra le due conformazioni. Oltre agli effetti sterici si deve considerare anche l'elettronegatività del sostituito in R₁, perché potrebbe influenzare la

conformazione in vari modi, compresi i cambiamenti dei momenti dipolari molecolari e degli angoli di legame. Solo con la conformazione *anti* è possibile aspettarsi carbammati ciclici a cinque-sei-sette termini. Calcoli sul momento dipolare del gruppo carbammico supportano questa ipotesi.

Il solvente, la concentrazione, la formazione di sali ed il pH influenzano fortemente la differenza di energia libera tra gli isomeri *syn* e *anti* dei carbammati. Anche i legami a idrogeno intra- e inter molecolari potrebbero perturbare l'equilibrio isomerico *syn* e *anti* dei carbammati.

Un esempio dell'influenza della formazione di legami di legami a idrogeno della concentrazione è stato fornito da Gottlieb, e Nudelman.⁽⁷⁾ Gli autori hanno preso in considerazione gli aminoacidi con gruppo protettore (Boc) sull'azoto e i loro corrispondenti esteri metilici. È stata rilevata un'insolita abbondanza del rotamero *syn* del N-Boc-aminoacido. I corrispondenti derivati esterei fornisce lo spettro previsto, coerente con la presenza di una sola singola specie a temperatura ambiente. L'analisi dello spettro ¹H-NMR indica che la proporzione del rotamero *syn* aumenta con la concentrazione, sostenendo l'esistenza di un processo di aggregazione. Dato che l'abbassamento della temperatura è un altro metodo per ottenere l'oligomerizzazione, gli esperimenti allo spettro NMR sono stati effettuati a temperature diverse. Come previsto quando la temperatura aumenta il rotamero passa dalla forma *syn* alla forma *anti*.

Nel complesso, i dati raccolti confermano il concetto che la porzione amminica del rotamero *syn* di un carbammato forma legami a idrogeno intermolecolari con il gruppo OH di un acido carbossilico coinvolto in questo processo, mentre il corrispondente estere non si comporterebbe nel solito modo, avendo un gruppo alchilico al posto dell'idrogeno e quindi non sarebbe in grado di formare un dimero (Figura 3).

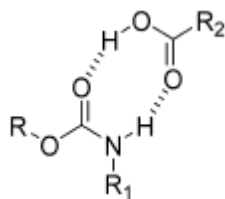


Figura 3. Possibile dimero tra il *syn*-carbammato e un gruppo acido.

Questa ipotesi è stata validata aggiungendo una quantità crescente di acido acetico ad una soluzione di un carbammato protetto da un gruppo Boc. Come previsto, l'equilibrio è spostato verso il rotamero *syn* e la sua concentrazione aumenta in funzione della quantità di acido aggiunta. Al contrario l'aggiunta di acido acetico ad una soluzione del corrispondente carbammato non influenza il rapporto *syn/anti*.

In questo contesto Moraczewski e collaboratori hanno progettato nuovi sistemi di legami a idrogeno capaci di perturbare selettivamente l'equilibrio *syn/anti* di un gruppo carbammico.⁽⁸⁾ Si è esaminata la capacità dell'acido acetico e della 2,6-bis(octilammido)piridina **3** di perturbare l'equilibrio *syn-anti* dei carbammati **1** e **2** (Figura 4).

In una soluzione di CDCl₃ l'acido acetico stabilizza parzialmente, attraverso la formazione di due legami idrogeno, il rotamero *syn* fenil-carbammato **1** (figura 4A), senza alcun effetto rilevante sul rapporto *syn/anti* del 2-piridin-carbammato **2** (figura 4B). Nel secondo caso, l'acido acetico favorisce la donazione di un legame a idrogeno al più basico N piridinico e forma un complesso mostrato in figura 4B. Al contrario, nel caso del composto donatore-accettore-donatore **3**, si stabilizza fortemente il rotamero *syn* del 2-piridincarbammato (figura 4D) rispetto al rotamero *anti* (figura 4C).

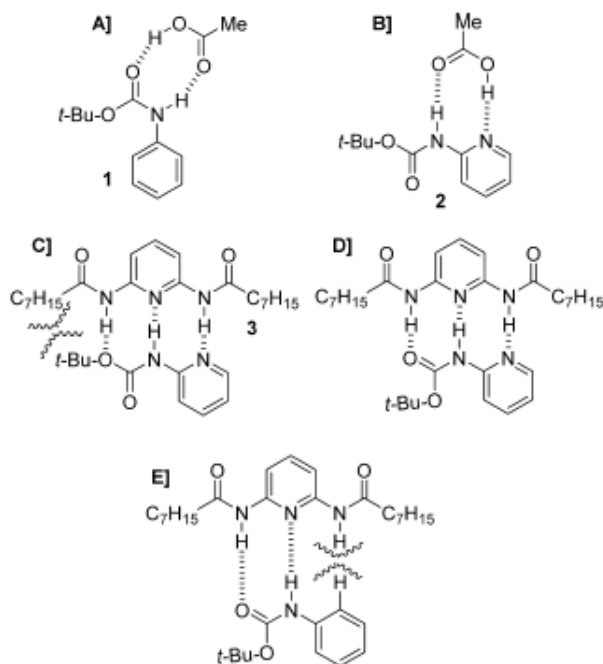


Figura 4. A) *Syn* carbammato **1** stabilizzato da legami a idrogeno con l'acido acetico; (B) acido acetico associato con il rotamero *anti* **2**; (C) associazione di **3** con il rotamero *anti* **2**; (D) Associazione di **3** con il rotamero *syn* favorito; (E) associazione di **3** con il rotamero *syn* **1** sfavorito

Non vi è alcun effetto sul rapporto *syn/anti* del fenil-carbammato (**1**), presumibilmente perché c'è un ingombro sterico dato dalla formazione del complesso stabilizzato dai legami a idrogeno (figura 4E).

La funzione carbammica gioca un ruolo importante in chimica farmaceutica, non solo perché viene poi ritrovata nei farmaci, ma anche per la sua presenza in numerosi profarmaci.

La velocità e il livello della loro idrolisi è la chiave per la loro lunga durata e l'intensità della loro attività farmaceutica. Una rapida idrolisi potrebbe avere un riscontro negativo, diminuendone l'attività, sia in termini di durata che di efficacia. Al contrario, profarmaci di tipo carbammico, devono essere sottoposti ad un'idrolisi prolungata per liberare in circolo il farmaco attivo ed esplicare il loro effetto terapeutico.

Vacondio e collaboratori hanno recentemente proposto un interessante studio, in cui sono state esaminate un gran numero di pubblicazioni riguardanti l'idrolisi

metabolica dei carbammati usati in terapia.⁽⁹⁾ Gli autori sono stati in grado di utilizzare i dati raccolti per ottenere una relazione qualitativa tra la struttura molecolare e la stabilità all'idrolisi metabolica.

È stato estrapolato un andamento secondo il quale l'instabilità metabolica dei carbammati decresce nella seguente serie: Aril-OCO-NH-alchil \gg alchil-OCO-NH-alchil \sim Alchil-OCO-N-(alchil)₂ \geq alchil-OCO-N-(endociclico) \geq aril-OCO-N-(alchil)₂ \sim aril-OCO-NH-aril \sim alchil-OCO-NH-acil \gg alchil-OCO-NH₂ > carbammato ciclico. Perciò i carbammati che derivano dall'ammoniaca o da ammine alifatiche hanno un'emivita sufficientemente lunga. Un esempio è rappresentato dal Cefoxitin (**4**) una cefalosporina di seconda generazione (Figura 5). Un carbammato ciclico a 5 o 6 termini è abbastanza stabile e solitamente non subisce l'apertura idrolitica dell'anello; l'agente antibatterico Linezolid (**5**) è rappresentativo di questa classe (Figura 5). Per questi farmaci, l'idrolisi del carbammato non è necessariamente la reazione metabolica che determina l'emivita.

Al contrario l'inibitore della FAAH (fatty acid amide hydrolase) URB524 (**6**) mostra una significativa idrolisi in soluzione tampone a pH fisiologico dopo 24 ore.

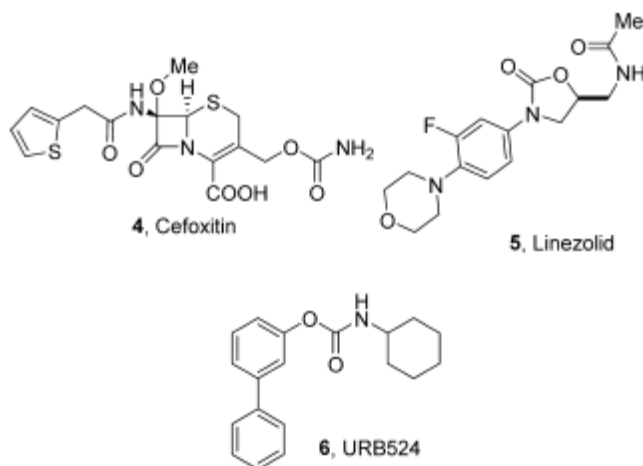


Figura 5. Esempi di farmaci carbammici con differente stabilità metabolica.

3. METODI PER LA SINTESI DI CARBAMMATI

I carbammati giocano un ruolo importante nella sintesi organica, specialmente come subunità dei composti biologicamente attivi. Sono stati sviluppati metodi semplici ed efficienti per la sintesi di carbammati.

3.1. SINTESI MEDIANTE METODI TRADIZIONALI

Nel corso degli anni sono stati sintetizzati una varietà di carbammati attraverso il riarrangiamento di Hoffman delle ammidi,⁽¹⁰⁾ con il riarrangiamento di Curtius delle azidi aciliche⁽¹¹⁾ o mediante carbonilazione riduttiva di nitro aromatici, carbonilazione di ammine, reazione di alcol con isocianato e alchilazione con anidride carbonica.

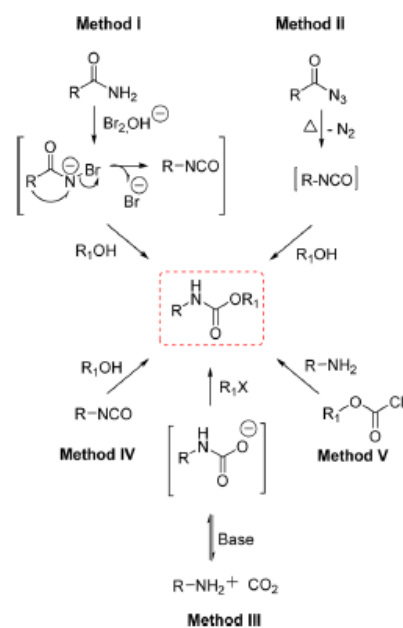
Il riarrangiamento di Hoffman (metodo I, Schema 1) è un metodo riconosciuto per ottenere un carbammato o un'ammina primaria partendo da un'ammido primaria. Molti sforzi sono stati dedicati allo sviluppo di reagenti diversi per ottenere un'idonea degradazione di Hoffman, in quanto il metodo classico prevede l'uso di una soluzione alcalina di bromo, e ciò non è sufficiente e neppure affidabile per la riuscita della reazione. Una varietà di reagenti possono sostituire il bromo, per esempio: MeOBr, PhI(OAc)₂, NBS-CH₃ONa, NBS-KOH, tetraacetato di piombo e il benzil trimetil ammonio tribromuro. Tuttavia questi metodi modificati richiedono più di un equivalente o un eccesso di reagente ossidante, il che non è molto conveniente.

Il riarrangiamento di Curtius (metodo II, Schema 1) è una decomposizione per riscaldamento della azide acilica ad ottenere l'isocianato come prodotto intermedio di reazione. Questo metodo è ampiamente impiegato nella trasformazione degli acidi carbossilici in carbammati e uree. Le azidi aciliche sono generalmente preparate partendo da un derivato dell'acido carbossilico come un cloruro acido, un'anidride o un'idrazide. L'intermedio che si ottiene (isocianato) può subire numerosi attacchi nucleofili a fornire un derivato carbammico. Il metodo del cloruro acido non è sfruttabile a causa della elevata reattività. Le trasformazioni *one-pot* di acidi carbossilici in carbammati evitano di dover isolare l'azide acilica (RCON₃) instabile. Tuttavia i protocolli che

prevedono l'uso di DPPA (Difenilfosforil azide) per la reazione *one-pot* di Curtius sono caratterizzati da problemi legati soprattutto alla sua tossicità e ad un elevato punto di ebollizione (157°C), che crea delle difficoltà durante il *work-up* e la purificazione.⁽¹²⁾

Altri metodi generali per la sintesi di carbammati prevedono l'uso sostanze molto tossiche di Fosgene (COCl₂), suoi derivati o isocianato. Sono stati effettuati notevoli sforzi per trovare un'alternativa all'utilizzo del fosgene data la sua tossicità. Un buon sostituto è la CO₂, una risorsa rinnovabile che, essendo né tossica né corrosiva né infiammabile, non ha alcuna incidenza sull'ambiente.⁽¹³⁾ È noto che la CO₂ reagisce rapidamente con le ammine a dare il sale d'ammonio dell'acido carbammico (metodo III, Schema 1) attraverso un attacco nucleofilo da parte dell'azoto amminico sul carbonio della CO₂. La maggior parte degli approcci in questo contesto si basa sulla formazione del sale del carbammato attraverso la reazione tra CO₂ e ammine, seguita dalla reazione con l'alogenuro alchilico (RX). Dato che la nucleofilicità dell'anione carbammico è minore rispetto a quella dell'ammina di partenza, la successiva reazione tra il sale e l'alogenuro alchilico (RX) non fornisce selettivamente uretani.

Schema 1. Metodi di sintesi tradizionali adottate per la sintesi di carbammati



La formazione di carbammati dagli isocianati (metodo IV, Schema 1) è di fondamentale importanza per le industrie di poliuretano. Ci sono però delle limitazioni sintetiche e di tossicità legate all'utilizzo del fosgene, il reattivo più comune per ottenere isocianati. I cloroformiati alchilici (R_1OCOCI) sono i reagenti più usati per l'ottenimento dei carbammati (metodo V, schema 1). Tuttavia, questi reagenti hanno degli svantaggi, grossi eccessi di base e lunghi tempi di reazione per ottenere un'efficienza di reazione accettabile. Inoltre, un eccesso di reagenti non è appropriato per la sintesi di molecole con funzionalità (amminica e esterea) multiple, nelle quali la chemioselettività è di fondamentale importanza.⁽¹⁴⁾

3.2. SINTESI DI CARBAMMATI ATTRAVERSO CARBONATI ATTIVATI

Sono stati sviluppati un certo numero di carbonati organici come alternativa low-cost al fosgene per la sintesi di carbammati organici, tra cui gli agenti alcossicarbonilanti (**7-11**, Figura 6).

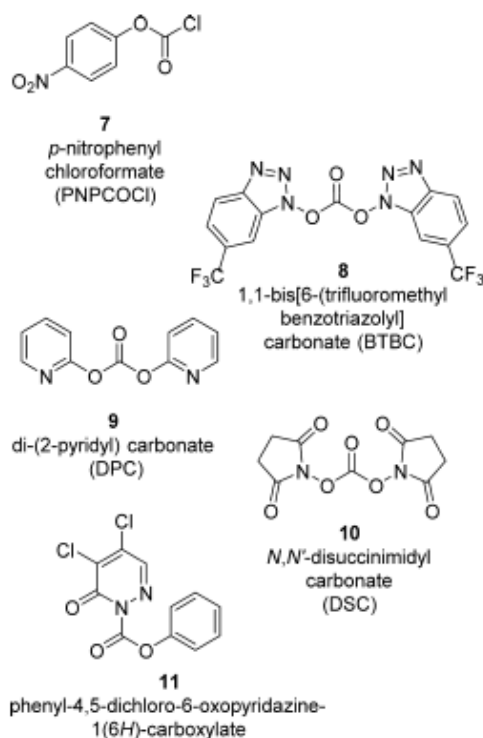

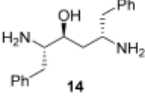
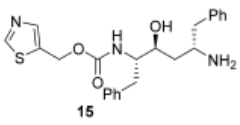
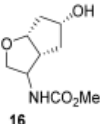
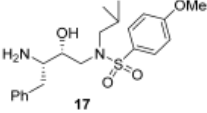
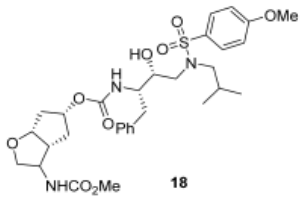
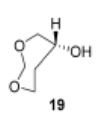
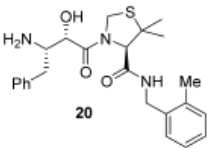
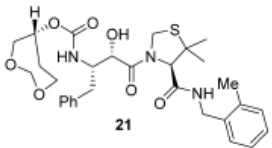
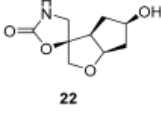
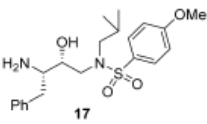
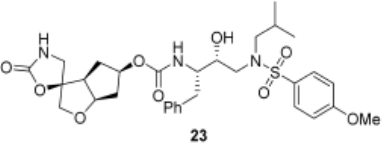


Figura 6. Carbonati comunemente impiegati per la sintesi di carbammati

Queste metodologie sono spesso utilizzate per la sintesi dei carbammati nel *Drug Design*.⁽¹⁵⁾

I carbonati sono spesso utilizzati con la funzione *p*-nitrobenzenica per la preparazione di una vasta gamma di carbammati. A questo scopo, il *p*-nitrofenil cloroformiato **7**, trattato con l'appropriato alcol in presenza di una base, fornisce i corrispondenti carbonati attivati, che sono risultati utili ed efficaci per l'alcoxicarbonilazione delle opportune ammine (Schema 2). Esempi di carbammati di questo tipo sono riportati nella Tabella 1

Tabella 1. Esempi di formazione di carbammati dal *p*-nitrofenil carbonato

| Entry | Alcohol | Amine | Carbamate | Yield (%) |
|-------|---|---|--|------------------|
| 1 |  |  |  | 16 ⁷⁷ |
| 2 |  |  |  | 67 ⁷⁸ |
| 3 |  |  |  | 62 ⁷⁹ |
| 4 |  |  |  | 53 ⁸⁰ |

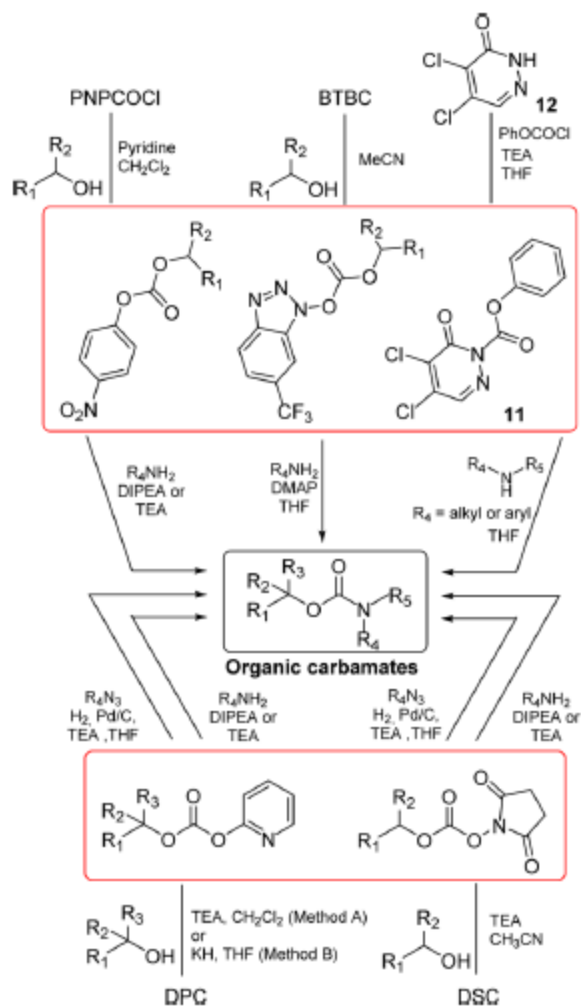
Sono stati descritti molti reagenti alcoxicarbonilanti per gruppi amminici, come la *N*-idrossiimmide. Inoltre, sono state evidenziate l'utilità e la versatilità di carbonati e ossalati contenenti gruppi elettronattrattori come i derivati *N*-

idrossiimmidici e benzotriazolici per varie trasformazioni.

Takeda *et al.* hanno riportato che gli 1-alcossi[6-(trifluorometil)-benzotriazolil]carbonati, che si ottengono facilmente dall'1,1-bis[6-(trifluorometil)-benzotriazolil]carbonato (**8**, BTBC), hanno elevate proprietà acilanti verso gli alcol, così come verso gruppi amminici.⁽¹⁶⁾

BTBC viene sintetizzato a partire dal 6-trifluorometil-1-idrossibenzotriazolo e trichlorometilcloroformiato, e purificato mediante lavaggio con etere anidro. Inoltre può essere conservato per mesi in freezer. BTBC viene fatto reagire con alcol primari in acetonitrile a temperatura ambiente a dare carbonati stabili, che poi verranno successivamente trattati con ammine in presenza di 4-dimetilamminopiridina (DMAP) fornendo i corrispondenti carbammati (Schema 2 e Tabella 2).

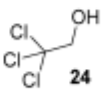
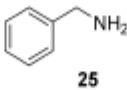
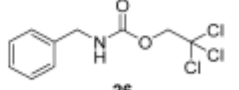
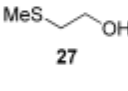
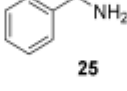
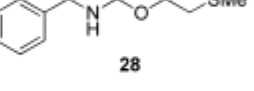
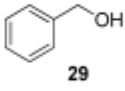
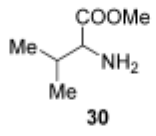
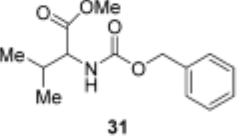
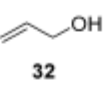
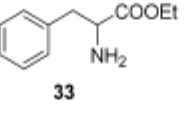
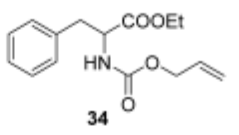
Schema 2. Sintesi di carbammati attraverso carbonati attivati



Nell'ambito della sintesi di molecole polifunzionali biologicamente attive che si legano ai siti enzimatici, c'è bisogno di un metodo più generale e sinteticamente realizzabile per la sintesi dei carbammati.

Nel 1991 è stata descritta l'utilità del di-(2-piridin)carbonato (**9**, DPC) quale reagente efficiente, ad alta resa e conveniente per l'alcossicarbonilazione di substrati amminici, con il quale si evitano molte delle limitazioni delle metodologie esistenti.

Tabella 2. Esempi di formazione di carbammati dal 1,1Bis[6-trifluorometil)Benzotriazolil] carbonato

| Entry | Alcohol | Amine | Carbamate | Yield (%) |
|-------|---|---|--|-----------|
| 1 |  24 |  25 |  26 | 64 |
| 2 |  27 |  25 |  28 | 80 |
| 3 |  29 |  30 |  31 | 95 |
| 4 |  32 |  33 |  34 | 97 |

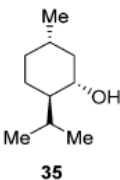
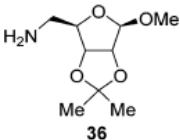
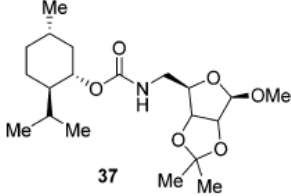
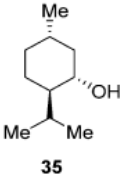
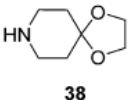
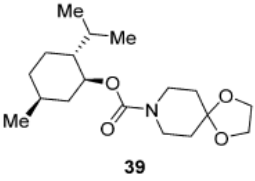
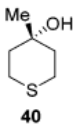
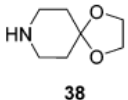
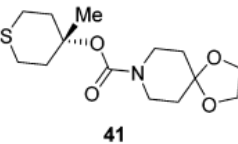
Il DPC è preparato a partire dalla 2-idrossi-piridina commerciale e trifosgene, in presenza di trietilammina (TEA), e successivamente verrà fatto reagire con un alcoli primari o secondari (ad esempio il (+)-mentolo) per ottenere i corrispondenti carbonati. L'alcossicarbonilazione delle ammine primarie o secondarie attraverso il carbonato ottenuto è effettuata in presenza di

triethylammina e fornisce i corrispondenti carbammati in buone rese (Schema 2, Metodo A, Tabella 3).

Nella preparazione di carbonati contenenti alcol terziari si utilizza idruo di potassio al posto della trietilammina (Schema 2, Metodo B, Tabella 3).

Successivamente è stato studiato la *N,N'*-disuccinimide carbonato (**10**, DSC), che promuove l'alcossicarbonilazione di ammine e alcoli in condizioni blande di reazione.

Tabella 3. Esempi di formazione di carbammati dal di-(2-piridin) carbonato

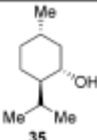
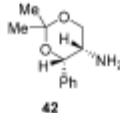
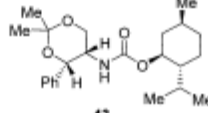

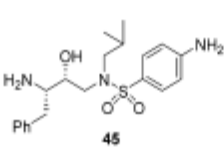
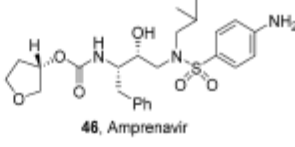
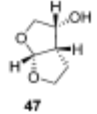
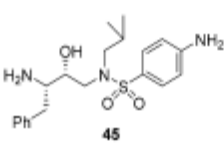
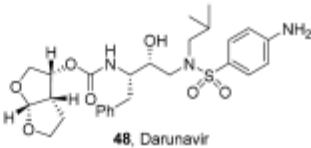
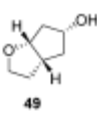
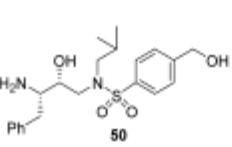
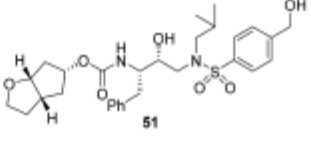
| Entry | Alcohol | Amine | Carbamate | Method | Yield (%) |
|-------|---|---|--|--------|-----------|
| 1 |  |  |  | A | 81 |
| 2 |  |  |  | A | 70 |
| 3 |  |  |  | B | 68 |

Rich e collaboratori hanno evidenziato la convenienza dell'uso dei carbonati misti su base succinimidica, per l'introduzione con alta resa del gruppo protettivo 2-(trimetilsilil)etossicarbonile (Teoc) su amminoacidi, senza la formazione di sottoprodotti oligopeptidici. DSC è risultato un efficace agente alcossicarbonilante per molti alcol primari e secondari stericamente impediti. DSC è disponibile in commercio, oppure può essere preparato convenientemente a partire dalla *N*-idrossisuccinimide seguendo la procedura vista per DPC. La pronta disponibilità di DSC, la stabilità dei carbonati misti, e le condizioni blande della reazione

rendono questo metodo affidabile per la sintesi dei carbammati (Schema 2, Tabella 4).

Poichè le azidi sono ampiamente utilizzate come composti incipienti le ammine nell'ambito della sintesi di zuccheri e aminoacidi, la loro conversione nei corrispondenti derivati carbammici potrebbe fornire una nuova via efficace da applicare in *Medicinal Chemistry*.

Tabella 4. Esempi di formazione di carbammati dalla N,N'-disuccinimide carbonato

| Entry | Alcohol | Amine | Carbamate | Yield (%) |
|-------|---|---|--|------------------|
| 1 |  35 |  42 |  43 | 77 ⁸⁶ |
| 2 |  44 |  45 |  46, Amprenavir | 95 ⁸⁸ |
| 3 |  47 |  45 |  48, Darunavir | 85 |
| 4 |  49 |  50 |  51 | 78 ⁸⁹ |

In questo contesto è stato sviluppato un protocollo sintetico ad alta resa che trasforma le varie azidi nei corrispondenti carbammati. In generali i carbonati misti sono preparati per trattamento di alcol variamente protetti con un eccesso di

DPC o DSC, come descritto prima. Questi carbonati, sottoposti a idrogenazione catalitica con azidi, in presenza di Pd/C al 10% in THF, forniscono i corrispondenti carbammati. Interessante è l'uso della trietilammina come catalizzatore che ha un effetto notevole sulla resa della reazione e sulla velocità del processo di alcossicarbonilazione (Schema 2, Tabella 5).

Più recentemente Yoon e collaboratori hanno studiato i piridazin-3(2*H*)-oni 2-sostituiti quali reagenti di trasferimento elettronico.⁽¹⁷⁾ In particolare, gli autori hanno indagato la potenza di carbonilazione del fenil 4,5-dicloro-6-oxo-piridazina-1-carbossilato (**11**) su ammine, per la preparazione di fenilcarbammati (Schema 2, Tabella 6).


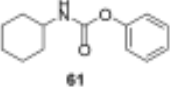

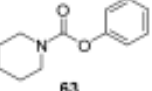

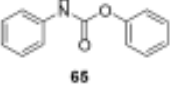
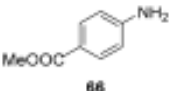
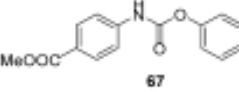
Tabella 5. Esempi di formazione di carbammati da carbonati con azidi

| Entry | Carbonate | Azide | Carbamate | Yield (%) |
|-------|-----------|-------|-----------|-----------|
| 1 | | | | 76 |
| 2 | | | | 69 |
| 3 | | | | 80 |
| | | | | |

Il composto **11** è stabile all'aria ed in solventi organici ad alte temperature e si prepara facilmente a partire dal 4-5-dicloro-6-oxo-piridazina (**12**) facilmente

disponibile in commercio e poco costoso in presenza di fenilcloroformiato e trietilammina (Schema 2).

Tabella 6. Esempi di formazione di carbammati dal fenil 4-5-dicloro-6-oxo-piridazina-1-carbossilato

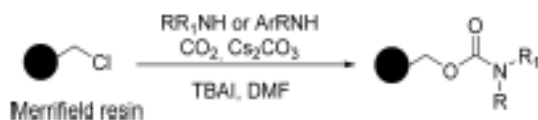
| Entry | Amine | Carbamate | Yield (%) |
|-------|---|---|-----------|
| 1 |  60 |  61 | 95 |
| 2 |  62 |  63 | 93 |
| 3 |  64 |  65 | 98 |
| 4 |  66 |  67 | 94 |

3.3. METODOLOGIE RECENTI PER LA SINTESI DI CARBAMMATI

L'applicazione di CO₂ in sintesi organica ha recentemente attratto molto interesse. La maggior parte degli approcci si basa sulla formazione dell'anione carbammato mediante reazione tra CO₂ e ammine, seguita dalla reazione con elettrofili, generalmente alogenuri alchilici.

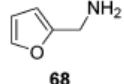
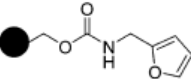
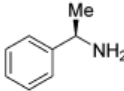
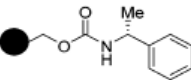
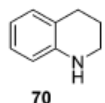
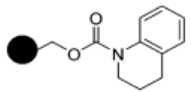
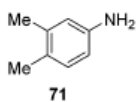
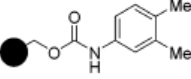
In questo contesto Jung e collaboratori hanno descritto una blanda ed efficiente sintesi di carbammati su supporti solidi (Schema 3).⁽¹⁸⁾

Schema 3. Sintesi di carbammati su supporti solidi utilizzando ammine aromatiche e resina di Merrifield



Ammine e Aniline sono state fatte reagire con la resina di Merrifield (solvente polimerico di resine di polistirene clorometilato) in presenza di CO₂, carbonato di cesio (Cs₂CO₃) e ioduro di tetrabuttilammonio (TBAI). La CO₂ è stata fatta gorgogliare nella sospensione, dove è stato usato come solvente la DMF (Schema 3). Le condizioni di reazione sono adatte per la purificazione e le reazioni sono complete. Il metodo è conveniente per ottenere librerie combinatoriali per uno *screening* rapido di molecole bioattive. In queste condizioni rimangono inalterati anche substrati chirali suscettibili alla racemizzazione (Tabella 7).

Tabella 7. Sintesi di carbammati su supporti solidi utilizzando resina di Merrifield con ammine primarie, secondarie e aniline

| Entry | Amine | Carbamate | Yield (%) |
|-------|---|---|-----------|
| 1 |  68 |  | 90 |
| 2 |  69 |  | 73 |
| 3 |  70 |  | 95 |
| 4 |  71 |  | 97 |

Successivamente questi autori hanno descritto una sintesi *one-pot* di N-alcil carbammati a partire da ammine primarie (Schema 4).

I carbammati sono stati sintetizzati attraverso la reazione a tre componenti tra ammine primarie, CO₂ e alogenuro alchilico in presenza di TBAI in DMF anidra (Schema 4, Tabella 8). La N-alcilazione diretta del carbammato intermedio A, in presenza di carbonato di cesio aggiuntivo e con un diverso alogenuro alchilico fornisce l' N-alcil carbammato desiderato B (Schema 4).

Schema 4. Sintesi di N-alcil carbammati dalla reazione a tre componenti tra ammine primarie, CO₂ e alogenuro alchilico in presenza di TBAI e carbonato di cesio

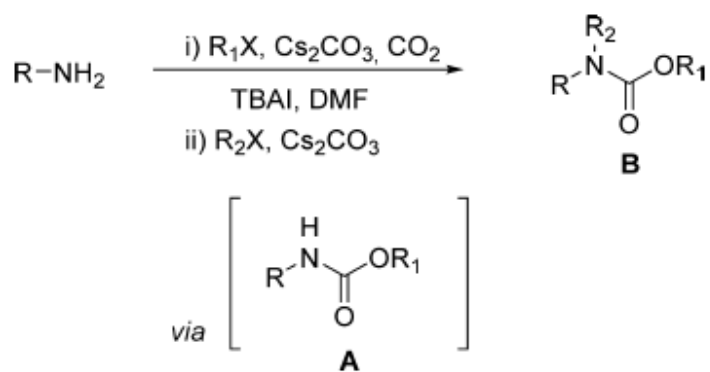
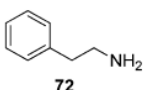
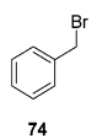
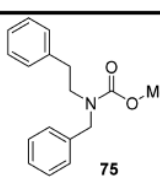
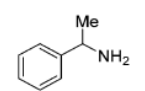
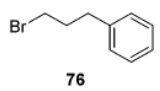
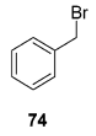
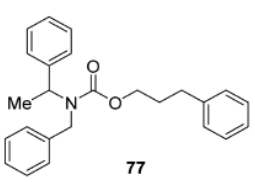
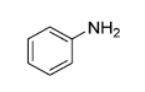
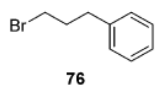
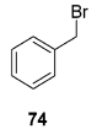
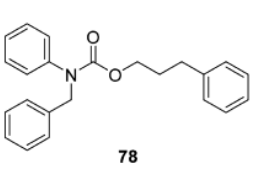
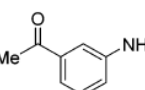
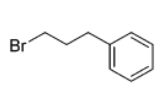
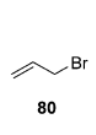
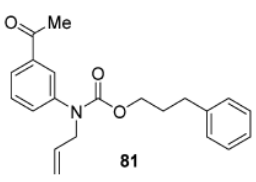


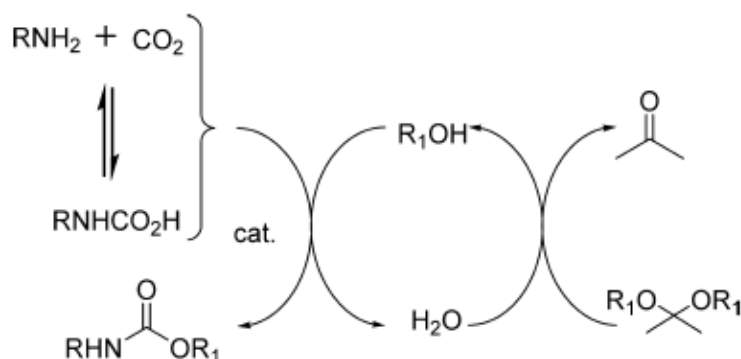
Tabella 8. Sintesi *one-pot* di N-alchil carbammati partendo da ammine primarie

| Entry | Amine | R ₁ X | R ₂ X | Carbamate | Yield (%) |
|-------|---|---|---|--|-----------|
| 1 |  72 | Mel, 73 |  74 |  75 | 87 |
| 2 |  <i>rac</i> -69 |  76 |  74 |  77 | 75 |
| 3 |  64 |  76 |  74 |  78 | 72 |
| 4 |  79 |  76 |  80 |  81 | 62 |

Interessante notare che il TBAI aiuta a ridurre l'eccessiva alchilazione del carbammato ottenuto, probabilmente grazie all'aumento della velocità di reazione tra anidride carbonica e ammina, ed alla stabilizzazione dell'anione dell'acido carbammico tramite la coniugazione con il catione tetrabuttilammonio.

Sakakura e collaboratori hanno riportato la sintesi di uretani per reazione tra CO₂ in fase densa con ammine e alcol, secondo una procedura che, non necessita della presenza di fosgene, ma neanche di alogenuri (Schema 5).⁽¹⁹⁾

Schema 5. Sintesi, priva di alogenuri, di carbammati impiegando CO₂ in fase densa in presenza di ammine e alcol



La sintesi di carbammati mediante CO₂ e alcol è catalizzata da complessi metallici, il dialchil(oxo)stagno e il dialchil(dicloro)stagno. Tuttavia la conversione dell'alcol è molto scarsa. Allo stesso modo la reazione tra ammine, alcol e CO₂ in presenza di catalizzatori metallici stagno-dialchilati produce una resa bassa. La bassa conversione che si osserva è stata attribuita a delle limitazioni termodinamiche e alla disattivazione del catalizzatore attraverso la produzione di acqua nella reazione.

Per superare questa problematica ed ottenere una buona resa di reazione è stato sviluppato un nuovo sistema di reazione che utilizza acetali che, in presenza di H₂O, rigenerano l'alcol di partenza (Schema 5).

Per ottenere gli uretani in buone rese è necessario usare CO₂ in fase densa sottoposta ad elevata pressione, per ridurre la formazione di sottoprodotti, come l'immina proveniente dall'addizione dell'ammina sul chetone o l'alchilazione di ammine dagli alcol.

Comunque si è cercato di sviluppare catalizzatori meno tossici e più attivi a base di metalli diversi dallo stagno. Così è stato descritto un nuovo sistema catalitico a base di nichel come sistema disidratante per la formazione di carbammati provenienti dalla reazione tra CO₂, ammine e alcol (Schema 6). È risultato interessante notare come l'aggiunta di un ligando azotato bidentato migliori l'efficienza e l'attività del catalizzatore Ni(OAc)₂ (Schema 6, Tabella 9).

Schema 6. Sistema catalitico a base di Nichel come sistema disidratante per la formazione di uretano da CO₂, ammine e alcol

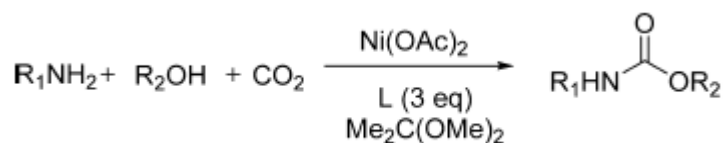
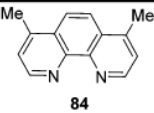
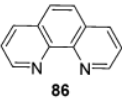
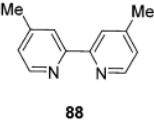
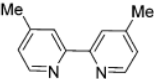


Tabella 9. Sintesi Ni-catalizzata di carbammati dalla CO₂

| Entry | Amine | Alcohol | Ligand (L) | Carbamate | Conv. ^a (%) | Select. ^b (%) |
|-------|--|---------|--|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 1 | CyNH ₂ 82 | MeOH |  84 | 85 , CyNHCOOMe | 83 | 81 |
| 2 | <i>t</i> -BuNH ₂ 83 | MeOH |  86 | 87 , <i>t</i> - BuNHCOOMe | 44 | 94 |
| 3 | 83 | MeOH |  88 | 87 | 18 | 34 ^c |
| 4 | 83 | MeOH |  88 | 87 | 41 | 100 ^d |

^aconversione dell'ammina ^buretano/ammide consumata x 100 ^cNi/L = 1:1

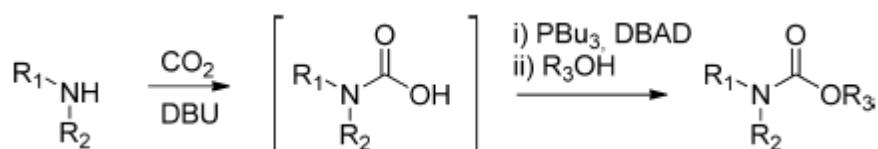
^dNi/L = 1:5

Bipiridine e fenantrolina, che danno forti legami di coordinazione (con basso ingombro sterico ed elevata densità elettronica), sono risultati i migliori composti di partenza per ottenere carbammati in alte rese. È da notare che il sistema Ni-fenantrolina è più attivo e meno tossico del complesso dialchil(oxo)stagno nelle stesse condizioni di reazione, e che l'attività catalitica del sistema Ni(OAc)₂-4'-dimetilbipiridina dipenda fortemente dal rapporto ligando/metallo (Tabella 9).

Peterson e collaboratori hanno proposto un metodo per il rapido sviluppo di

composti ureidici o carbammati (Schema 7). A partire da un'ammina, la reazione acido carbammico-isocianato e la successiva reazione con un alcol potrebbe fornire un carbammato.⁽²⁰⁾ Poiché questa reazione procede tramite una reazione intramolecolare, la variante per produrre carbammati ciclici, attraverso l'accoppiamento intramolecolare, in queste condizioni di reazione, non avviene. La formazione di un carbammato acido, aggiungendo all'ammina CO₂ e usando come catalizzatore DBU (1,5-diazabicyclo-undec-5-ene), e la successiva reazione con l'alcol può fornire come prodotto di reazione il carbammato (Schema 7).

Schema 7. Sintesi, DBU-catalizzata, di carbammati in presenza di CO₂ in fase gassosa

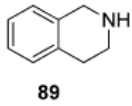
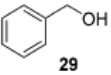
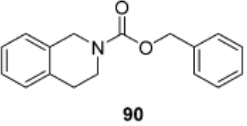
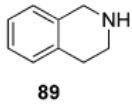

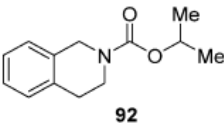
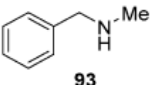

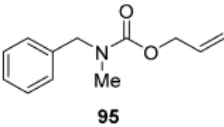
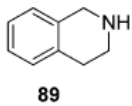
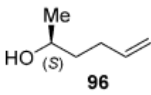
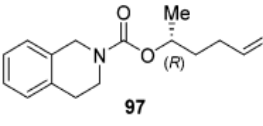


Carbammati acidi prodotti a partire da ammine secondarie, comunque, reagiscono con gli alcoli nelle condizioni di Mitsunobu, ovvero in presenza di DBAD (dibenzil azodicarbossilato) e tributilfosfina, in una reazione catalizzata da DBU con CO₂ in fase gassosa, fornendo i corrispondenti carbammati (Schema 7, Tabella 10).

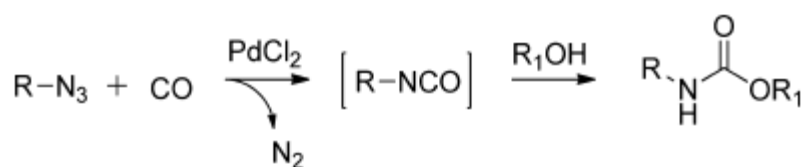
Questa reazione non presenta come intermedio un isocianato, ma avviene secondo una SN₂ dell'alcol attivato (legato alla tributilfosfina) sull'acido carbammico con un ossidrile, in questo caso buon LG. Questa ipotesi è supportata dalla completa inversione stereochimica osservata al momento della conversione di un alcol secondario chirale nel carbammato corrispondente (la SN₂ da inversione al 100%) (Tabella 10).

Recentemente Jiao e collaboratori hanno riportato un efficiente metodo catalizzato da cloruro di palladio (PdCl₂) in cui una miscela di azidi, CO ed alcol fornisce, per sintesi diretta, carbammati attraverso la formazione di isocianato *in situ* (Schema 8).⁽²¹⁾

Tabella 10. Sintesi di carbammati da acidi carbammici secondari

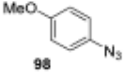

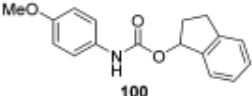
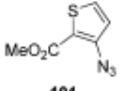
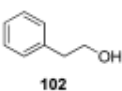
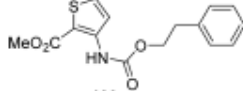
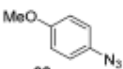
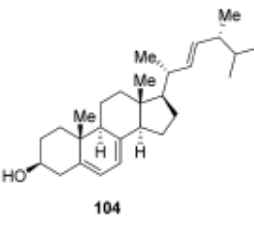
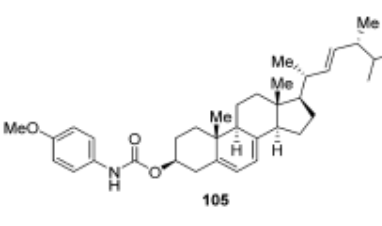

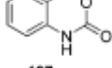
| Entry | Amine | Alcohol | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|---|-----------|
| 1 |  89 |  29 |  90 | 96 |
| 2 |  89 |  91 |  92 | 46 |
| 3 |  93 |  94 |  95 | 50 |
| 4 |  89 |  96 |  97 | 80 |

Schema 8. Sintesi, catalizzata da PdCl₂, di carbammati dall'assemblaggio di azidi, CO e alcol



Condizioni di reazione blande e la formazione di N₂ come sottoprodotto rendono questa reazione molto utile per la sintesi di composti bioattivi. Inoltre, l'impiego di monossido di carbonio a pressione atmosferica e l'uso di una piccola quantità di catalizzatore PdCl₂ (2 mol %), rappresenta una valida alternativa ai metodi usuali per la sintesi di carbammati (Tabella 11).

Tabella 11. Carbammati provenienti da azidi organiche, CO (1 atm) e alcol

| Entry | Azide | Alcohol | Carbamate | Yield (%) |
|-------|---|--|---|-----------|
| 1 |  |  |  | 60 |
| 2 |  |  |  | 87 |
| 3 |  |  |  | 57 |
| 4 | |  |  | 99 |

La sintesi di carbammati attraverso la formazione di carbamoil cloruri (RNHCOCl) non è conveniente, a causa dell'utilizzo del fosgene. Inoltre, questi carbamoil cloruri sono altamente reattivi, suscettibili a idrolisi, instabili e non adatti ad una conservazione a lungo termine. Per queste problematiche, Batley e collaboratori hanno identificato l'uso dei sali di carbamoil imidazolo come reattivi *N,N'*-disostituiti utili per il trasferimento del carbamoile, dal momento che mostrano maggiore reattività rispetto ai carbamoilimidazoli, grazie all'effetto imidazolo (Schema 9).⁽²²⁾

Questi sali si preparano facilmente per trattamento di un'ammina secondaria con *N,N'*-carbamoilimidazolo (CDI) e iodometano (CH₃I) come agente *N*-alchilante. Mentre i sali di carbamoilimidazolo sono poco reattivi con gli alcol, potrebbero reagire con i nucleofili alcossidi a formare i corrispondenti carbammati (Tabella 12).

Nel caso dei fenoli, le ammine terziarie sono basi appropriate per la generazione *in situ* dei fenossidi reattivi.

Schema 9. Sintesi di carbammati attraverso l'uso di sali di carbamoilimidazolo

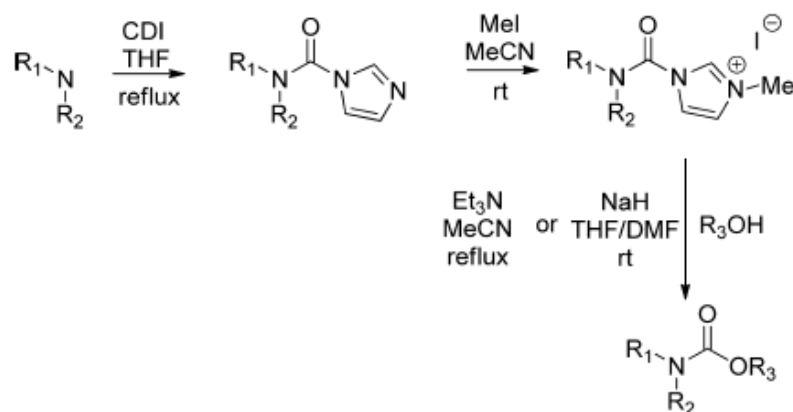

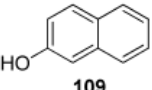
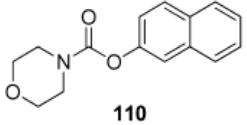
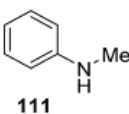
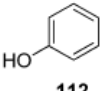
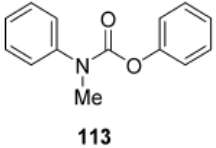
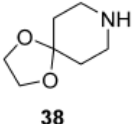
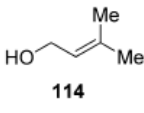
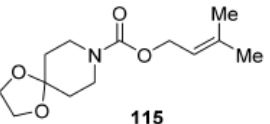
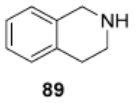
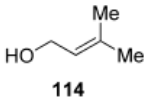
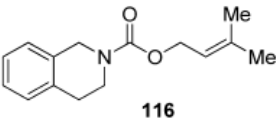


Tabella 12. Carbammati provenienti da sali di carbamoilimidazolo con alcool o fenoli

| Entry | Amine | Alcohol | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|---|-----------|
| 1 |  108 |  109 |  110 | 93 |
| 2 |  111 |  112 |  113 | 86 |
| 3 |  38 |  114 |  115 | 57 |
| 4 |  89 |  114 |  116 | 83 |

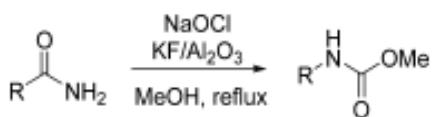
L'acidità più bassa degli alcool alifatici (10^{-16}) presumibilmente previene la formazione dell'alcolato che potrebbe servire come reattivo nucleofilo. Gli alcool meno acidi reagiscono con il sale del carbamoilimidazolo dopo lo loro

conversione in alcolato con idruro di sodio, specie più reattiva con nucleofilicità maggiore (Schema 9).

L'uso di reagenti su supporti solidi (SSR) è diventato ubiquitario, ciò è dovuto a una maggior reattività e selettività, condizioni blande, sicurezza nel *work-up* riduzione dello spreco di solventi.

Il riarrangiamento di Hoffman proposto da Gogoi e collaboratori è un'operazione semplice, poco costosa e applicabile ad una varietà di ammidi, aromatiche e alifatiche, per la sintesi di metil carbammati (Schema 10).

Schema 10. Sintesi di metil carbammati tramite modifica del riarrangiamento di Hoffman



KF/Al₂O₃ rappresenta un utile ed interessante supporto solido utilizzato come base forte in una vasta gamma di reazioni, in sostituzione delle basi organiche. L'ipoclorito di sodio (NaClO) è un agente ossidante poco costoso, ed è una sicura alternativa agli ossidanti attualmente impiegati. Tutto ciò ha stimolato i ricercatori a indagare KF/Al₂O₃ insieme all'ipoclorito di sodio come reagente efficace per il riarrangiamento di Hoffman.

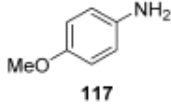
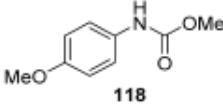
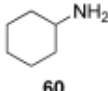
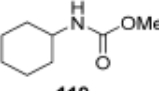
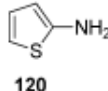
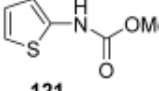
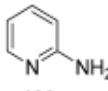
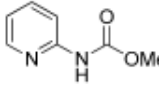
La basicità di KF/Al₂O₃ deriva dalla formazione di idrossido di potassio nella preparazione iniziale del supporto solido per reazione di KF con il supporto di allumina. In queste condizioni di reazione altamente basiche, l'anione ipoclorito è la forma predominante del cloro, che, reagendo con l'ammide, forma una N-cloroammide che, tramite trasposizione, forma isocianato.

Questo isocianato in presenza di metanolo si converte rapidamente nel corrispondente metil carbammato (Tabella 13).

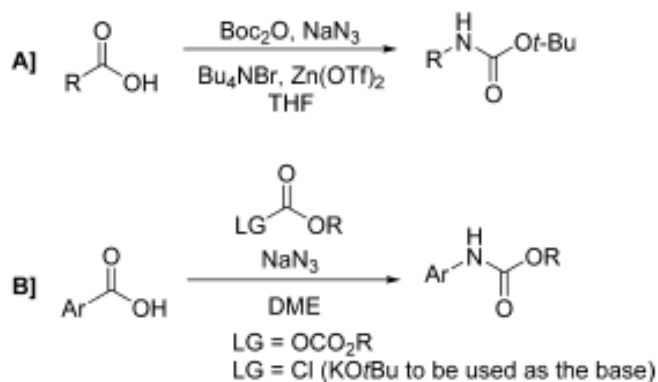
Sono state studiate anche delle modifiche del riarrangiamento di Curtius. Lebel e collaboratori hanno descritto un protocollo utile per la preparazione di carbammati *t*-butilici a partire dai corrispondenti acidi carbossilici.⁽²³⁾ La reazione con il di-*tert*-butil dicarbonato (Boc₂O) e sodio azide (NaN₃) porta prima alla formazione

delle azidi aciliche, che poi subirà un riarrangiamento di Curtius in presenza di tetrabuttilammonio di bromuro (Bu_4NBr) e zinco trafilato $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ fornendo carbammati attraverso l'isocianato quale intermedio di reazione (Schema 11A e Tabella 14).

Tabella 13. Carbammati provenienti dalla modifica del riarrangiamento di Hoffman

| Entry | Amine | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|-----------|
| 1 |  117 |  118 | 94 |
| 2 |  60 |  119 | 84 |
| 3 |  120 |  121 | 91 |
| 4 |  122 |  123 | 83 |

Schema 11. Sintesi dei carbammati tramite modifica del riarrangiamento di Curtius

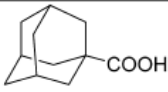
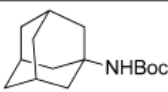
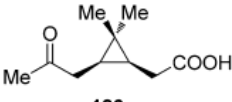
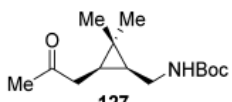
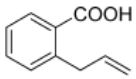
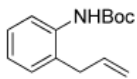
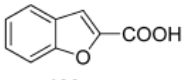
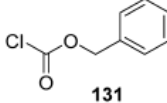
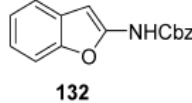


Questa metodologia è stata poi estesa alla sintesi diretta di carbammati di ammine aromatiche utilizzando acidi carbossilici aromatici (Schema 11B e Tabella 14).⁽²⁴⁾

In particolare, la reazione di un cloroformiato o di un *tert*-butil-dicarbonato con sodio azide (NaN_3) produce una azide aromatica (ArCON_3), presumibilmente attraverso la formazione di un azidoformiato ($\text{ROCON}_2\text{COOR}$).

Contrariamente a quanto osservato con acidi carbossilici alifatici, utilizzando condizioni di reazioni simili (40°C), gli acidi aromatici portano principalmente alla formazione del loro corrispondente *tert*-butil estere, presumibilmente tramite lo spiazzamento del gruppo uscente azidico con *tert*-butossido. Questo potrebbe essere attribuito alla maggior stabilità dell'azide aromatica (ARCON_3) rispetto alla corrispondente controparte alifatica. Perciò per questi substrati il riarrangiamento di Curtius può essere effettuato a temperature più alte, 75°C rispetto ai 40°C utilizzati per gli acidi alifatici.

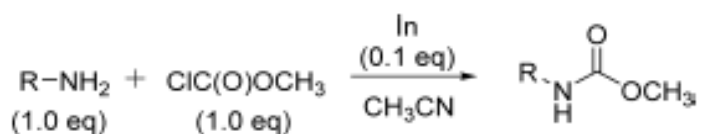
Tabella 14. Carbammati provenienti dalla modifica del riarrangiamento di Curtius

| Entry | Carboxylic acid | Anhydride or Chloroformate | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|---|-------------------|
| 1 |  124 | Boc_2O |  125 | 90 ¹⁰⁹ |
| 2 |  126 | Boc_2O |  127 | 68 ¹⁰⁹ |
| 3 |  128 | Boc_2O |  129 | 76 ¹¹⁰ |
| 4 |  130 |  131 |  132 | 80 ¹¹⁰ |

Come accennato, i cloroformiati sono i reagenti più frequentemente usati per la sintesi di carbammati, sebbene la necessità di una quantità in eccesso ne limita il loro utilizzo. Un promettente metodo per la sintesi di carbammati implica l'uso di un catalizzatore come promotore della reazione.

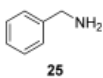
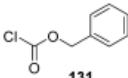
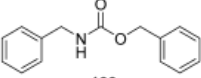


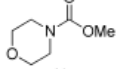
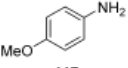

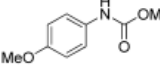
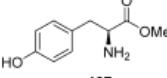

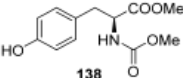
Recentemente reazioni che usano l'Indio (In) come catalizzatore hanno acquisito una notevole considerazione a causa dell'elevata reattività e delle proprietà uniche dei reagenti a base di indio, come la non tossicità e l'inerzia nei confronti di aria e acqua. Inoltre, l'attivazione dell'Indio non richiede alcun pretrattamento per. In questo contesto, Jang e collaboratori hanno sviluppato un metodo semplice, efficace e selettivo per la sintesi di carbammati partendo da ammine, impiegando una quantità catalitica di Indio (0,1 Eq) e una quantità stechiometrica di metilcloroformiato (1 Eq), (Schema 12).

Schema 12. Sintesi di carbammati catalizzata dall'Indio.



Questo metodo è applicabile ad un'ampia varietà di ammine ed alcol stericamente diversi e può essere applicabile per la protezione selettiva di gruppi amminici in condizioni blande (Tabella 15).

Tabella 15. Carbammati provenienti dalla reazione, catalizzata dall'Indio, con ammine e cloroformati,

| Entry | Amine | Chloroformate | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|---|-----------|
| 1 |  25 |  131 |  133 | 90 |
| 2 |  108 |  134 |  135 | 84 |
| 3 |  117 |  134 |  136 | 84 |
| 4 |  137 |  134 |  138 | 86 |

Arndtsen e collaboratori hanno proposto un'altra applicazione, con reagenti a base di Indio (In), per la formazione di ammine con N protetto, in un unico *step* (Schema 13, Tabella 16).⁽²⁵⁾

Schema 13. Reazione di immine con reagenti a base di Indio, in presenza di CuCl come catalizzatore

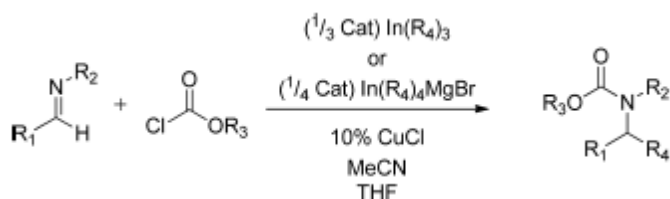
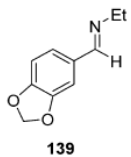
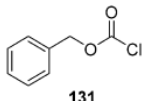
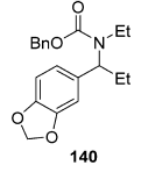
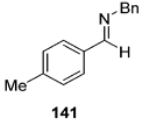
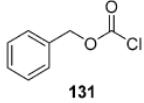

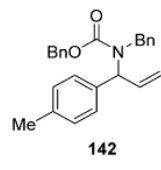
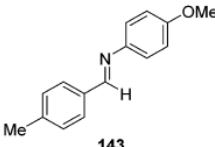


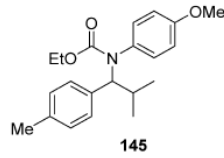


Tabella 16. Carbammati provenienti da immine e reagenti a base di Indio

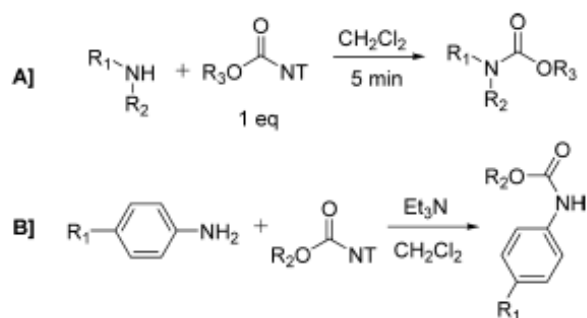
| Entry | Imine | Chloroformate | R ₄ | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|---|---|--------------------------------------|
| 1 |  139 |  131 | Et |  140 | 92 ^a (94) ^b |
| 2 |  141 |  131 |  |  142 | 89 ^a (91) ^b |
| 3 |  143 |  144 |  |  145 | 77 ^a (75) ^b |

^aResa riferita all'uso di InCl₃ ^bResa riferita all'uso di In(R₄)MgBr

Dal momento che i reagenti a base di Indio trasferiscono rapidamente i loro gruppi organici (δ^-) al carbonio imminico, è richiesto solo 1/3 di equivalente e l'unico sottoprodotto che si forma è il tricloruro di indio (InCl₃). In modo analogo possono essere utilizzati anche reagenti tetraorganici a base di indio In(R₄)MgBr per trasferire tutti e quattro i gruppi organici. Quindi è necessario 1/4 di un equivalente di indio per la loro reazione con le immine, così c'è l'attacco di un solo gruppo R₄ sul C imminico. Il cloruro di rame (I) al 10% è risultato il catalizzatore più efficiente.

Sodeoka e collaboratori⁽²⁶⁾ hanno descritto l'uso dei reagenti di 1-alcossicarbonil-3-nitro-1,2,4-triazolo quali utili intermedi per la sintesi di carbammati (Schema 14).

Schema 14. Sintesi di carbammati impiegando reagenti di 1-alcossicarbonil-3nitro-1,2,4-triazolo



Per ottenere una reazione rapida e pulita, le caratteristiche del gruppo uscente svolgono un ruolo chiave. Il gruppo uscente ideale dovrebbe avere un elemento elettron-attrattore in grado di aumentare l'elettrofilicità del carbonio carbonilico adiacente, e una bassa nucleofilicità per evitare reazioni secondarie. Dovrebbe essere anche facilmente eliminabile dai prodotti di reazione. Il 3-nitro-1,2,4-triazolo (NT), sebbene mostri carattere nucleofilo, può essere facilmente rimosso dalla reazione grazie alla sua insolubilità in diclorometano o in cloroformio.

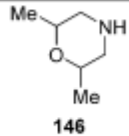
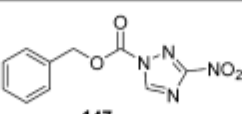
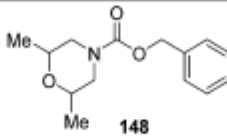
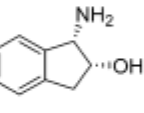
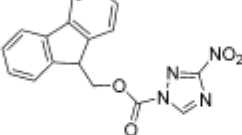
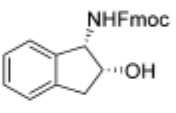
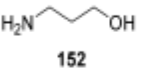
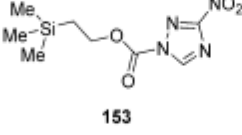
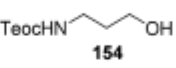
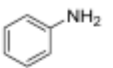
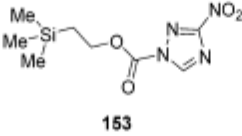
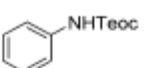
Reagenti a base di NT presentano una serie di vantaggi, come l'elevata stabilità; infatti possono essere conservati per lunghi periodi senza subire decomposizione. Le reazioni di questi reagenti con ammine primarie o secondarie procedono rapidamente a dare i corrispondenti carbammati con rese intorno al 95% (Schema 14A, tabella 17). Al contrario delle alifatiche, le ammine aromatiche reagiscono più lentamente; tuttavia, l'aggiunta di trietilammina è risultata efficace nel promuovere le reazioni (Schema 14B, tabella 17).

La carbonilazione riduttiva di composti nitroaromatici nel corrispondente carbammato è oggetto di grande interesse, sia dal punto di vista del meccanismo che dell'applicazione (Schema 15).

Schema 15. Preparazione di carbammati tramite carbonilazione riduttiva di composti nitro aromatici



Tabella 17. Carbammati provenienti da reagenti 1-alcossicarbonil-3nitro-1,2,4-triazolici con ammine o aniline

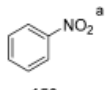
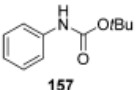
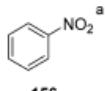
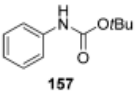
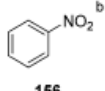
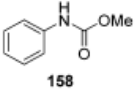
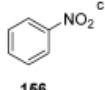
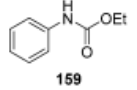
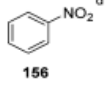
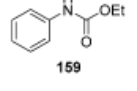
| Entry | Amine | NT reagent | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|---|-----------|
| 1 |  146 |  147 |  148 | 89 |
| 2 |  149 |  150 |  151 | 94 |
| 3 |  152 |  153 |  154 | quant. |
| 4 |  64 |  153 |  155 | 94 |

Cheng e collaboratori hanno riportato l'uso dei complessi $\text{Ru}(\text{CO})_4^-$ e $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$ a base di Rutenio per la catalisi di questa reazione ed è stato evidenziato il ruolo chiave dell'alcol nella selettività dei carbammati (Tabella 18).⁽²⁷⁾

I risultati indicano con chiarezza che la bassa selettività del carbammato è strettamente legata alla capacità dell'alcol di ridurre i composti nitroarilici ad ammino derivati. Pertanto, l'impiego di un alcol che non può ridurre il nitroarene

aumenta notevolmente la selettività del carbammato. Successivamente è stato utilizzato il complesso binucleare a base di Rodio $[(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Rh}_2(\mu\text{-OH})_2]\cdot 2\text{C}_6\text{H}_6$ come catalizzatore efficace nella reazione di carbonilazione riduttiva dei nitrobenzeni a dare il corrispondente carbammato con una resa del 94% circa. Sono stati usati anche catalizzatori a base di Palladio (Tabella 18).

Tabella 18. Carbammati provenienti dalla carbonilazione riduttiva di composti nitro aromatici

| Entry | ArNO ₂ | ROH | Catalyst | Carbamate | Conv. (%) | Selectivity | Yield (%) |
|-------|---|----------------|---|---|-----------|-------------------------------|-------------------|
| | | | | | | ArNH ₂ vs ArNHCOOR | |
| 1 |  | <i>t</i> -BuOH | Rh(CO) ₄ ⁺ |  | 100 | 8/96 | ~ ¹²⁴ |
| 2 |  | <i>t</i> -BuOH | Ru ₃ (CO) ₁₂ |  | 100 | 3/97 | ~ ¹²⁴ |
| 3 |  | MeOH | $[(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Rh}_2(\mu\text{-OH})_2]$ |  | - | - | 94 ¹²⁵ |
| 4 |  | EtOH | PdCl ₂ (PPh ₃) ₂ |  | - | - | 80 ¹²⁷ |
| 5 |  | EtOH | PdCl ₂ (4-MePy) ₂ |  | - | - | 27 ¹²⁸ |

^aRh(CO)₄(PPN) o Ru(CO)₁₂ 0,2mmol, alcol 30ml, PhNO₂ (10 mmol), CO 400psi, 140°C. ^bPhNO₂ (2 mmol), $[(\text{Ph}_3\text{P})_4\text{Rh}_2(\mu\text{-OH})_2]\cdot 2\text{C}_6\text{H}_6$ (0,01 mmol), 2,2'-bipiridina (0,2 mmol) e alcol (30 mmol) in benzene anidro, CO 1000psi, 180°C. ^cPhNO₂ (0,10 mmol), etanolo (0,17 mol), 0,046g PdCl₂(PPh₃)₂, CO 425 psi, 180°C. ^dPhNO₂ (27 mmol), etanolo (20 ml), 180°C, CO = 580 psi.

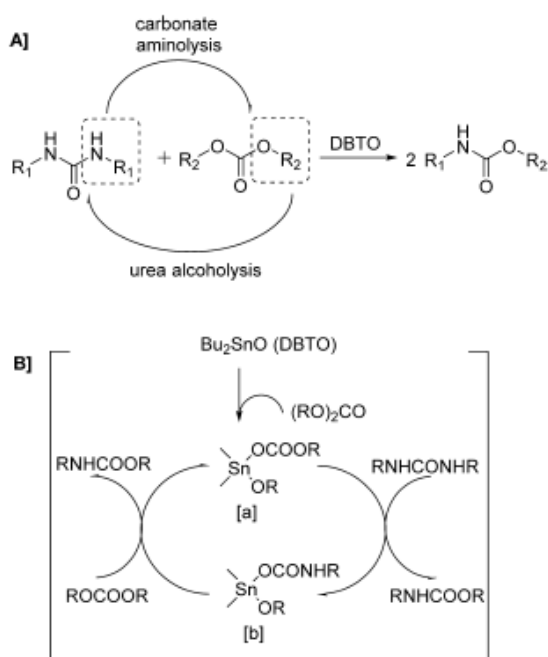
La sintesi di carbammati per mezzo della reazione tra urea e carbonato in presenza di DBTO come catalizzatore è stata descritta da Chaudari e collaboratori (Schema 16A, Tabella 19).⁽²⁸⁾

La reattività del carbonato sembra essere guidata dalla capacità dei gruppi uscenti, alcossidi e fenossidi, di formare il carbammato nell'amminolisi dei carbonati.

È stato visto che la basicità dell'urea svolge un ruolo importante nella attività catalitica di questa reazione. In realtà, uree alifatiche mostrano una maggiore reattività rispetto a quelle aromatiche a causa della loro maggiore basicità.

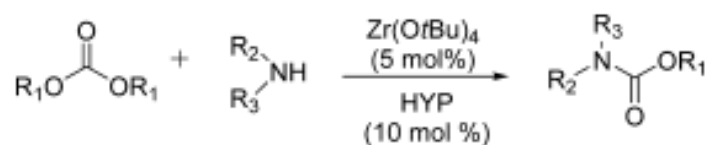
Il DBTO dovrebbe funzionare come specie nucleofila, attaccando così il carbonio carbonilico del carbonato, a generare una specie cataliticamente attiva, l'alcossi dibutil carbonato di stagno [a]. Come mostrato, la specie [a] interagisce con una molecola di urea N-sostituita, viene eliminata una molecola di carbammato e come prodotto di reazione si forma il dibutil alcossi carbammato di stagno [b]. Un'ulteriore reazione della specie [b] con un carbonato, provoca ulteriore formazione di un'altra molecola di carbammato con la rigenerazione della specie attiva [a] (Schema 16B).

Schema 16. Sintesi di carbammati tramite reazione tra uree e carbonati in presenza di DBTO



Anche Porco e collaboratori hanno studiato l'utilizzo di dialchil carbonati, quali sostituti più maneggevoli e non tossici del fosgene nella reazione di alcossicarbonilazione (Schema 17).⁽²⁹⁾

Schema 17. Sintesi di carbammati utilizzando dialchilcarbonati, con Zr^{+4} come catalizzatore della reazione

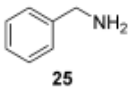
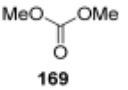
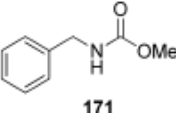
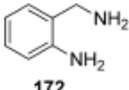
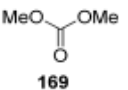
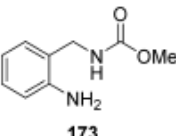
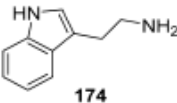
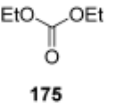
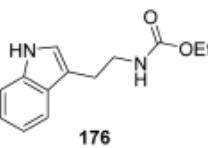
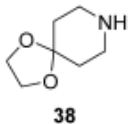
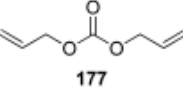
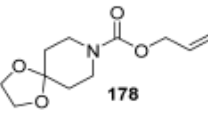


In particolare, gli autori hanno esaminato l'utilizzo di Zirconio (+4) come catalizzatore per ottenere carbammati partendo dal dialchil carbonato e ammina secondaria, impiegando nella reazione la 2-idrossi piridina (HYP) come catalizzatore aggiuntivo (Tabella 20).

Tabella 19. Carbammati provenienti dalla reazione tra uree e carbonati catalizzata da DBTO

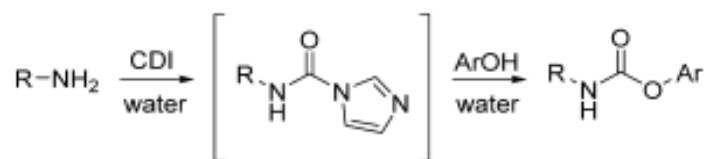
| Entry | Urea | Carbonate | Carbamate | Yield (%) |
|-------|------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | | | | 89 |
| 2 | | | | 90 |
| 3 | | | | 50 |
| 4 | | | | 91 |

Tabella 20. Carbammati provenienti dalla reazione catalizzata da Zr^{+4}

| Entry | Amine | Carbonate | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|---|-----------|
| 1 |  |  |  | 88 |
| 2 |  |  |  | 97 |
| 3 |  |  |  | 98 |
| 4 |  |  |  | 95 |

Recentemente, Padiya e collaboratori hanno riportato un metodo utile per la sintesi dei carbammati in un mezzo acquoso (Schema 18).

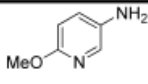
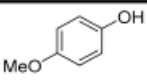
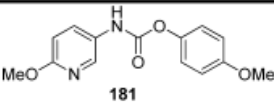
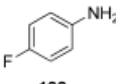

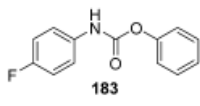
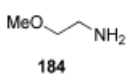

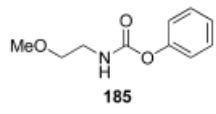
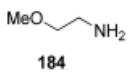
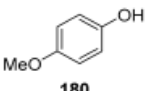
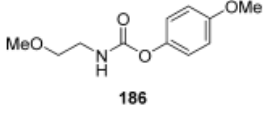
Schema 18. Sintesi di carbammati con l'utilizzo di CDI in un mezzo acquoso



Interessante il fatto che l'1,1'-carbonilimidazolo (CDI), anche se instabile in H_2O , reagisce rapidamente con le ammine in un mezzo acquoso a dare, con buone rese, le corrispondenti carbonilimidazolidi *N*-sostituite. Questo prodotto di reazione dalle ammine primarie reagisce *in situ* con un nucleofilo come il fenolo, (con un attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico e successiva uscita dell'anione

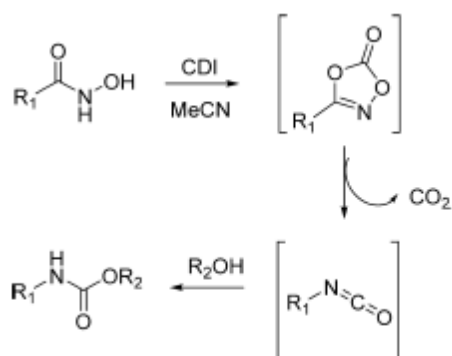
imidazolato) fornendo il corrispondente carbammato. Il prodotto precipita dalla miscela di reazione e può essere ottenuto in elevata purezza per filtrazione, rendendo il metodo semplice e riproducibile (Tabella 21).⁽³⁰⁾

Tabella 21. Carbammati provenienti dalla reazione di carbonilimidazolo in H₂O con ammine *in situ*

| Entry | Amine | Phenol | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|---|-----------|
| 1 |  179 |  180 |  181 | 75 |
| 2 |  182 |  112 |  183 | 78 |
| 3 |  184 |  112 |  185 | 98 |
| 4 |  184 |  180 |  186 | 73 |

Il CDI ha mostrato anche di mediare il riarrangiamento di Lossen, che avviene nella trasformazione di un acido idrossammico nel corrispondente isocianato (Schema 19).

Schema 19. Sintesi di carbammati tramite il riarrangiamento di Lossen mediato da CDI



Il metodo proposto è blando e sperimentalmente efficiente, essendo caratterizzato dalla formazione di CO₂ e imidazolo come unici sottoprodotti. Questo metodo è un'alternativa valida al riarrangiamento di Curtius e alla degradazione di Hoffman (Tabella 22). Recentemente è stato proposto un altro metodo basato sul riarrangiamento di Lossen. La metodologia prevede la reazione di un acido idrossammico con un alcol, promossa dalla presenza del 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TCT), detto anche cloruro cianurico, in presenza di un eccesso di *N*-metilmorfolina (NMM) (Schema 20, Tabella 22).

Schema 20. Sintesi di carbammati tramite riarrangiamento di Lossen mediato da TCT

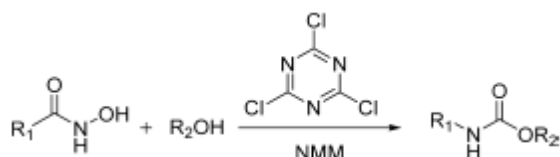
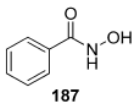
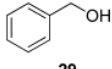
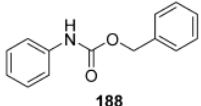
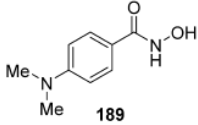
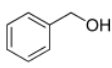
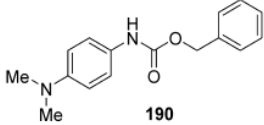
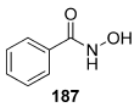
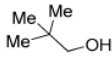
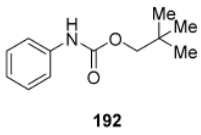
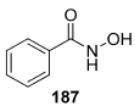
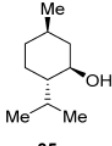
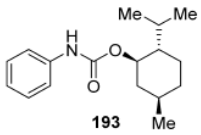


Tabella 22. Carbammati provenienti dal riarrangiamento di Lossen mediato da CDI e TCT

| Entry | Hydroxamic acid | Alcohol | Promoter | Carbamate | Yield (%) |
|-------|--|--|----------|---|-----------|
| 1 |  187 |  29 | CDI |  188 | 93 |
| 2 |  189 |  29 | CDI |  190 | 99 |
| 3 |  187 |  191 | TCT |  192 | 84 |
| 4 |  187 |  35 | TCT |  193 | 77 |

4. CARBAMMATI CON POTENZIALE CLINICO

I carbammati sono presenti in molti farmaci approvati dalla FDA, e questo suggerisce che tale dominio strutturale è una funzionalità chiave in numerosi farmaci con potenziale clinico. In questa parte della tesi verranno trattati i carbammati quale gruppo funzionale di composti presenti in terapia con varie applicazioni.

4.1 VARI CARBAMMATI CON RILEVANZA CLINICA

4.1.1. Rivastigmina

La rivastigmina (**194**, Figura 7) tartrato è un derivato carbammico che inibisce reversibilmente gli enzimi Acetilcolinesterasi (AChE) e Butirilcolinesterasi (BuChE), e agisce preferenzialmente nel SNC. È usata nel trattamento del morbo di Alzheimer di grado lieve o moderato, dove rallenta la progressione della malattia, nella demenza e nella demenza associata al morbo di Parkinson.⁽³¹⁾ Il farmaco può essere somministrato per via orale, o tramite l'applicazione di un cerotto transdermico che riduce gli effetti collaterali come nausea e vomito. La rivastigmina subisce un intenso metabolismo ad opera dell'enzima colinesterasi mediante idrolisi del carbammato, senza coinvolgimento dei principali isoenzimi del citocromo P450 (CYP450). Il metabolita può subire *N*-demetilazione, così come coniugazione. L'emivita della rivastigmina è di 1.5 h. Somministrata per via orale è ben assorbita, con una biodisponibilità intorno al 40% con una dose di 3mg.

4.1.2. Muraglitazar

Il Muraglitazar (**195**, Figura 7) contiene una funzione carbammica. È un nuovo potente, agonista non tiazolidindionico duale dei recettori PPAR- γ/α (Recettori della Proliferazione Perossisomiale), e si è mostrato capace di abbassare i livelli di glucosio e di lipidi *in vivo*, effetto combinato con un eccellente profilo ADME. In un test clinico a doppio cieco randomizzato, Muraglitazar ha portato a miglioramenti significativi delle concentrazioni ematiche di trigliceridi, colesterolo HDL, LDL e Apolipoproteina B, intorno alla dodicesima settimana. Muraglitazar ha ridotto maggiormente le concentrazioni di trigliceridi nel sangue

rispetto al Pioglitazone, indipendentemente dai livelli basali di trigliceridi. Il trattamento con Muraglitazar e Pioglitazone è stato associato con un lieve aumento (3-4%) del colesterolo LDL. Tuttavia lo sviluppo clinico del Muraglitazar è stato interrotto a causa di effetti collaterali cardiovascolari.⁽³²⁾

4.1.3. Roxifiban

Roxifiban (**196**) è un profarmaco carbammico con un metilestere. È un potente antagonista del recettore della glicoproteina IIb/IIIa, situato sulla superficie delle piastrine. L'acido libero (molecola attiva *in vivo*) derivante dall'idrolisi dell'estere metilico, ad opera delle esterasi, blocca il legame del fibrinogeno al recettore inibendo così l'aggregazione piastrinica e fornendo un meccanismo per la terapia antitrombotica. Tuttavia lo sviluppo clinico è stato interrotto nell'ottobre del 2001.

4.1.4. Entinostat

L'entinostat (**197**, MS-275) contiene un gruppo carbammico O-metilpiridinico. È un composto in fase di studio clinico per il trattamento di vari tipi di cancro. Entinostat inibisce preferenzialmente l'enzima istone deacetilasi 1 (HDAC1) con IC₅₀ di 300nM rispetto all'enzima HDAC3 (IC₅₀ = 8μM) e non ha attività inibitoria verso l'enzima HDAC8 (IC₅₀ > 100μM). Questo composto induce l'inibitore 1A (p21, CIP1, WAF1) della chinasi ciclina dipendente (CDK), rallentando così la crescita delle cellule tumorali, la loro differenziazione e lo sviluppo del tumore. Studi recenti suggeriscono che Entinostat può essere particolarmente utile come agente antineoplastico in combinazione con altri farmaci come la Doxorubicina (o adriamicina), antibiotico antineoplastico della famiglia delle antracicline.⁽³³⁾

4.1.5. Albendazolo e Mebendazolo

L'albendazolo (**198**, Albenza®) è un antielmintico ad ampio spettro. Subisce un rapido metabolismo epatico da parte degli enzimi microsomiali che, ossidandolo, producono il metabolita attivo Albendazolo Solfossido, che poi è successivamente ossidato dando due metaboliti inattivi, albendazolo solfone e albendazolo-2-ammino solfone.

Il Mebendazolo (**199**) è un derivato metil carbammico con attività antielmintica ad ampio spettro. Ha mostrato efficacia nel trattamento orale di ascariasi, uncinariasi, ossiuriasi e tricuriasi. Come altri antielmintici benzimidazolici, il

principale meccanismo d'azione di questa molecola consiste nel legame con la tubulina. Lo sviluppo clinico del mebendazolo è stato interrotto nel 2011.

4.1.6. Flupirtina e Retigabina

La Flupirtina (**200**) e la Retigabina (**201**) sono derivati etilcarbammici. La Flupirtina è un analgesico centrale non oppioide⁽³⁴⁾ che è stato identificato all'interno di un programma volto alla scoperta di nuovi farmaci antiepilettici dal National Institutes of Health (NIH) negli Stati Uniti. Le dosi utilizzate nelle prove cliniche hanno superato quelle necessarie per l'attività analgesica. Sulla base di questi risultati, la successiva ottimizzazione strutturale ha portato all'ottenimento della Retigabina. Questa ha proprietà anticonvulsivanti che sembrano essere mediate dall'apertura o dall'attivazione a livello centrale dei canali del potassio a dipendenza di voltaggio. La Flupirtina ha mostrato proprietà antagoniste del recettore N-metil-D-aspartato (NMDA).

4.1.7. Felbamato

Felbamato (**202**, Felbatol®) è un fenil-dicarbammato, con attività antiepilettica. Ha un duplice meccanismo d'azione che coinvolge l'inibizione del recettore NMDA e una modulazione positiva sul recettore GABA_A riducendo così l'eccitazione neuronale. È rapidamente assorbito ($t_{max} = 2-6h$) con una biodisponibilità per via orale > 90%. Subisce un moderato metabolismo da parte degli isoenzimi CYP3A4 e CYP2E1 che sono suscettibili a effetti di induzione e inibizione. L'uso clinico di Felbamato è diminuito negli ultimi 2 anni a causa dei suoi gravi effetti collaterali, come anemia aplastica e insufficienza epatica.

4.1.8. Efavirenz

Efavirenz (**203**, Sustiva®) è un derivato carbammico ciclico. È un inibitore non nucleosidico della trascrittasi inversa (NNRTI), un enzima prodotto dal virus HIV che permette a quest'ultimo di infettare le cellule dell'organismo e produrre più virus. Efavirenz è utilizzato nella terapia antiretrovirale altamente attiva (HAART). Tuttavia il suo utilizzo è associato a risposte variabili al trattamento e ad effetti collaterali, nella maggior parte a causa delle grosse differenze di farmacocinetica.⁽³⁵⁾ Il CYP2B6 è il principale enzima che catalizza il meccanismo di clearance di Efavirenz *in vivo*, idrossilandolo in posizione 8 e formando l'8-idrossi-efavirenz, responsabile degli effetti collaterali a livello del SNC

(decadimento cognitivo).

4.1.9. Zafirlukast

Zafirlukast (**204**, Accolate ®) È un derivato ciclopentil-N-aril carbammico. È un antagonista selettivo e competitivo dei recettori dei leucotrieni, in particolare del recettore dei cisteinil-leucotrieni D4-E4 (LTD4, LTE4), indicato per la profilassi ed il trattamento dell'asma cronica. Sostituzioni bioisosteriche $O \rightarrow CH_2$ e $O \rightarrow NH$ hanno fornito analoghi potenti dello Zafirlukast.. Il dominio carbammico presente nella molecola fornisce un eccellente profilo sia *in vivo* che *in vitro* e un'elevata biodisponibilità nella somministrazione per via orale.⁽³⁶⁾ Questa molecola subisce un ampio metabolismo epatico in cui l'idrossilazione da parte del CYP2C9 è la principale via metabolica. I metaboliti dello Zafirlukast non contribuiscono in maniera significativa alla sua attività complessiva (sono 90 volte meno potenti dello zafirlukast).

4.1.10. Mitomicina C

La Mitomicina C (**205**, Mutamicin ®) è un derivato carbammico complesso. È un antibiotico antitumorale non selettivo, che è stato individuato negli anni '50 nella fermentazione delle colture del batterio *Streptomyces Caespitosus*. La mitomicina C è un agente alchilante, sito specifico, che inibisce la divisione delle cellule tumorali, legandosi al DNA e provocandone la frammentazione. Tuttavia, studi recenti indicano che il DNA potrebbe non essere il target principale del farmaco. In particolare, è stata proposta un'interazione della Mitomicina C con rRNA, con conseguente inibizione della traslazione proteica.⁽³⁷⁾ La Mitomicina C è comunemente usata come agente chemioterapico nel trattamento di vari tipi di cancro come quello alla vescica, colon e tumori al seno.

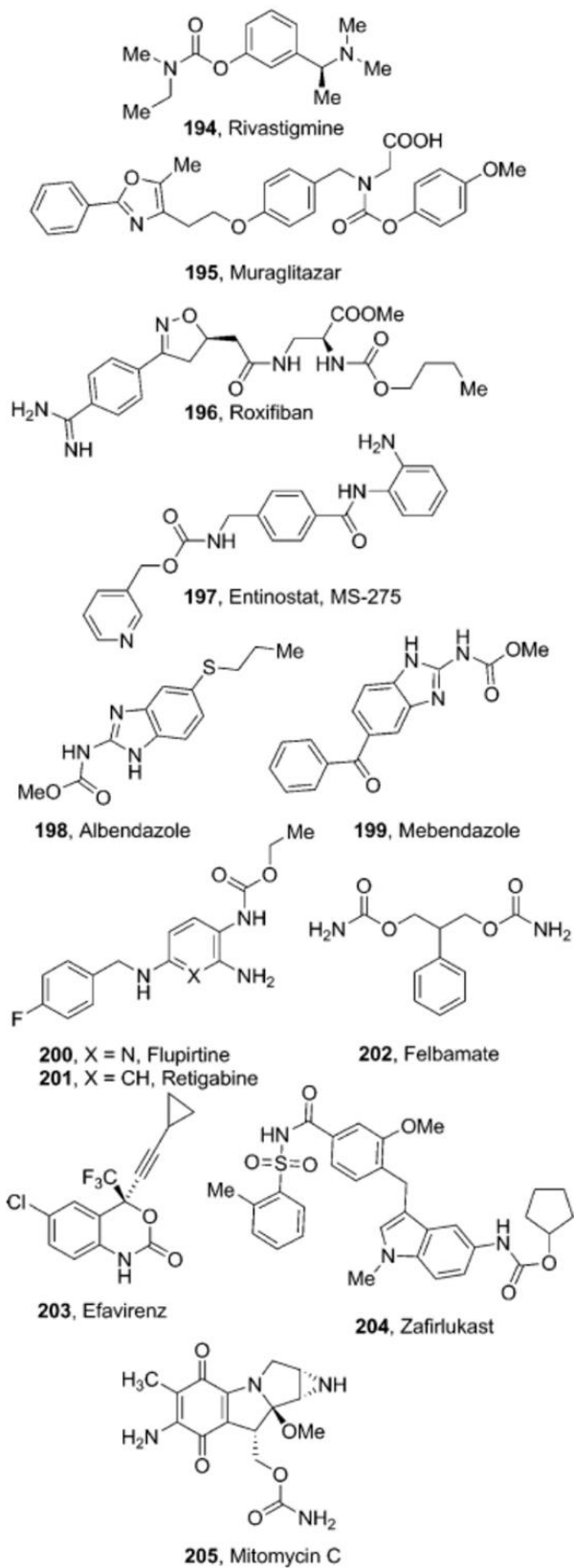


Figura 7. Carbammati con potenziale clinico

4.2. CARBAMMATI TERAPEUTICI QUALI INIBITORI DELLA PROTEASI DELL'HIV

L'HIV-proteasi è l'enzima responsabile della scissione del precursore gag e gag-pol in proteine mature e funzionali essenziali per la produzione delle infezioni virali.

L'inattivazione dell'HIV1-proteasi sia per mutazione che per inattivazione chimica provoca la formazione di cellule virali immature e non infette. Di conseguenza, questo enzima è un target importante per la terapia antivirale. L'HIV-proteasi consiste di due catene peptidiche identiche, ognuna costituita da 99AA che formano un omodimero simmetrico, in cui ciascuna subunità proteica (monomero) contiene un residuo della sequenza Asp25-Thr26-Gly27, localizzato alla base della tasca dove si lega il substrato, nel sito attivo. L'analisi cristallografica a raggi X della proteina nativa e dei complessi proteina-ligando e la vasta ricerca di altri residui Aspartil proteasici come la renina umana, hanno facilitato la scoperta di nuovi farmaci inibitori dell'HIV-proteasi.⁽³⁸⁾ La FDA ha approvato un certo numero di farmaci inibitori dell'HIV-proteasi, contenenti un gruppo carbammico. I farmaci inibitori di questa proteasi attualmente approvati sono riportati nella figura 8.

4.2.1. Ritonavir

Il Ritonavir (**206**, Norvir, ABT-538) contiene un gruppo 4-metil-tiazol-carbammico. È un inibitore peptidomimetico sia della HIV1-proteasi che della HIV2-proteasi ed è stato approvato nel 1996 dalla FDA. La scoperta del Ritonavir si è basata su studi su subunità diamminiche C₂-simmetriche. Il Ritonavir ha mostrato un EC₅₀ di 0025μM, biodisponibilità del 78% e un'emivita di 1,2h. Ritonavir ha un alto PM, tuttavia ha mostrato eccellenti proprietà farmacocinetiche. Questo è probabilmente dovuto all'aumento di stabilità dei gruppi tiazolici al metabolismo ossidativo ed anche ai suoi effetti sugli enzimi ossidativi del Citocromo P450. Ritonavir è un ligando del gruppo eme di tipo II, che si lega alla cavità del sito attivo del CYP3A4, e si lega irreversibilmente al ferro attraverso l'N tiazolico. Inibendo il CYP3A4, Ritonavir aumenta le concentrazioni plasmatiche degli altri farmaci anti-HIV, ossidati da CYP3A4, migliorando così la loro efficacia clinica.

4.2.2. Amprenavir

Amprenavir (**46**, agenerase ®, VX-478.) è un derivato tetraidrofuranyl carbammico. È stato approvato dalla FDA nell'aprile del 1999. Amprenavir è stato identificato come un potente inibitore HIV-1-proteasico, biodisponibile per via orale, avente basso PM e un IC₅₀ di 12 nM. È commercializzato in un formato con posologia di due volte al giorno. La sua struttura presenta un tetraidrofuranyl carbammato che forma un legame debole con i residui della proteasi ASP29 e 30.⁽³⁹⁾ Studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che Amprenavir viene principalmente metabolizzato dal CYP3A4, e che i due principali metaboliti derivano dall'ossidazione dell'anello tetraidrofurano e della funzione anilina.

4.2.3. Atazanavir

Atazanavir (**207**, atazanavir solfato, BMS-232632) è un derivato metilcarbammico, con una catena centrale idrossi-etan-idrazidica. È un inibitore della HIV-proteasi di seconda generazione sviluppato alla fine degli anni '90 e approvato dalla FDA nel giugno 2003. Atazanavir contiene due funzioni metilcarbammiche. Ha una potente attività inibitoria (K_i= 2,66 nM) e ha una potenza antivirale verso le cellule MT2 HIV infette con un IC₅₀ di 26 nM.⁽⁴⁰⁾ Ha mostrato un'eccellente biodisponibilità ed il suo profilo farmacologico favorevole rende possibile una unica somministrazione giornaliera.

4.2.4. Darunavir

Darunavir (**48**, DRV TMC-114) possiede un gruppo funzionale di bis-tetraidrofuranyl carbammico. È un inibitore dell'HIV-proteasi di nuova generazione, con biodisponibilità, potenza e proprietà farmaceutiche migliori, e mantiene l'elevata potenza anche in ceppi di HIV-1 che danno farmaco resistenza. Il Darunavir è stato progettato in modo da massimalizzare la formazione di legami ad idrogeno con il sito attivo della proteasi. Questo farmaco forma legami a idrogeno con residui Asp29 e Asp30 dell'enzima proteasi.⁽⁴¹⁾ Solo la funzione Ar-NH₂ forma un legame a idrogeno con l'Ossigeno carbonilico del residuo Asp30. Il gruppo bis-tetraidrofuranyl uretano è risultato essenziale per l'affinità verso l'enzima in quanto introduce un legame con l'Ossigeno carbonilico della catena di Gly48 e tale contatto non si verifica con l'Amprenavir. Il legame che si forma tra bis-THF e gli atomi della catena principale di Asp29 e Asp30 sembra essere

importante per la potenza del DRV contro ceppi HIV multi-resistenti e anche contro isolati tipi di HIV. DRV ha ricevuto l'approvazione della FDA nel 2006 per il trattamento di pazienti affetti da HIV e varianti dell'HIV-1 farmaco-resistenti. Nel 2008 questo farmaco ha ricevuto piena approvazione per il trattamento della sintomatologia in adulti e bambini. Il Darunavir è metabolizzato dal CYP3A4 (formando 3 metaboliti attivi, ma con potenza inferiore alla molecola iniziale), tuttavia in presenza di una bassa dose di Ritonavir (100mg, 2 volte al giorno) Darunavir presenta proprietà farmacocinetiche eccellenti nei pazienti, e la biodisponibilità passa dal 37% all'80%.

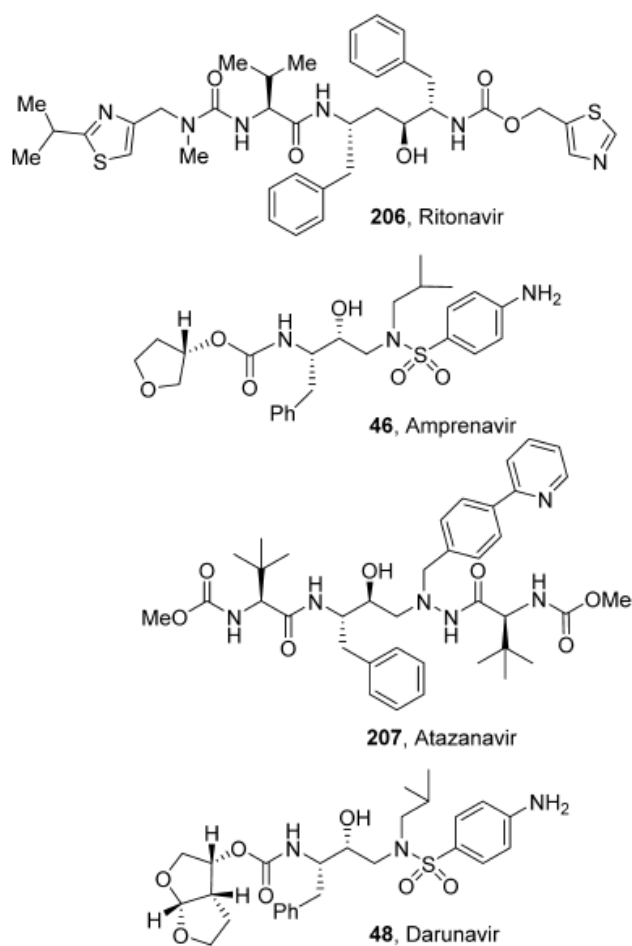


Figura 8. Principali inibitori HIV-proteasici contenenti funzioni carbammiche.

5. PROFARMACI CARBAMMICI E LORO METABOLISMO

Il profarmaco è una molecola biologicamente inattiva che, una volta introdotta nell'organismo, subisce *in vivo* delle trasformazioni chimiche, in genere ad opera di enzimi, che rilasciano la molecola attiva. Il profarmaco è quindi un precursore del principio attivo. Questa è una strategia ormai ben conosciuta per migliorare le proprietà del farmaco (proprietà fisicochimiche, biofarmaceutiche o farmacocinetiche) o, in generale, di un composto di rilevanza farmacologica per aumentare il suo profilo *drug-like*.⁽⁴²⁾ Infatti, la strategia dei profarmaci aiuta a superare vari ostacoli, come: (i) scarso assorbimento per *os* e scarsa solubilità in acqua, (ii) scarsa solubilità nei lipidi, (iii) instabilità chimica, (iv) rapido metabolismo pre-sistemico, (v) tossicità, irritazione locale e (vi) mancato rilascio nel sito attivo. Un gruppo funzionale del composto iniziale può essere usato per formare un legame chimico e mascherare così il gruppo attivo del farmaco. Generalmente il legame dovrebbe essere auto-rimovibile o facilmente scindibile, in modo che il principio attivo venga rilasciato spontaneamente o sotto certe condizioni di attivazione, come la presenza di un enzima o cambiamenti di pH. Il gruppo funzionale legato al farmaco di partenza conferisce la possibilità di migliorare le proprietà del farmaco o di superare le barriere per distribuire il farmaco alle sue cellule bersaglio.

I carbammati sono gli esteri dell'acido carbammico (RNHCOOH), utilizzati preferenzialmente nella progettazione di profarmaci, al fine di ottenere la stabilità idrolitica di primo passaggio e sistemica. I carbammati sono più stabili rispetto agli esteri, ed in generale più suscettibili all'idrolisi rispetto alle ammidi.

Così la bioconversione di un profarmaco carbammico richiede enzimi esterasici per il rilascio del principio attivo. Dopo l'idrolisi, gli esteri carbammici rilasciano la funzione fenolica o alcolica del farmaco e l'acido carbammico (RNHCOOH), che, a causa della sua instabilità chimica, si scinde nella corrispondente ammina più anidride carbonica.

Carbammati con ammine primarie ($\text{RNHCOOR}'$) possono anche trasformarsi in isocianati (RNCO) e alcol per trattamento con basi, come ulteriore via per la degradazione metabolica.

L'idrolisi OH-catalizzata degli esteri carbammici ($R'-NHCO-OR$) è fortemente dipendente sia dalla pK_a del protone del gruppo uscente (ROH) che dal grado di sostituzione sull'azoto del carbammato. Poiché i fenoli hanno una pK_a inferiore rispetto a quella degli alcol, i carbammati fenolici saranno chimicamente più labili rispetto a quelli degli alcol. Nel caso degli alcol, sia la N-sostituzione sull'ammina carbammica che la N,N-disostituzione, conferiscono stabilità verso l'idrolisi. Nei fenoli, i carbammati N,N-disostituiti sono chimicamente stabili, mentre gli N-monosostituiti sono più predisposti all'idrolisi. Sono stati usati anche carbammati di breve durata come profarmaci di ammine eteroaromatiche (es: Capecitabina **217**) e amidine (Lefradafiban **221** e Dabigatran).⁽⁴³⁾

5.1 PROFARMACI CARBAMMICI DI ALCOL E FENOLI

Molti dei profarmaci carbammici di rilevanza terapeutica sono stati progettati quali substrati di enzimi specifici. La terapia a base di enzimi attivatori di un profarmaco accoppiati ad anticorpi monoclonali diretti contro antigeni specifici della superficie della cellula bersaglio (ADEPT) e la terapia a base di enzimi attivatori di un profarmaco accoppiati a geni (GDEPT) sono nuove strategie per combattere i tumori. La carbossipeptidasi G2 (CPG2), un enzima di origine batterica, ha mostrato la capacità di catalizzare la scissione di legami ammidici, ureidici e uretanici tra l'acido glutammico ed il gruppo aromatico. Sulla base di questa specificità, sono stati progettati e sintetizzati numerosi profarmaci per la CPG2. Come mostrato nella figura 9, il profarmaco ZD2767P (**208**) è attivato tramite idrolisi del legame carbammico dalla carbossipeptidasi G2 nella corrispondente molecola attiva 4-[N,N-bis(2-iodoetil)ammino]fenolo **209**. Il composto **208** ha mostrato il miglior profilo in termini di cinetica enzimatica, citotossicità e efficacia in vivo. È stato selezionato per lo sviluppo clinico. L'emivita di questo composto è di circa due minuti, sufficiente per la diffusione nelle cellule tumorali dal sito di rilascio e per minimizzare gli effetti periferici citotossici.⁽⁴⁴⁾

L'Irinotecan è stato progettato per rilasciare la camptotecina quale principale inibitore della topoisomerasi I nella terapia anticancro. L'Irinotecan cloridrato **210** (CPT-11, Camptosar ®) è un profarmaco carbammico solubile in soluzione

parenterale acquosa, profarmaco dell'inibitore della topoisomerasi I **211** SN-38 (7-etil-10-idrossi-camptotecina). La potente attività antitumorale dell'Irinotecan è dovuta alla rapida formazione, *in vivo*, del metabolita attivo **211** (Figura 9) inibitore della Topoisomerasi 200 volte più attivo dell'Irinotecan. In questa molecola la funzione dipiperidinica ionizzabile è legata ad una funzione fenolica, tramite legame carbammico, migliorando così la solubilità complessiva in acqua.⁽⁴⁵⁾ La bioconversione in **211** avviene principalmente ad opera delle carbossiestarasi del sistema microsomiale del fegato, CES 1A1 e CES2 che rilasciano la funzione piperidinopiperidinica ionizzabile e **211**, la forma attiva del farmaco.

Al di là della riduzione della velocità di idrolisi enzimatica del profarmaco, si può ottenere una sostenuta azione farmaceutica anche con la riduzione della velocità del metabolismo del farmaco. Questo è il caso del Bambuterolo (**212**, Bambec®) un bis-dimetilcarbammato, profarmaco della Terbutalina (**213**), agonista dei recettori β 2-adrenergici, usata come broncodilatatore nel trattamento dell'asma. La funzione fenolica della Terbutalina è soggetta ad un rapido metabolismo presistemico. Nel Bambuterolo la protezione di questa funzione evita il metabolismo di primo passaggio intestinale ed epatico. Il profarmaco è inattivo, tuttavia dopo somministrazione orale, è lentamente convertito in Terbutalina, principalmente al di fuori dai polmoni, da una serie di reazioni di idrolisi e di ossidazione, catalizzate da colinesterasi plasmatiche (pChe) e dal Citocromo P450 (CYP450, Figura 9).⁽⁴⁶⁾ Questo permette una somministrazione di bambuterolo giornaliera, rispetto alle tre somministrazioni giornaliere di terbutalina.

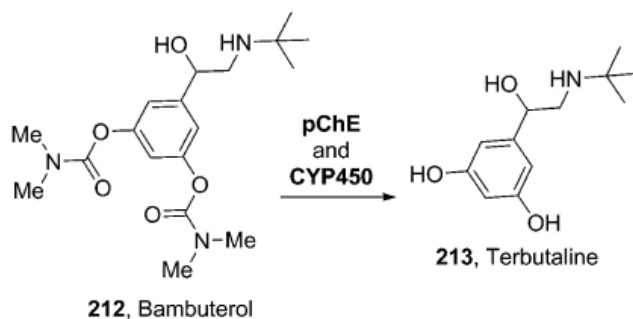
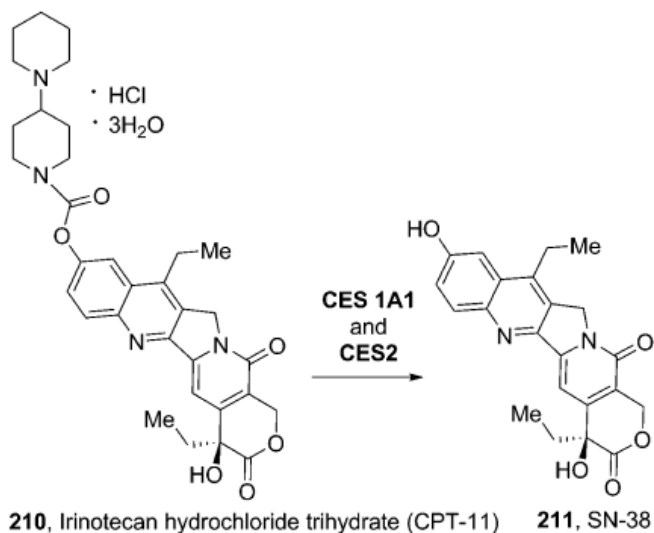
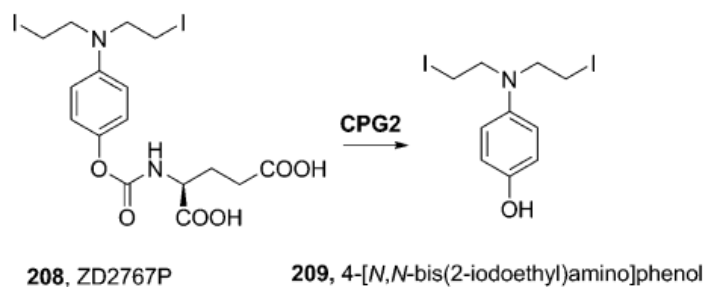
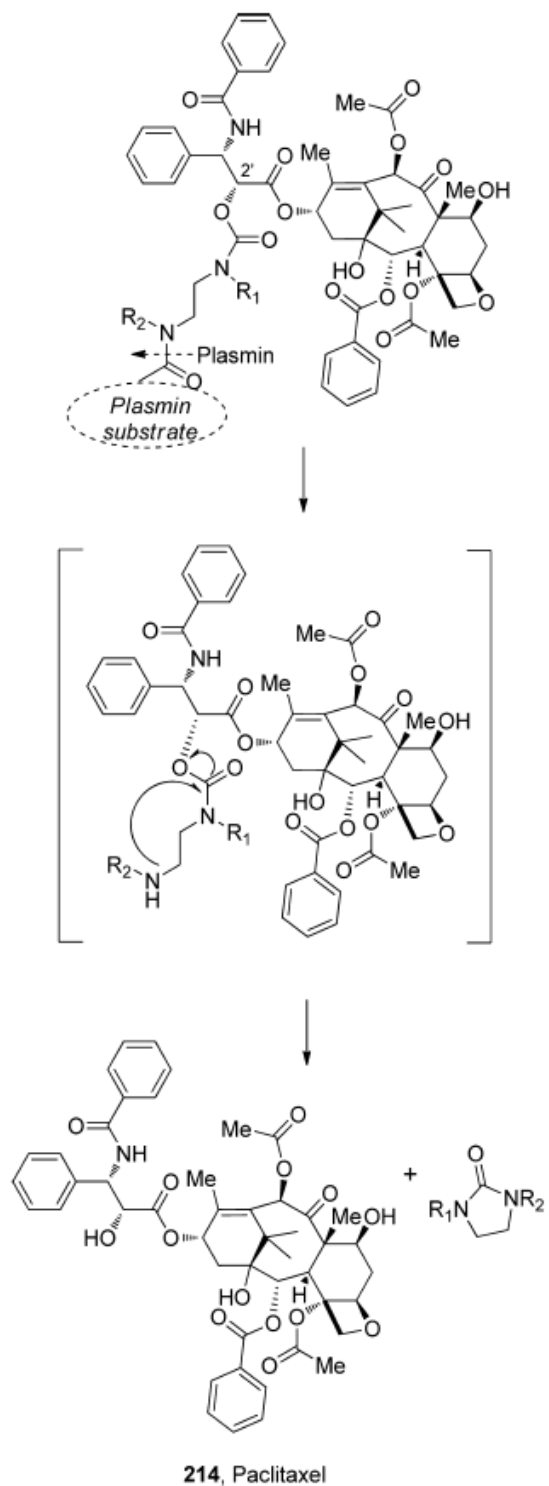


Figura 9. Esempi di profarmaci carbammici di fenoli e loro attivazione metabolica

Uno *spacer* quale la N,N'-dimetiletilendiammina, usata per la valutazione dei profarmaci basati su ciclizzazione-eliminazione di funzioni alcoliche o fenoliche, è stata utilizzata per lo sviluppo di profarmaci come parte della strategia di attivazione ADEPT. Quando viene attivato da uno specifico enzima, il gruppo amminico terminale dello *spacer* inizia una reazione di ciclizzazione

intramolecolare per eliminare un alcol o un fenolo situati sulla molecola di partenza, con il rilascio concomitante dello *spacer* ciclizzato. Scherren e collaboratori,⁽⁴⁷⁾ hanno utilizzato questa applicazione per i paclitaxel-2'-carbammati. Questo è particolarmente interessante perché un gruppo 2'-OH libero nella molecola è molto importante per l'attività biologica. In generale, il carbammato è più stabile *in vivo* rispetto ad esteri e carbonati. Poiché la forma attiva dell'enzima proteolitico plasmina è localizzata nelle cellule tumorali, collegando un farmaco citotossico ad un substrato dell'enzima si potrebbe ottenere il rilascio selettivo del farmaco nelle cellule tumorali. Sulla base di questo razionale, secondo l'idrolisi data dalla plasmina, ci si aspetta che lo *spacer* subisca una spontanea ciclizzazione intramolecolare della N,N'-dimetiletilendiammina a dare il derivato ureidico ciclico (imidazolidinone) rilasciando così la molecola attiva Paclitaxel (Schema 21).

Schema 21. Idrolisi della plasmina e successiva ciclizzazione del N,N'-dimetiletilendiammina con rilascio del Paclitaxel



5.2 PROFARMACI CARBAMMICI DI AMMINE E AMMIDINE

Il gruppo amminico è uno dei gruppi funzionali più comuni in molti farmaci approvati. Le ammine nei farmaci possono causare ostacoli fisico-chimici che potrebbero limitare la loro sicurezza ed un efficace rilascio nei siti di azione desiderati. Perciò è stata progettata una varietà di profarmaci di ammine per superare i problemi di formulazione e di rilascio. La funzione carbammica è stata utilizzata nella progettazione di profarmaci per ammine ed i carbammati meno stabili sono utilizzati quali profarmaci di ammine eteroaromatiche e amidine.

Il Gabapentin (**216**, Neurontin[®], Figura 10) è un analogo strutturale dell'acido- γ -amminobutirrico (GABA). Si trova in commercio come anticonvulsivante e agente analgesico per il dolore neuropatico in generale. Mostra delle limitazioni, incluso l'assorbimento saturabile, l'alta variabilità individuale di risposta al farmaco, la mancanza di proporzionalità della dose e una breve emivita. Gabapentin enacarbil (**215**, XP13512) è un profarmaco carbammico del Gabapentin. Il profarmaco beneficia del trasportatore monocarbossilato di tipo 1 (MCT1). MCT1 è espresso in tutti i segmenti del colon e del tratto gastrointestinale superiore. Il profarmaco aiuta anche il trasportatore multivitaminico sodio-dipendente (SMV T) responsabile dell'assorbimento di nutrienti essenziali multipli.⁽⁴⁸⁾ Dopo l'assorbimento attraverso queste vie, il profarmaco è rapidamente convertito a Gabapentin da esterasi non selettive situate negli enterociti e in misura minore nel fegato. Durante la conversione a Gabapentin, ogni molecola di **215** forma CO₂, acetaldeide e isoburirrato (Figura 10). La biodisponibilità orale del profarmaco è risultata incrementata dal 25% all'84% nelle scimmie. È stata dimostrata anche proporzionalità nella dose nell'esposizione agli umani.

Nel 2011 la casa farmaceutica Xenoport ha ricevuto dalla FDA l'approvazione per (Horizant[®]) nel trattamento della sindrome da moderata a lieve delle gambe affaticate (RLS). Nel 2012 Horizant[®] è stato approvato anche per il trattamento della neuralgia postherpetica (PHN) negli adulti.⁽⁴⁹⁾

La Capecitabina (**217**, Xeloda[®]), è stata progettata per ottenere una buona selettività nella sua forma attiva, il 5-FluoroUracile (**220**, 5-FU). Questo è un profarmaco carbammico del 5-FU somministrabile per via orale, appartenente alla

classe dei carbammati fluoropirimidinici. Richiede una cascata di tre enzimi per la bioconversione nel farmaco attivo. La bioconversione enzimatica (Figura 10) inizia nel fegato dove le carbossilesterasi 1 e 2 (CES1 e CES2) rompono il legame carbammico. La Capecitabina è assorbita inalterata nell'intestino e la bioconversione nel fegato rilascia il farmaco biologicamente attivo. Allo stesso modo la sua bioconversione procede nelle cellule tumorali evitando così la tossicità sistemica. In particolare le restanti trasformazioni che portano al 5-FU sono catalizzate dalla citidina deaminasi e timidina fosforilasi. Quest'ultimo enzima è molto espresso nei tumori, fornendo così il rilascio selettivo di 5-FU nelle cellule cancerose.⁽⁵⁰⁾ L'assorbimento di Capecitabina è evidente, dal momento che il 95% della dose somministrata per via orale viene recuperata nelle urine. T_{max} di 5-FU si raggiunge in circa 1,5-2 h. La Capecitabina è attualmente approvata come farmaco di prima scelta per la terapia del carcinoma al colon retto e del carcinoma mammario, ed è inoltre approvato per l'uso in combinazione con altri farmaci antitumorali.

Derivati alcossicarbonilici possono essere utilizzati come profarmaci delle benzamidine. Ad esempio, il metossicarbonilmetil estere Lefradafibran (**221**, BIBU104) è convertito efficacemente nella molecola attiva, Fradafibran (**222**, BIBU 52), inibitore dell'aggregazione piastrinica, per somministrazione orale. Questo è stato rivelato dal monitoraggio delle concentrazioni plasmatiche di **222** e da studi *ex vivo* sull'aggregazione piastrinica. Lefradafibran è il profarmaco attivo per via orale del Fradafibran, antagonista del recettore della glicoproteina IIb / IIIa situato sulla superficie delle piastrine umane. Nella conversione del profarmaco Lefradafibran alla forma attiva Fradafibran sono coinvolte le esterasi, e non enzimi della famiglia del citocromo p450.

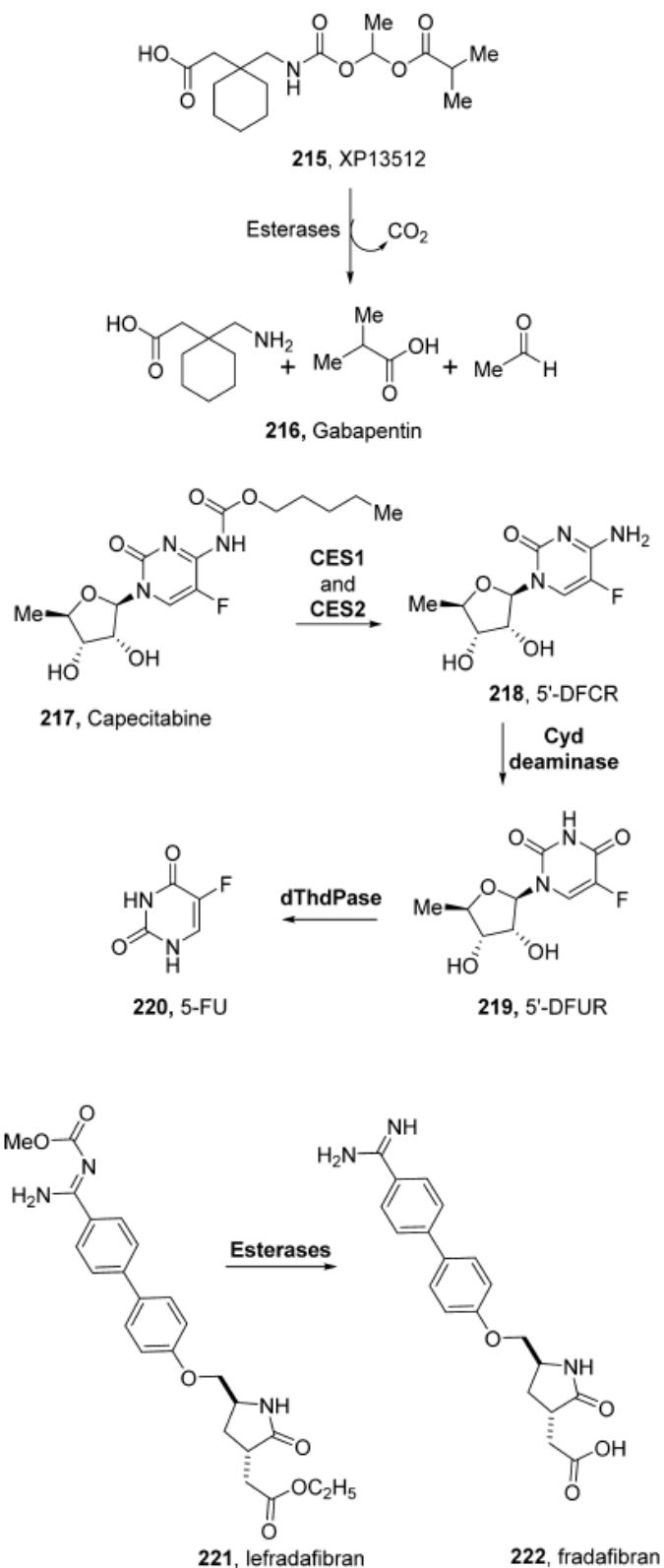


Figura 10. Esempi di profarmaci carbammici di ammine e ammidine e loro attivazione metabolica

6. DERIVATI ETEROCICLICI CARBAMMICI INIBITORI DELL'HIV-1 PROTEASI

Nel corso degli anni sono stati sviluppati nuovi inibitori della proteasi HIV-1, derivati eterociclici carbammici progettati sulla base delle strutture a raggi-X di complessi formati tra HIV-1 proteasi e inibitori.⁽⁵¹⁾ In questo ambito sono stati sviluppati *template* di derivati eterociclici stereochimicamente definiti in cui l'ossigeno dell'eterociclo potrebbe sostituire efficacemente l'ossigeno carbonilico del legame peptidico. I vantaggi di tale sostituzione sono migliorare la stabilità metabolica del composto e ridurre le caratteristiche peptidiche. Questi ligandi ciclici contengono nella loro struttura la funzione carbammica (Figura 11). Sulla base della struttura cristallina ai raggi X del Saquinavir (**223**) legato all'enzima HIV-1 proteasi, si è prima studiato la 3-(R)-tetraidrofuranilglicina in modo che l'ossigeno dell'anello 3(R)-THF potesse interagire con la funzione NH dell'Asp30, come succede con l'ossigeno carbonilico della catena laterale dell'asparagina del Saquinavir (composto **224**). Nel tentativo di ridurre il peso molecolare, è stata rimossa la chinolina in P3, e l'ammide è stata sostituita con un carbammato, a fornire l'inibitore HIV1-proteasico tetraidrofuranil carbammato **225**. La struttura cristallina ai raggi X del tetraidrofuranil carbammato **225** legato alla HIV-1 proteasi mostra che l'ossigeno del 3(S)-THF si trova alla distanza necessaria per formare un legame a idrogeno con la funzione NH dell'Asp29 nel subsito S2. L'importanza della funzione carbammica è evidente. L'NH del carbammato forma un legame a idrogeno con l'ossigeno carbonilico della Gly27, e la porzione carbonilica forma un legame a idrogeno coordinato da molecole di acqua con l'NH degli amminoacidi Ile50 e Ile50' situato nella regione flessibile del sito attivo dell'enzima.

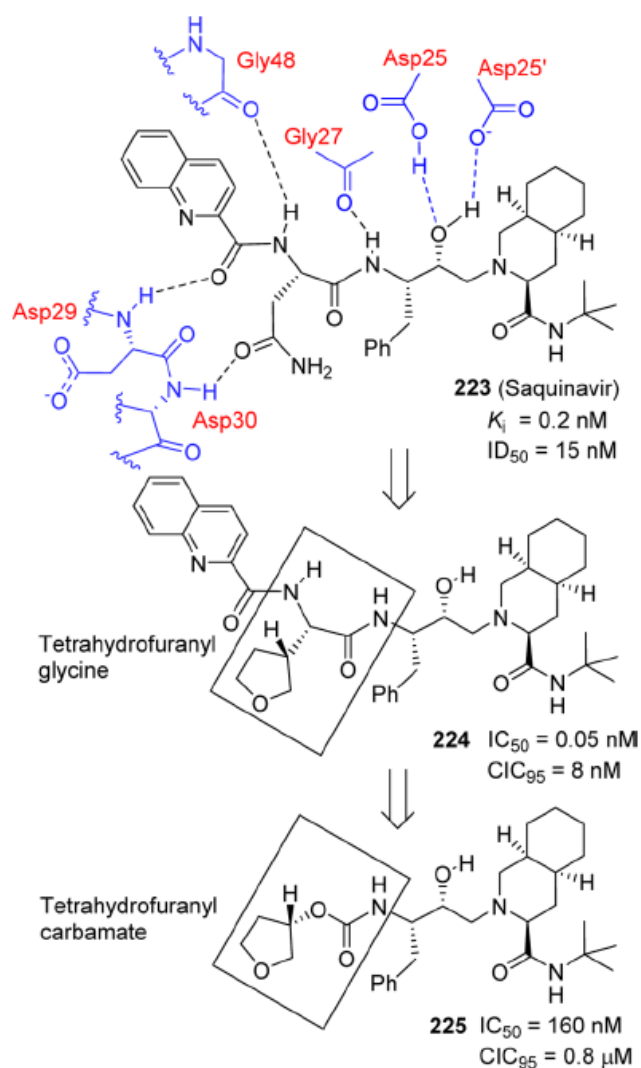
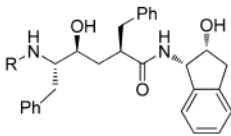
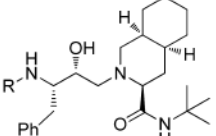
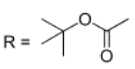
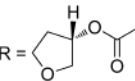
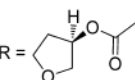


Figura 11. Evoluzione di 3-tetraidrofuranil carbammato come inibitore HIV-1 proteasico

Ulteriori studi su inibitori 3(S)-THF contenenti il gruppo isostero idrossietilenico hanno portato ad una serie di inibitori eccezionalmente potenti. Come mostrato nella tabella 23, i derivati 3-(S)-THF con la funzione carbammica (composti **226-231**) hanno mostrato un'elevata potenza inibitoria nei saggi antivirali. L'effetto di aumento della potenza del 3-(S)-THF carbammato è stato successivamente dimostrato in inibitori contenenti il gruppo isostero (R)-(idrossietil)-solfonammidico. Lo sviluppo clinico dell'inibitore HIV-proteasico **46**, (VX476), ha portato all'approvazione di Amprenavir per il trattamento di pazienti affetti da HIV/AIDS.

Tabella 23. Esplorazione di 3-Tetraidrofuranil uretani

| |  Hydroxyethylene isostere | | |  Hydroxyethylamine isostere | | |
|---|--|------------------|-------------------|---|------------------|-------------------|
| | Compound | IC ₅₀ | CIC ₉₅ | Compound | IC ₅₀ | CIC ₉₅ |
|  R = | 226 | 0.3 | 400 | 229 | >300 0 | 800 |
|  R = | 227 | <0.03 | 3 | 230 | 160 | - |
|  R = | 228 | 0.03 | 100 | 231 | 694 | - |

Sono stati progettati nuovi derivati carbammici inibitori dell'HIV-1 proteasi mediante l'inserimento di solfoni ciclici e gruppi biciclici all'interno della molecola (Figura 12, composti **232-237**).⁽⁵²⁾ Questi ligandi sono stati progettati per massimizzare le interazioni tramite legami a idrogeno con le strutture proteasiche e l'occupazione della tasca idrofobica nel subsito S2 dell'enzima. Sulla base della struttura ottenuta ai raggi X del Saquinavir legato alla HIV-1 proteasi, è stato progettato l'inserimento nella molecola di un anello tetraidrofuranico biciclico (bis-THF) per formare legami a idrogeno con i residui di Aspartato nel subsito S2 e per l'inserimento nella tasca idrofobica adiacente all'anello P3-chinolinico del Saquinavir. (Figura 12).

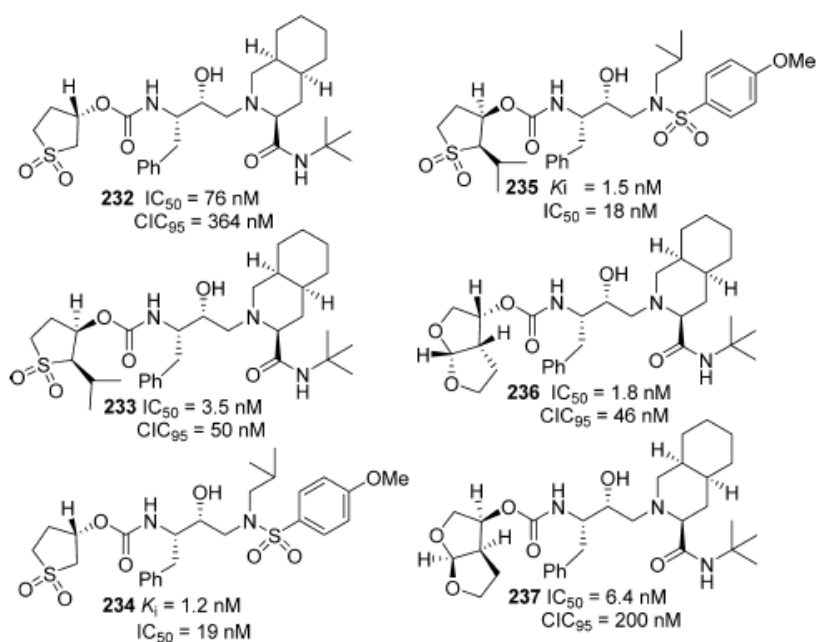


Figura 12. Ligandi solfonici ciclici e biciclici in derivati carbammici inibitori dell'HIV-1 proteasi

Un'analisi strutturale ai raggi X del composto **236** legato all'enzima HIV1-proteasi ha rivelato che l'anello biciclico bis-THF carbammico mima la maggior parte dei legami ammidici in P2 e P3 del Saquinavir. Uno studio dettagliato delle relazioni struttura-attività ha stabilito che la stereochimica del bis-THF e la posizione degli ossigeni nell'anello è cruciale per la potenza.

Con lo sviluppo di un bis-THF carbammato che potrebbe formare una rete di legami a idrogeno nel subsito S2 dell'HIV-1 proteasi, sono stati studiati gli isosteri che potrebbero essere funzionalizzati per formare legami a idrogeno nel subsito S2'. L'ipotesi di base è stata quella di progettare inibitori in grado di formare una rete di legami a idrogeno con la proteasi attraverso il sito attivo della HIV-1 proteasi dal subsito S2 al S2'. Questa strategia finalizzata a vincere la resistenza ai farmaci ha portato allo sviluppo di una serie di potenti inibitori carbammici della proteasi. Come mostrato in figura 13 il ligando bis-THF è stato incorporato nell'(R)-idrossietilsulfonammide isostero contenente la *p*-metossisulfonammide come ligando in P2' in modo che l'ossigeno metossilico possa interagire con l'aspartato nel subsito S2'. Gli inibitori ottenuti mostrano una

notevole potenza⁽⁵³⁾. Il (3R,3aS,6aR)-bis-THF (**239**) come ligando in P2 è significativamente più potente in un saggio antivirale rispetto al corrispondente inibitore bis-THF enantiomerico (**238**). Una struttura a raggi X del **239** legato ad HIV-1 proteasi ha rivelato che l'NH del carbammato forma un legame a idrogeno con il gruppo carbonilico della catena della Gly27 e che il carbonile carbammico del **239** è coinvolto in un legame a idrogeno tetra-coordinato tra una molecola di acqua, l'ossigeno della solfonammide e l'NH dell'Ile50 nella regione flap. Inoltre la struttura ha rivelato delle interazioni con i residui amminoacidici sia nel subsito S2 che nel S2'.

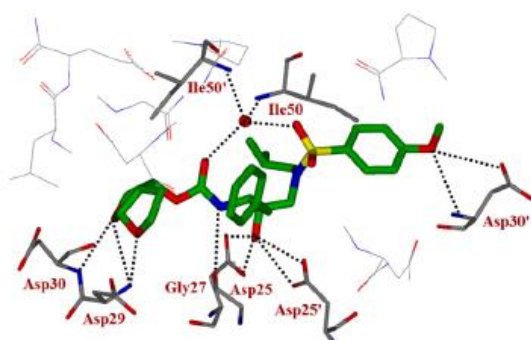
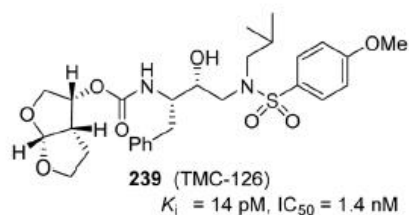
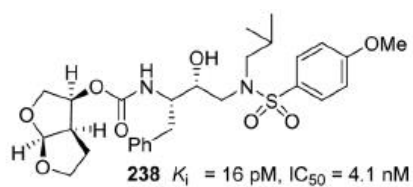


Figura 13 Progettazione di carbammati biciclici e struttura a raggi X dell'inibitore 239 legato alla HIV-1 proteasi

Un'ulteriore sostituzione del gruppo *p*-metossi, che interagisce con il subsito S2', con un gruppo *p*-amminico, ha portato all'inibitore **48** (Figura 14). Questo inibitore ha mostrato una marcata attività inibitoria enzimatica e anche attività antivirale. Uno studio antivirale approfondito ha rivelato che **48** ha mantenuto

un'eccellente attività verso varianti di HIV-1 proteasi che hanno sviluppato farmaco-resistenza. Gli studi ai raggi X di **48** legato all'enzima hanno mostrato notevoli interazioni nel sito attivo (Figura 14). In particolare, si forma una rete di legami a idrogeno con le catene peptidiche proteiche in tutto il sito attivo. Il Darunavir ha mostrato anche proprietà farmacocinetiche favorevoli. Successivamente, lo sviluppo clinico ha portato alla sua approvazione da parte della FDA per il trattamento dei pazienti malati di HIV/AIDS.⁽⁵⁴⁾

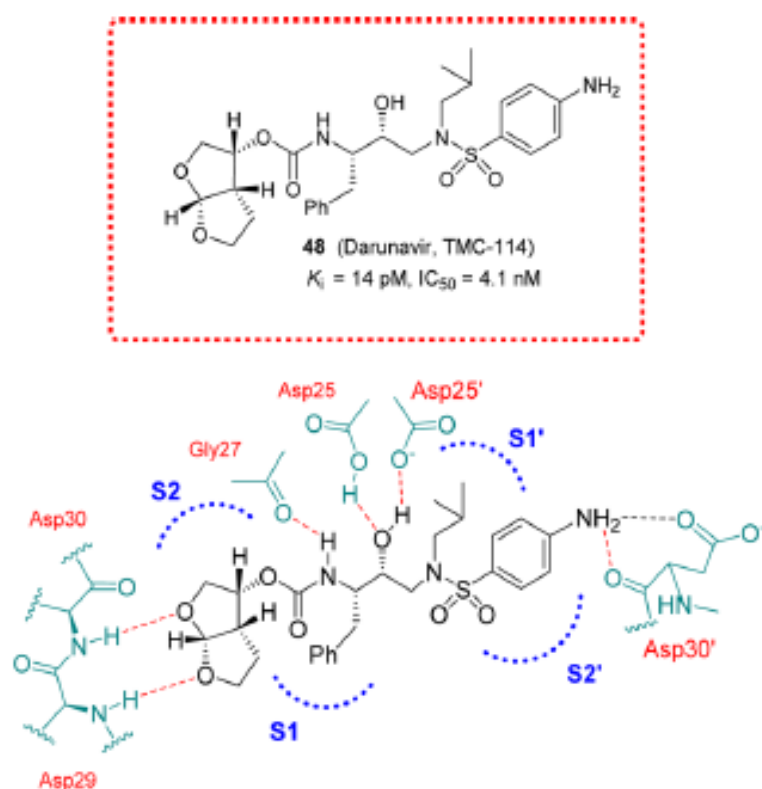
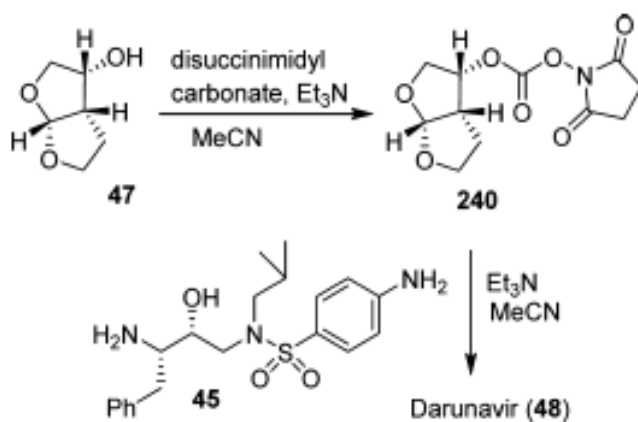


Figura 14. Darunavir e punto cruciale della struttura a raggi X del darunavir legato all HIV-1 proteasi con le principali interazioni

La sintesi del Darunavir, parte dal (3R,3aS,6aR)-3-(bis-THF), **47**, che trattato con disuccinimide carbonato fornisce il carbonato attivo **240**. La reazione di questo carbonato attivato con l'isostero idrossietilsulfonamide **45** fornisce il Darunavir (Schema 22).

Schema 22. Assemblaggio della funzionalità carbammica del Darunavir



Le strategie di progettazione di inibitori capaci di combattere la farmaco resistenza sono state ulteriormente utilizzate per consentire l'avanzamento in studi pre-clinici e clinici di un gran numero di altri inibitori carbammici. Nella figura 15 sono rappresentati derivati bis-THF carbammici selezionati (**241-244**) con spiccata attività enzimatica e antivirale. Come il Darunavir, le strutture a raggi X di questi inibitori legati all'enzima mostrano una rete di legami a idrogeno in entrambi i subsiti S2, S2' della HIV-1 proteasi. Le catene laterali dell'inibitore, così come la struttura bis-THF biciclica, si inseriscono in modo efficace nelle tasche idrofobiche del sito attivo dell'enzima.

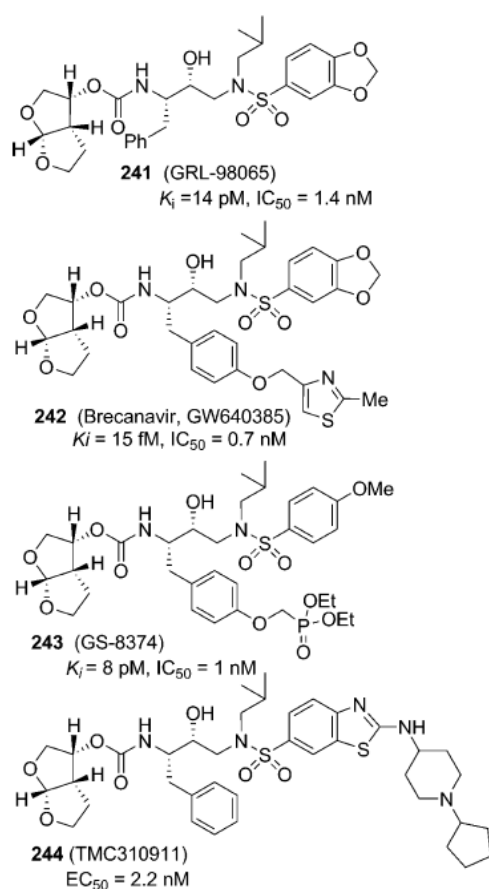


Figura 15. Derivati Bis-THF inibitori proteasici per lo sviluppo preclinico e clinico

Sono stati identificati un numero selezionato di derivati eterociclici carbammici, sviluppati sulla base dei dati di *binding* riportati nella figura 16. In particolare, l'inserimento di questi ligandi ossaciclici stereochimicamente definiti, come Cp-THF, Tp-THF, Tris-THF and fluoro-bis-THF ha fornito inibitori particolarmente potenti (**51** e **245-249**) con spiccato potenziale clinico. È da evidenziare l'importanza della funzione carbammica in questi inibitori. Strutture cristalline a raggi X di questi inibitori complessati con l'HIV-1 proteasi hanno fornito informazioni importanti sul legame nel sito di interazione responsabile della loro potenza antivirale contro enzimi *wild-type* e farmaco-resistenti. In generale, gli inibitori sono coinvolti in legami a idrogeno con i residui di Asp29, Asp30, Gly27, Asp25, Asp25' e Asp30' nel sito attivo dell'HIV-1 proteasi. Inoltre, gli anelli

ciclici si inseriscono perfettamente nelle tasche idrofobiche situate nel sito attivo.⁽⁵⁵⁾

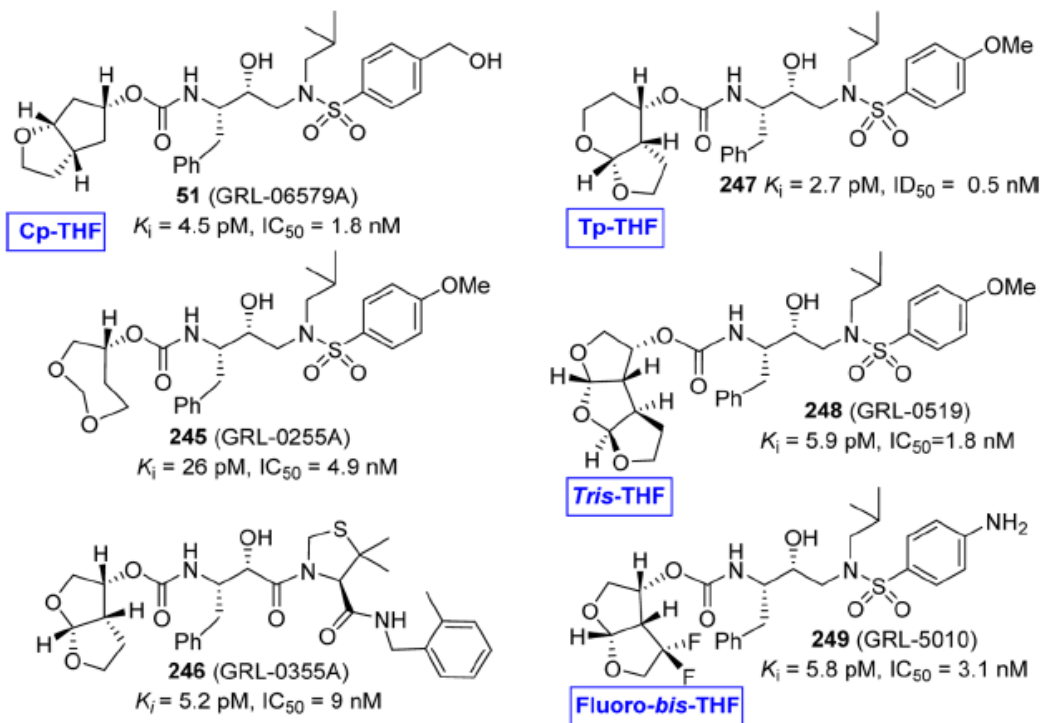


Figura 16. Nuovi inibitori proteasici derivati eterociclici carbammici

7. CARBAMMATI INIBITORI DELLA β e γ SECRETASI

La ricerca di un trattamento efficace per il morbo di Alzheimer resta una delle maggiori sfide in medicina. Una delle caratteristiche di questa malattia è la formazione di peptidi β -amiloidi (A- β) nella corteccia dei pazienti colpiti. Peptidi β -amiloidi sono generati dalla proteina di membrana APP tramite una scissione sequenziale da parte di due enzimi: β -secretasi (anche conosciuta come BACE1 o memapsina 2) e γ -secretasi. A causa del loro ruolo centrale nella produzione di peptidi β -amiloidi, entrambe le secretasi (β - γ) sono target terapeutici per la cura del morbo di Alzheimer. Di conseguenza, la progettazione e la sintesi di inibitori selettivi delle β -secretasi e γ -secretasi è diventata un'intensa area di ricerca nel corso degli anni.

7.1 SVILUPPO DI INIBITORI DELLA β -SECRETASI

In seguito alla scoperta della β -secretasi, Ghosh, Tang e collaboratori hanno progettato e sintetizzato gli inibitori di prima generazione di questo enzima. Come mostrato nella figura 17, utilizzando un derivato carbammico isostero di Leu-Ala **250**, sono stati identificati potenti inibitori pseudopeptidici (**251** e **252**).

La struttura cristallina a raggi X del **252** legato alla β -secretasi ha fornito una comprensione a livello molecolare delle interazioni presenti nel sito di legame.

L'analisi strutturale approfondita ha quindi fornito un *template* per la progettazione di altri farmaci e ha portato allo sviluppo della progettazione structure-based per l'ottenimento di inibitori peptidomimetici/nonpeptidici della β -secretasi.⁽⁵⁶⁾

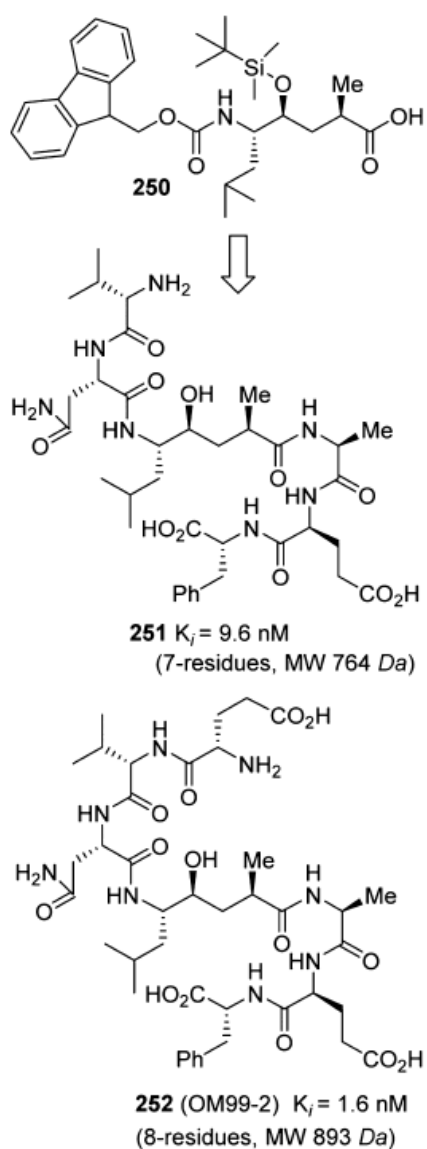


Figura 17. Sviluppo di pseudopeptidi inibitori della β -secretasi

La struttura raggi X di **252** legato alla β -secretasi ha mostrato che l'NH ammidico della catena laterale dell'Asparagina P2 forma un legame a idrogeno intermolecolare con l'ossigeno carbonilico dell'acido glutammico P4.

Sulla base di queste osservazioni a livello molecolare sono stati progettati e sintetizzati macrocicli a 14-16 membri contenenti cicloammidi-carbammiche.

Come mostrato nella figura 18 i derivati carbammici aciclici (**253** e **254**) hanno potenza minore rispetto ai loro corrispondenti inibitori ciclici. L'inibitore **255**, strutturalmente costituito da un macrociclico a 16 membri contenente una trans-

olefina, funzionalità ammidica e carbammica all'interno del macrociclo, ha mostrato una buona attività inibitoria verso la β -secretasi. Il corrispondente inibitore saturo (**256**) è meno potente verso BACE1, ma ha mostrato una maggiore potenza per l'enzima BACE2. Studi strutturali a raggi X dell'inibitore **256** legato alla secretasi hanno rivelato che il carbonile carbammico forma legami a idrogeno con la catena laterale carbossiammidica del Gln73. (Figura 18)

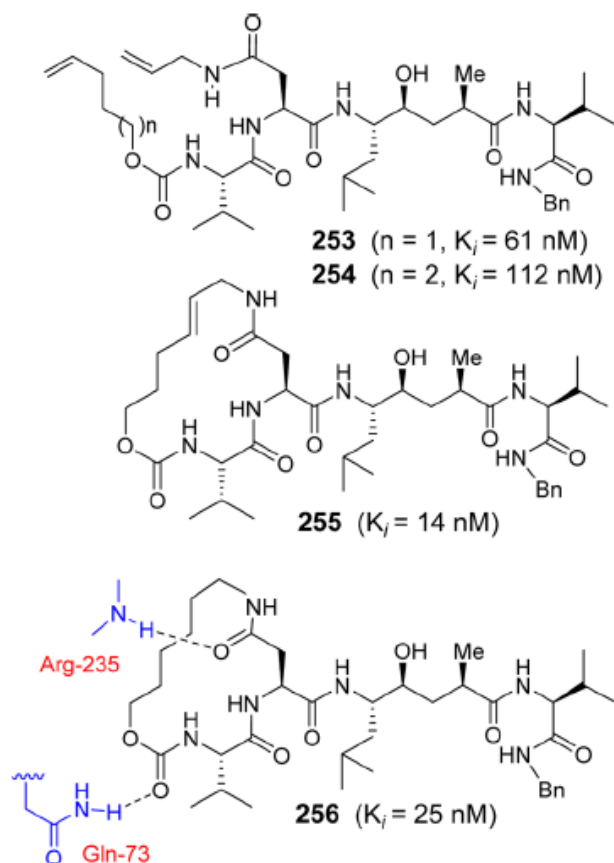


Figura 18. Carbammati macrociclici inibitori β -secretasici

Interessante notare che l'inibitore insaturo **255** ha mostrato una leggera selettività verso la β -secretasi ($K_i = 14$ nM). La progettazione di inibitori selettivi, è importante per ridurre la tossicità e gli effetti collaterali.

In particolare, la selettività verso le altre proteasi aspartiche come BACE2, pepsina, renina, catepsina D (Cat-D) e catepsina E, può essere importante per la riduzione degli effetti collaterali e l'aumento dell'efficacia del farmaco.

Sulla base di studi dettagliati delle relazioni struttura-attività e mediante analisi strutturale a raggi X, è stata progettata una serie di inibitori BACE1 altamente selettivi e potenti. In questa tesi vengono descritti solo gli inibitori di BACE1 con la funzione carbammica. Come mostrato nella figura 19, l'inibitore **257** è un potente inibitore BACE1, che però non mostra selettività per BACE2 o Catepsina D.

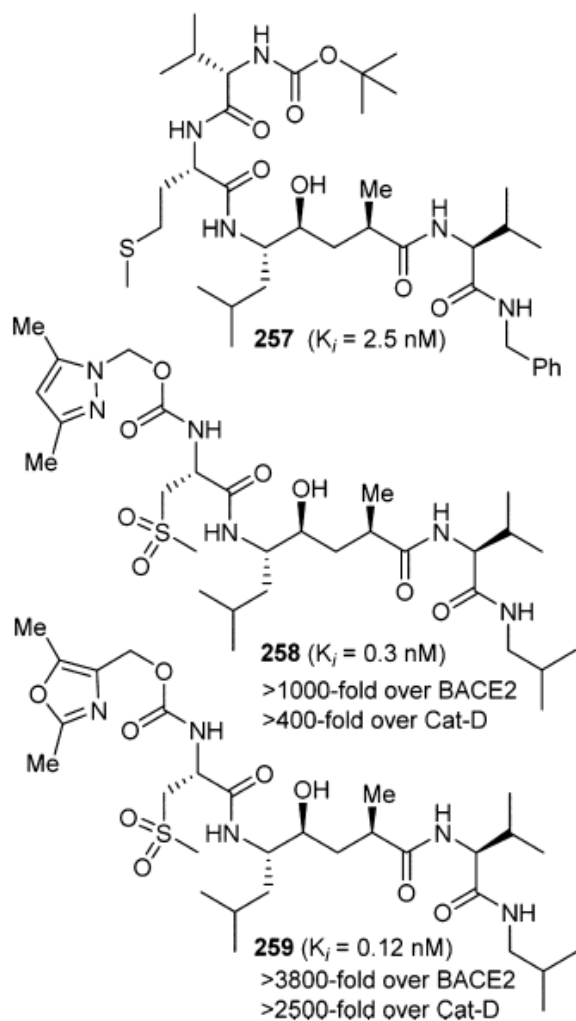


Figura 19. Derivati carbammici inibitori β -secretasici ad alta selettività

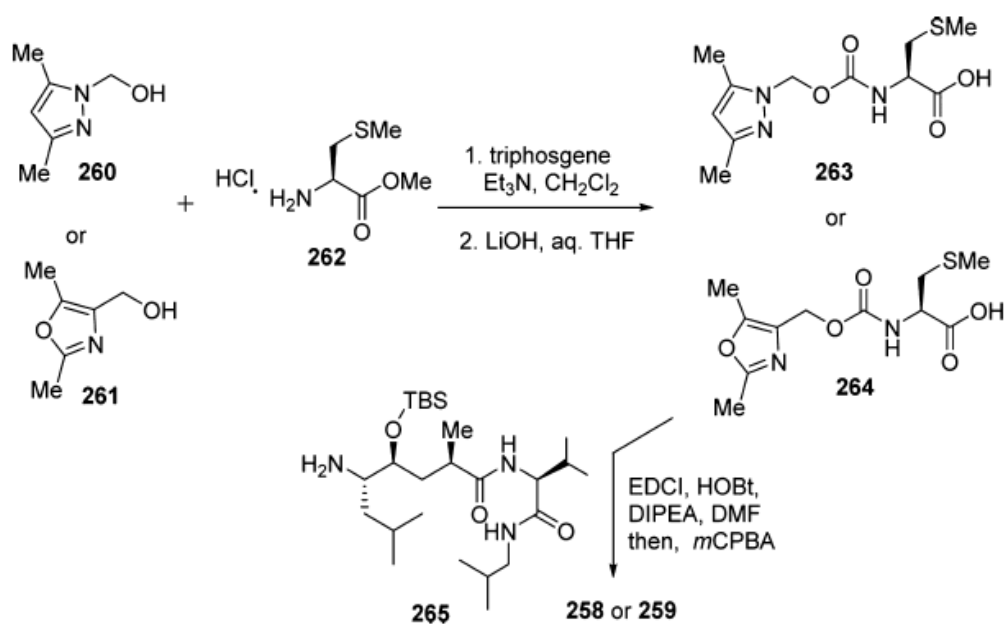
Successivamente, la progettazione structure-based ha portato allo sviluppo degli inibitori selettivi **258** e **259** che contengono rispettivamente i carbammati pirazometilici e ossazometilici in posizione P3.⁽⁵⁷⁾

L'inibitore **258** ha mostrato un'eccellente potenza e selettività verso l'enzima BACE1 rispetto a BACE2 e Catepsina D. La struttura a raggi X del composto **258** legato alla β -secretasi ha rivelato che il carbonile carbammico forma legami a idrogeno con il residuo NH della Thr-232. Anche l'N pirazolico forma forti legami a idrogeno con il gruppo ossidrilico della catena laterale della Thr-232. La funzione P2-solfonica forma un certo numero di legami a idrogeno, anche nel subsito S2. Sulla base di questa osservazione molecolare, è stato progettato il derivato ossazolico **259** al fine di ottenere un inibitore enzimatico più stabile e selettivo.

La sintesi degli inibitori **258** e **259** è riportata nello schema 23. Gli uretani **263** e **264** sono stati preparati per trattamento del 2,5-dimetilpirazolilmetanolo (**260**) o del 2,5-dimetil-4-ossazolilmetanolo (**261**) con trifosgene ed il metil estere della L-metionina cloridrata (**262**), in presenza di trietilammina. La saponificazione dei metilesteri fornisce i corrispondenti acidi. La reazione tra l'ammina **265** con gli acidi **263** e **264**, come già descritto, e la successiva ossidazione del solfuro a solfone grazie all'acido *m*-cloroperbenzoico fornisce gli inibitori **258** e **259** (Schema 23).

Freskos e collaboratori hanno descritto una serie di inibitori della β -secretasi che includono derivati con una funzione carbammica polare in P2.^(58,59) Questa strategia ha portato ad un aumento della selettività verso Cat-D, ed è stato ipotizzato che il subsito S2 della catepsina D possa essere più lipofilo e meno tollerante verso molecole polari.

Schema 23. Sintesi degli inibitori β -secretasici 258 e 259



Come si può vedere nella figura 20, il derivato benzilcarbammico **266** mostra una selettività 6 volte maggiore verso Cat-D. Tuttavia nel derivato polare 3-piridilmetilico **267** la selettività è aumentata di circa 90 volte. Il corrispondente derivato 4-piridilmetilico **268** fornisce una riduzione della selettività (di circa 50 volte). Il 3-(S)-tetraidrofuranil carbammato **269** ha mostrato una selettività di circa 30 volte maggiore su Cat-D. Questi inibitori hanno mostrato anche eccellenti valori di IC_{50} in cellule HEK (cellule renali embrionali in coltura tissutale).

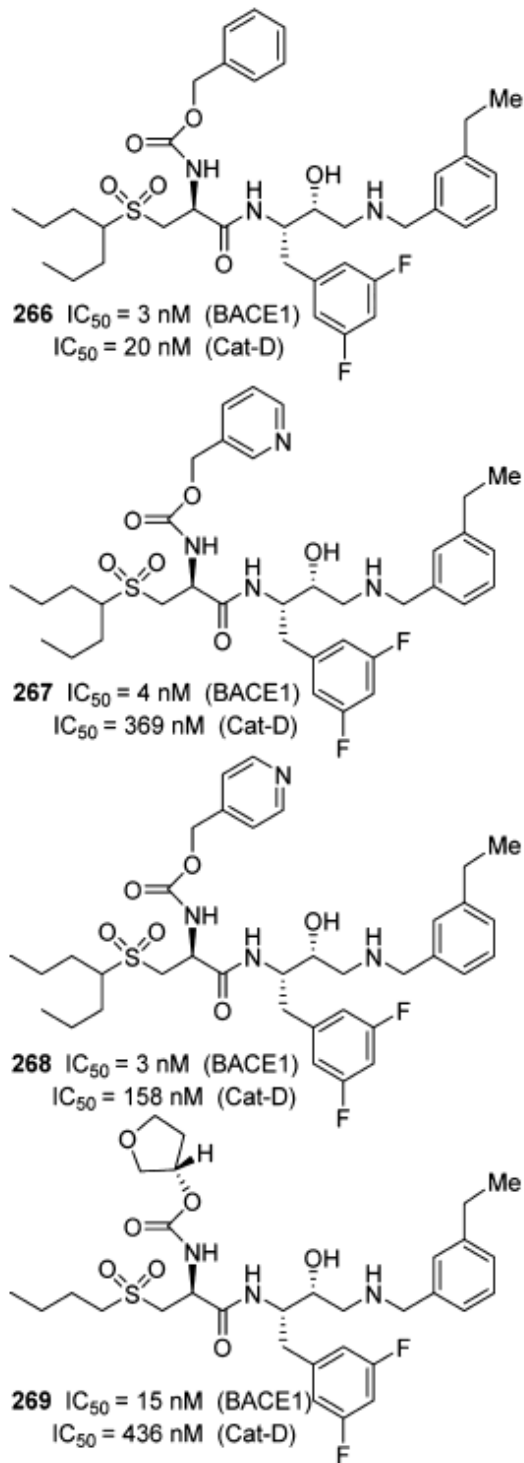


Figura 20. Derivati carbammici inibitori selettivi β -secretasici contenenti gruppi butilsolfonici.

7.2 SVILUPPO DI INIBITORI DELLA γ -SECRETASI

Nel corso degli anni sono state descritte molte classi strutturali di inibitori potenti e selettivi dell'enzima γ -secretasi. Un certo numero di inibitori ha mostrato buone proprietà *drug-like* e la capacità di inibire la produzione del peptide β -amiloide ($A\beta$) in modelli animali.

Partendo da un inibitore *lead* della γ -secretasi LY-411575 (**270**), Peters e collaboratori hanno progettato una serie di derivati carbammici del dibenzazepinone quali inibitori della γ -secretasi potenti e metabolicamente stabili. Come mostrato nella figura 21, il carbammato **271** è stato sintetizzato partendo dalla struttura di **270**.⁽⁶⁰⁾ Successivamente, il carbammato **272** è emerso come potente inibitore della γ -secretasi.

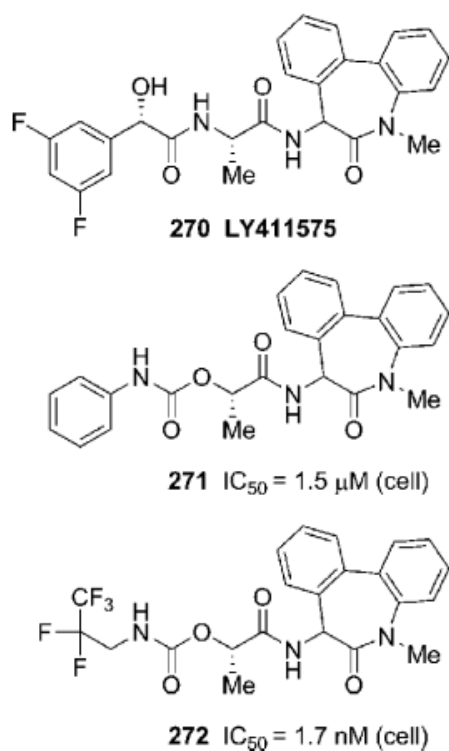


Figura 21. Potenti derivati carbammici quali inibitori della γ -secretasi

Ricercatori dell'Istituto di Ricerca della Schering-Plough hanno sviluppato una serie di potenti inibitori della γ -secretasi caratterizzati da una struttura tetraidrochinolinsolfonammido carbammica e piperidinsolfonammido

carbammica.⁽⁶¹⁾ Come mostrato nella figura 22, un numero rappresentativo di questi derivati carbammici mostra valori di IC_{50} nel range del basso nanomolare.

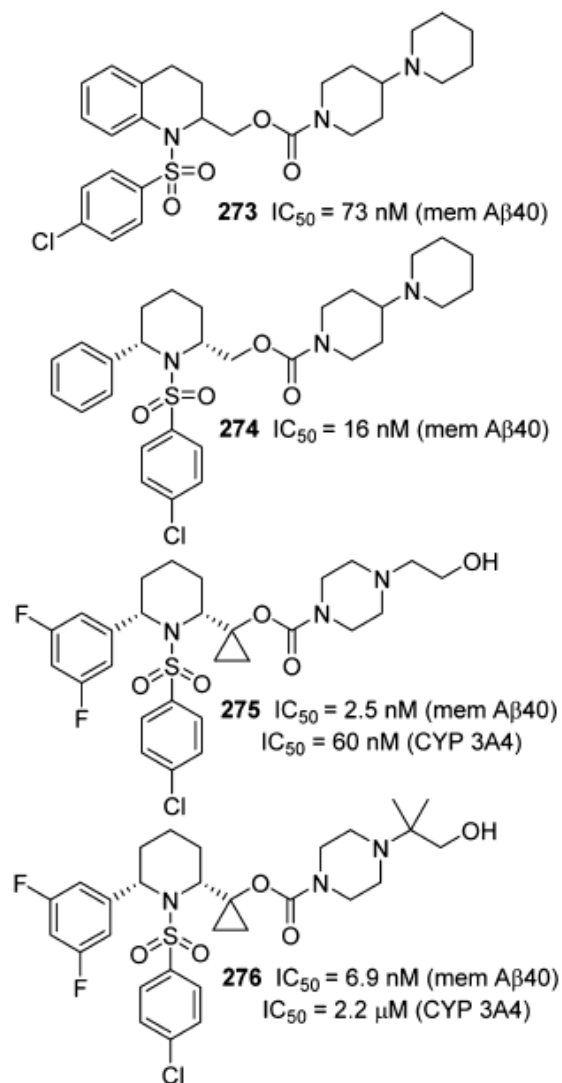


Figura 22. Derivati tetraidrochinolinsolfonammido e piperidinsolfonammido carbammici inibitori γ -secretasici.

Il Carbammato racemico **273** è il primo che ha mostrato un buon valore di IC_{50} . Gli enantiomeri sono stati poi separati tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). Uno degli enantiomeri ha mostrato un valore di IC_{50} di 39 nM, mentre l'altro aveva un $IC_{50} > 1000\text{nM}$. La stereochimica assoluta dell'enantiomero attivo non è stata determinata. Anche il Carbammato

piperidinico **274** ha mostrato una buona potenza, e il derivato carbammico **275** ha mostrato un buon valore di riduzione della β -amiloide di membrana; tuttavia, ha mostrato scarse attività per il CYP. Ulteriori modifiche hanno portato al composto **276** con una buona attività inibitoria e migliore attività CYP (Figura 22).

Bergstrom e collaboratori hanno descritto una serie di carbammati N-alchil solfonammidici, inibitori della γ -secretasi.⁽⁶²⁾

Nella figura 23 sono riportati alcuni esempi di composti con potente attività $A\beta$ inibitoria. Tra questi è stato identificato il derivato solfonammidico **277**, un inibitore potente della γ -secretasi. Lo studio di questi carbammati N-alchilsulfonammidici ha portato alla scoperta di inibitori potenti quali i composti **278-280**. Il carbammato terziario **280** mostra una riduzione significativa di β -amiloide nel cervello di topi transgenici, rispetto al suo derivato benzilico. Questo composto migliora anche il rapporto di distribuzione cervello-plasma e una buona concentrazione cerebrale.

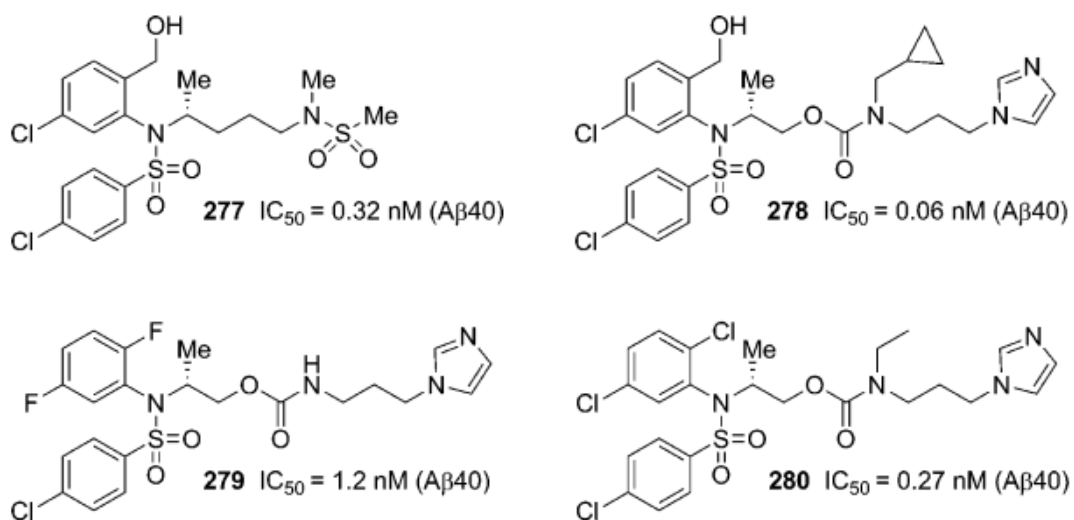


Figura 23. Derivati solfonammido carbammici inibitori della γ -secretasi.

8. CARBAMMATI PER LA TERAPIA DELL'HCV

Il virus dell'epatite C (HCV) è un virus a trasmissione ematica e si trova in tutto il mondo. Ci sono diversi ceppi o genotipi del virus HCV. L'infezione da HCV porta danni progressivi al fegato, cirrosi e cancro del fegato. Negli ultimi anni, sono stati sviluppati nuovi ed efficaci farmaci antivirali per il trattamento dell'epatite C. Questi includono gli inibitori della proteasi HCV NS3/4A e gli inibitori della proteasi HCV NS5A.

8.1 DERIVATI CARBAMMICI INIBITORI DELLA SERINA PROTEASI

Le serina proteasi sono una grande famiglia di enzimi proteolitici che giocano un ruolo critico in molti processi fisiologici. La deregolazione delle serina proteasi è stata correlata alla patogenesi di molte malattie come ictus, infiammazione, morbo di Alzheimer, cancro e artriti. Pertanto si sono concentrati significativi sforzi alla scoperta di inibitori delle serina proteasi.

Il sito attivo delle serina proteasi consiste in una triade catalitica composta da Ser, His, Asp.

L'attacco nucleofilo da parte del gruppo ossidrilico della serina al carbonio carbonilico del legame scindibile del substrato, tramite catalisi basica operata dall'istidina, porta ad uno stato di transizione tetraedrico. L'intermedio tetraedrico infine collassa portando alla scissione del substrato e alla liberazione di un residuo aminoacidico.⁽⁶³⁾ Questi residui attivi chiave sono conservati in tutte le serina proteasi. L'analisi strutturale a raggi X ha rivelato che questi residui sono sovrapponibili nella maggior parte delle serina proteasi. Pertanto, la selettività per una specifica serina proteasi rappresenta una questione chiave da prendere in considerazione durante la progettazione di questi inibitori. La maggior parte degli inibitori primordiali agiva attraverso un meccanismo covalente, in cui un gruppo elettrofilo formava un legame covalente con l'idrossile della serina della triade catalitica. I gruppi elettrofili sono comunemente noti come trappole della serina. Tuttavia, gli inibitori covalenti mancano di selettività e specificità verso altre proteasi della stessa classe. La progettazione razionale di inibitori covalenti delle serina proteasi di solito comporta la scelta di un buon substrato da legare alla

serina. Chetoni clorometilici, esteri difenil fosfonati, trifluorometil chetoni, acidi boronici peptidici, α -chetoeterocicli e derivati β -lattamici sono di solito impiegati come trappole della serina. Sulla base di queste trappole, sono stati progettati vari inibitori covalenti irreversibili e reversibili della serina proteasi. In questa tesi saranno evidenziati gli inibitori della serina proteasi con struttura carbammica.

Il derivato carbammico **281** (Figura 24), un difenil estere fosfonato contenente un gruppo carbobenzilossi (CBZ) con una catena laterale amminica, ha mostrato una buona attività inibitoria nei confronti della callicreina plasmatica, ed è utile nel trattamento dell'angioedema ereditario. La trombina è un target terapeutico interessante per lo sviluppo di farmaci contro l'embolia polmonare, trombosi e malattie correlate. Il composto **282** ha mostrato una buona potenza e selettività verso la trombina umana. È stabile, non presenta attività verso l'AchE, non è selettivo verso le cisteina proteasi.

La DuPont-Merck ha sviluppato degli acidi boronici peptidilici, inibitori della trombina. In particolare, il derivato N-Boc **283** è un inibitore potente ($K_i = 0,004\text{nM}$). Imperiali e collaboratori hanno inserito i trifluorometil chetoni quali inibitori specifici della serina proteasi, in particolare per chimotripsina ed elastasi.⁽⁶⁴⁾ I ricercatori dell'AstraZeneca hanno progettato numerosi derivati trifluorometil chetonici peptidici quali potenti inibitori dell'elastasi umana.⁽⁶⁵⁾ Un'ulteriore ottimizzazione delle loro caratteristiche ha portato allo sviluppo di una serie di inibitori attivi per via orale. In particolare, il derivato metil carbammico **284** ha dimostrato di essere un inibitore molto potente ($K_i = 13\text{nM}$) con eccellente biodisponibilità orale in animali da laboratorio. Il composto otticamente attivo **284**, nella configurazione (S), con una catena laterale isopropilica in P1, è diventato un candidato per lo sviluppo clinico per il potenziale trattamento di malattie respiratorie correlate all'enzima elastasi.

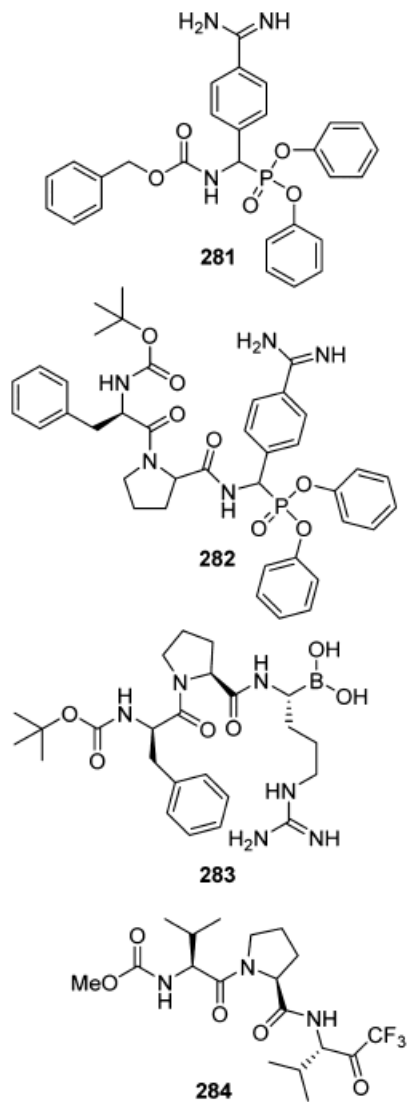


Figura 24. Strutture contenenti una funzione carbammica, inibitori della callicreina della trombina e dell'elastasi

Sono stati progettati e sintetizzati derivati peptidomimetici a base di acido boronico, capaci di inibire la proteasi dell'epatite C (HCV) NS3/4, per il trattamento delle infezioni croniche da HCV. Le infezioni da HCV possono condurre a progressivi danni epatici, cirrosi e cancro al fegato.

La serina proteasi NS3/4 gioca un ruolo chiave nella replicazione del virus, ed è appunto diventata un target per lo sviluppo di farmaci antivirali. Il primo inibitore proteasico HCV potente e specifico, con buona biodisponibilità, è il Ciluprevir, contenente una funzione carbammica (285, Figura 25).

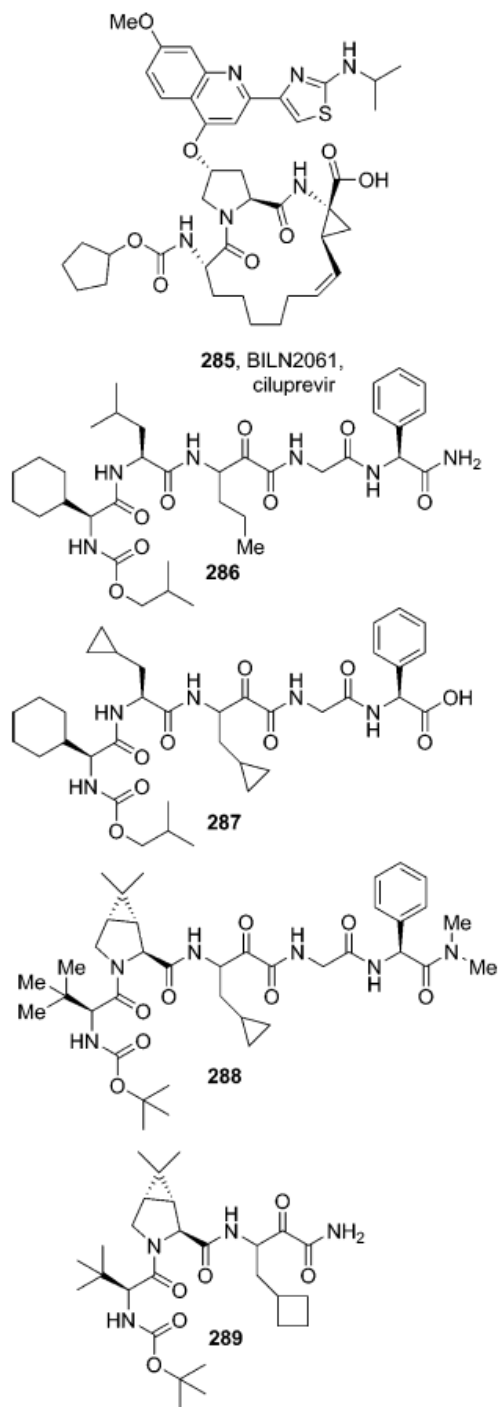


Figura 25. Evoluzione strutturale degli inibitori dell'HCV NS3/4 proteasi, dal ciluprevir alla scoperta del boceprevir, contenenti funzioni carbammiche

Questo inibitore peptidico macrociclico non covalente è stato il risultato di un approccio *substrate-based* applicato alla progettazione di inibitori del sito attivo dell'enzima. Questo inibitore è molto attivo sia sull'enzima ($IC_{50} = 3\text{nM}$), che nel saggio di replicazione cellulare del genotipo 1 del virus HCV ($IC_{50} = 1,2\text{nM}$). Lo sviluppo clinico del Ciluprevir è stato poi interrotto a causa della sua tossicità cardiaca in modelli animali, ma Ciluprevir ha aperto la strada al Boceprevir (approvato da FDA nel marzo 2011) e Telaprevir (VX-950).⁽⁶⁶⁾ In particolare, per quanto riguarda lo sviluppo del boceprevir, l'introduzione di una funzione chetoammidica e l'ottimizzazione di P2 e P3, ha portato all'inibitore **286** con una K_i di 66nM . La sua struttura a raggi X, nel complesso con l'enzima, ha anche fornito spunti per un'ulteriore ottimizzazione. Infatti, un residuo di ciclopropilalanina è risultato ottimale in P1, e il derivato carbammico risultante **287** ha mostrato una K_i di 15nM . Sebbene gli inibitori **286** e **287** mostrino una buona potenza inibitoria enzimatica, non mostrano attività cellulare nel saggio di replicazione cellulare subgenomica del virus HCV, forse a causa del loro forte carattere peptidico. La scoperta che una leucina N-metilata in P2 è risultata di cruciale importanza sia per la potenza enzimatica che per l'attività cellulare, ha portato a suggerire che la ciclopropil-leucina possa essere una struttura ottimale, conformazionalmente costretta, per questa parte dell'inibitore. La combinazione del ligando ottimizzato in P2 con i residui P1 e P3, precedentemente ottimizzati, ha fornito il derivato carbammico **288** con $K_i = 3,88\text{nM}$ e $IC_{90} = 100\text{nM}$.⁽⁶⁷⁾ Infine, l'ottimizzazione e la rottura di una parte della molecola in P1 e l'inserimento della funzione ciclobutilica al posto del ciclopropile, ha portato al composto **289** ($K_i = 76\text{ nM}$), precursore diretto del Boceprevir (Figura 25). Successivamente i composti **290** e **291** (Figura 26) con un carbammato contenente il nucleo prolinico in P2, hanno mostrato una potente attività inibitoria ($IC_{50} = 2\text{ nM}$ per **290** e 23 nM per **291**). Similmente l'inibitore macrociclico **292** con un α -ammino boronato ciclico ha mostrato una buona potenza ($IC_{50} = 43\text{ nM}$).

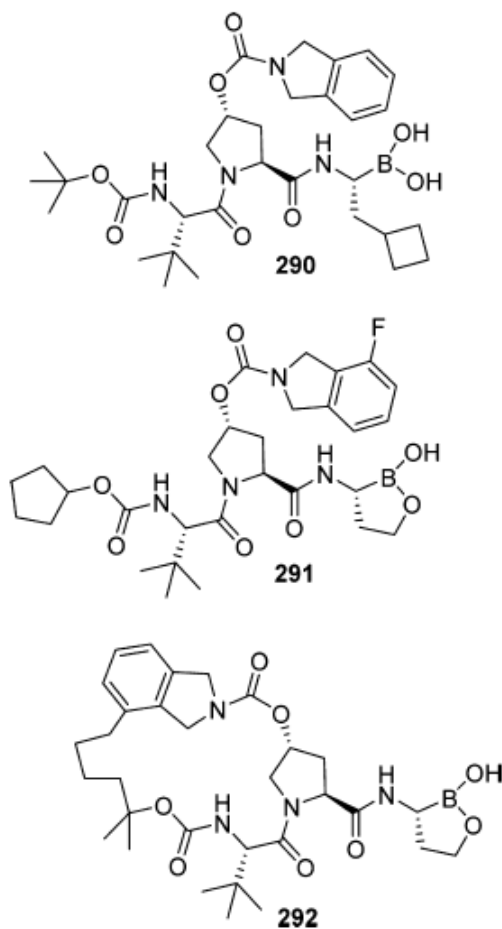


Figura 26. Inibitori HCV NS3/4 proteasici, contenenti funzioni carbammiche.

Anche l'effetto elettronattrattore dell'ammide e dell'estere è stato preso in considerazione durante la progettazione di inibitori α -chetoesterei o α -chetoammidici. E' stata progettata e sintetizzata una gamma di inibitori proteasici di HCV NS3/4 con struttura α -chetoammidica. La progettazione *structure-based* ha portato ad una varietà di potenti inibitori ciclici e non-ciclici con struttura α -chetoammidica, come per esempio nel caso dei composti **293** ($IC_{50} = 3,8nM$) e **294** ($IC_{50} = 30nM$) (Figura 27).

Edwards e collaboratori hanno sviluppato il peptide α -chetoeterociclico come nuovo modello per l'inattivazione dell'enzima elastasi. Il tripeptide α -chetobenzossazolo **295** inibisce l'azione della elastasi neutrofila umana (ELA2) con un IC_{50} di 3nM. L'inibitore α -chetoossazolinico **296** ha mostrato un'attività

molto elevata ($IC_{50} = 0,6nM$) per ELA2 (Figura 27).⁽⁶⁸⁾

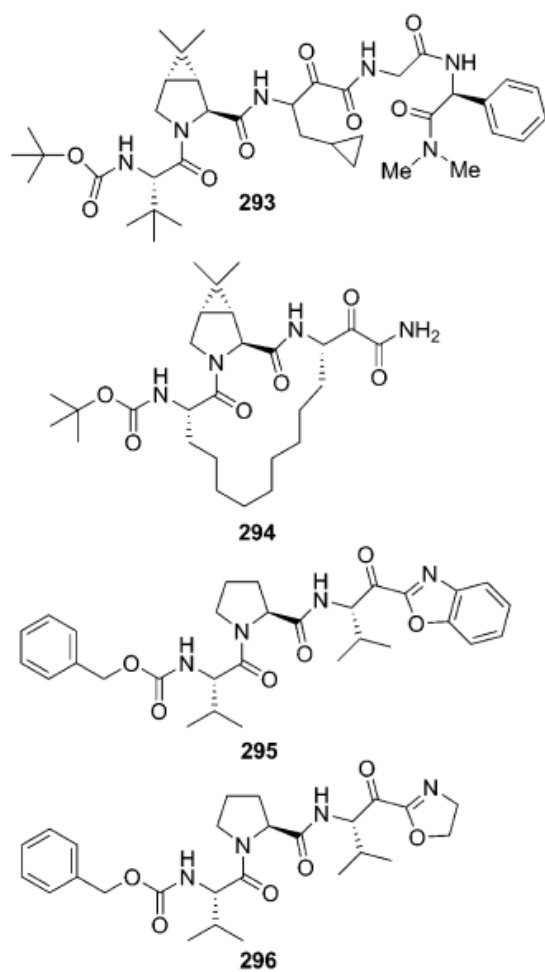


Figura 27. Inibitori α -chetoamidici della HCV NS3/4 proteasi e α -chetoeterociclici dell'elastasi contenenti domini carbammici.

8.2 INIBITORI HCV NS5A

I derivati carbammici giocano un ruolo chiave anche nell'inibizione dell'HCV NS5A, che rappresenta un nuovo e promettente bersaglio per la terapia contro l'epatite C. HCV NS5A è una fosfoproteina che si lega allo zinco ed il suo ruolo nel ciclo vitale del virus dell'epatite C non è ancora molto chiaro. Tuttavia svolge un ruolo chiave nella replicazione dell'RNA del virus ed è inoltre coinvolta nella morfogenesi del virione.

Ricercatori della Bristol-Myers Squibb hanno effettuato uno *screening* di librerie di composti per valutare la loro capacità di inibire la replicazione dell'RNA data dall' HCV NS5A. Ciò ha portato all'identificazione di un composto *lead*, che interferisce specificatamente con la replicazione dell'RNA e che ha dimostrato di inibire l'attività della proteina NS5A. La successiva ottimizzazione si è concentrata sull'ampliare la genotipo-specificità e migliorare le proprietà farmacocinetiche dei composti. La simmetria della molecola ha un effetto importante sulla potenza inibitoria verso l'enzima. Ciò ha portato infine alla scoperta del Daclatasvir (**297**, BMS-790052, Figura 28), un'inibitore di prima classe del complesso di replicazione HCV NS5A.⁽⁶⁹⁾ Questo farmaco è stato approvato in Europa nell'agosto del 2014. Ledipasvir (**298**, GS-5885, Figura 28) è un altro farmaco inibitore dell'HCV NS5A contenente due gruppi carbammici, con potente attività antivirale contro il genotipo 1a e 1b dell'HCV. Harvoni®, una combinazione di Ledipasvir e Sofosbuvir (nucleotide inibitore della polimerasi), è stato approvato dall'FDA nell'ottobre del 2014 per il trattamento dell'infezione cronica da genotipo 1 dell'epatite C. Questo rappresenta anche il primo trattamento approvato che non richiede la somministrazione di interferone o di ribavirina.⁽⁷⁰⁾

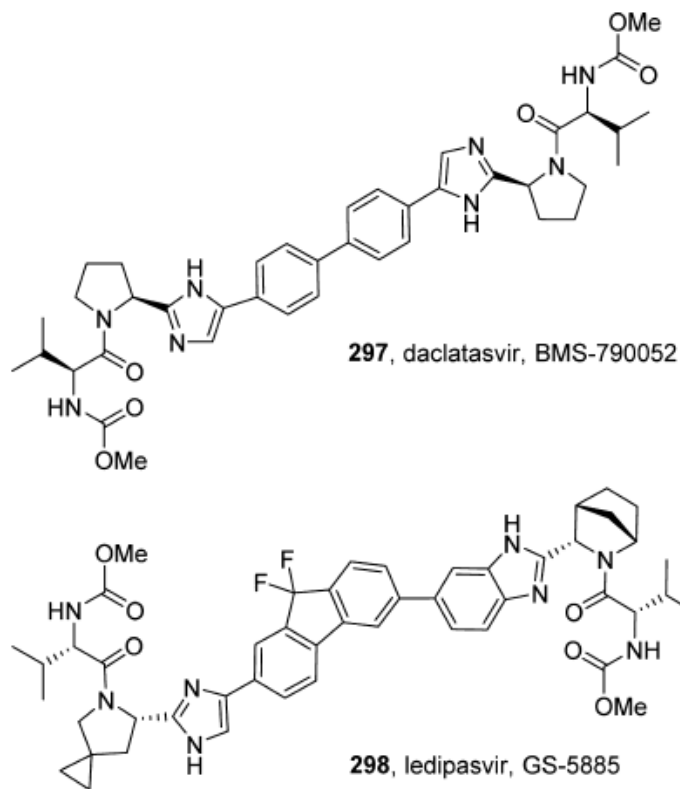


Figura 28. Inibitori HCV NS5A, daclatasvir e ledipasvir, contenenti funzioni carbammiche.

9. CARBAMMATI INIBITORI DELLA CISTEINA PROTEASI

Le Cisteina proteasi, conosciute anche come tiolo-proteasi, sono enzimi proteolitici responsabili della degradazione delle proteine. Questi enzimi si dividono in tre classi, in base alle omologia di sequenza: la papaina, la caspasi e la famiglia delle picornaviridae. La famiglia della papaina proteasi è la più conosciuta e studiata.⁽⁷¹⁾

Le cisteina proteasi sono state identificate in una varietà di organismi diversi, come batteri, piante, microrganismi eucarioti, e animali, e sono suddivisi in CA, CD, CE, CF e CH nel database per peptidasi MEROPS. La più grande sottofamiglia tra le classi di cisteina proteasi è la papaina proteasi, che si estrae dal frutto immaturo della papaya. Il clan proteasico CA utilizza i residui catalitici Cys, His, Asn, che sono invariati in questo ordine nella sequenza primaria della proteasi. I clan CA della famiglia C1 (famiglia della papaina) della cisteina proteasi, sono ben caratterizzati per molti organismi eucarioti. Inoltre, la cisteina proteasi meglio caratterizzata, quella del *Plasmodium falciparum*, la falcipaina, appartiene alla famiglia enzimatica della papaina (clan CA).

Il clan CD presenta in sequenza due residui catalitici, His e Cys; il clan CE ha una triade formata da His, Glu (o Asp) e Cys al C-terminale; nel clan CF il residuo di asparagina nella triade catalitica è sostituito da un residuo di glutammato e quindi l'ordine nella triade catalitica è Glu, Cys e His; il clan CG ha un dipeptide con due residui di asparagina e il clan CH presenta la triade Cys, Thr e His con la cisteina catalitica all'N-terminale.

Il meccanismo proteolitico coinvolge la formazione di una coppia ionica tiolo-imidazolo, che fornisce un alto potere nucleofilo all'SH-cisteinico. Nel corso degli anni sono stati progettati molti inibitori della cisteina proteasi legando appropriate trappole per nucleofili con specifiche sequenze di riconoscimento di substrati peptidici. Queste trappole reversibili comprendono le aldeidi, le α -chetoammidi, gli α -chetoesteri e gli α -chetoacidi. Questi inibitori interagiscono con il sito attivo della proteasi formando un intermedio tetraedrico, ma sono eventualmente idrolizzati, rigenerando sia l'enzima di partenza sia l'inibitore, in una reazione di equilibrio.

Gli inibitori irreversibili delle cisteina proteasi includono gli epossidi, le aziridine, i solfoni vinilici, gli α -chetoni e gli acilossimetilchetoni. Questi inibitori inattivano il *target* mediante alchilazione del residuo SH-cisteinico nel sito attivo, causando un'inattivazione permanente delle funzioni enzimatiche.⁽⁷²⁾

Il verificarsi della Sindrome respiratoria acuta grave (SARS) nel 2003, e la successiva identificazione di un nuovo coronavirus come agente eziologico della patologia, ha riconosciuto SARS-CoV 3CLpro e SARS-CoV PLpro (proteasi papainiche) quali possibili *target* per la progettazione di farmaci.

La progettazione *structure-based* basata su una struttura co-cristallina a raggi X di un inibitore legato all'enzima, ha fornito il derivato carbammico **299** (Figura 29) quale potente SARS-CoV 3CLpro inibitore ($IC_{50} = 80 \mu M$).

È stata poi sviluppata un'ampia varietà di inibitori della proteasi del rinovirus 3C (HRV 3C), introducendo nella molecola un carbonile α,β -insaturo quale trappola per nucleofili. Hanzilik e collaboratori hanno descritto i primi inibitori della proteasi HRV 3C contenenti una funzione peptidica ed esteri α,β -insaturi.⁽⁷³⁾ Le funzioni peptidiche sono state selezionate in base al sito di taglio sul substrato. Un esempio rappresentativo è costituito dall'inibitore carbammico **300** (Figura 29), che mostra un valore di IC_{50} di 130 nM.

La catepsina K umana gioca un ruolo critico nel rimodellamento e riassorbimento osseo. Nel tentativo di bloccare il riassorbimento osseo sono stati sviluppati inibitori non covalenti della catepsina K. Kim e collaboratori hanno fornito un derivato carbammico **301** (Figura 29), quale inibitore non covalente e reversibile della catepsina K ($IC_{50} = 0,01 \mu M$) e L ($IC_{50} = 0,002 \mu M$).⁽⁷⁴⁾ Ricercatori della GlaxoWellcome hanno sviluppato derivati carbammici contenenti un α -chetoammide, che sono inibitori della Catepsina K come il **302** (Figura 29) ($IC_{50} = 0,072 nM$). Partendo da un inibitore chetonico, con proprietà *drug-like* insoddisfacenti, l'inserimento di elementi di P2 e P3 dell'inibitore chetoammidico **302**, ha portato all'ottenimento di una serie ibrida di derivati chetonici inibitori della catepsina K, che presentano un incremento di biodisponibilità, come ad esempio l'inibitore **303** (Figura 29) ($IC_{50} = 4 nM$).

La catepsina S è stata indicata quale *target* per lo sviluppo di agenti per il trattamento di una serie di disturbi del sistema immunitario. Una nuova classe di

inibitori non covalenti e non peptidici della catepsina S è stata presentata nel 2007. La successiva ottimizzazione strutturale ha portato all'ottenimento di un inibitore non covalente e competitivo molto potente, contenente una porzione carbammica **304** (Figura 29) ($IC_{50} = 20nM$).⁽⁷⁵⁾

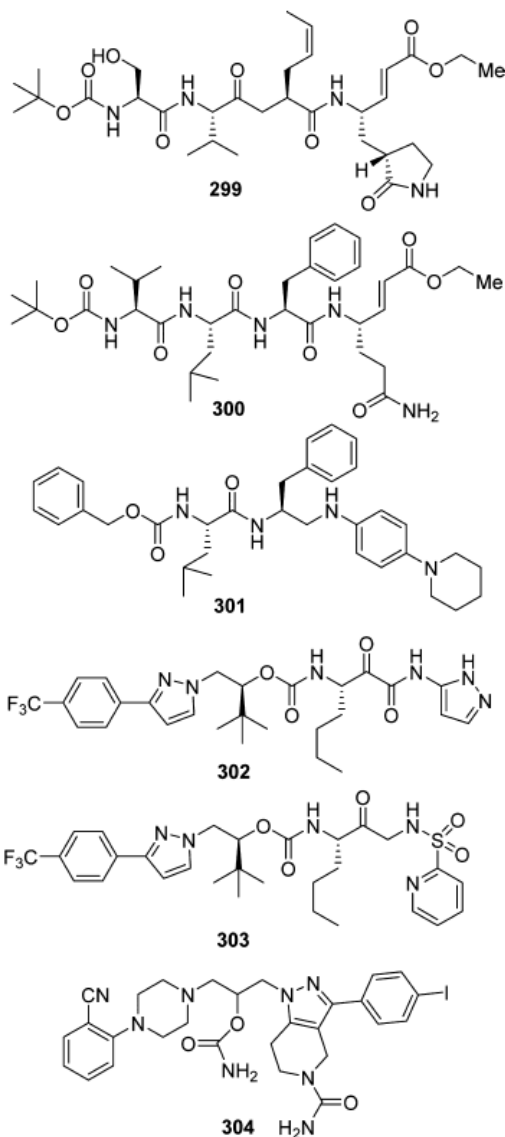


Figura 29. Principali inibitori delle cisteina proteasi contenenti funzioni carbammiche.

10. CARBAMMATI INIBITORI DEGLI ENZIMI METABOLICI DEGLI ENDOCANNABINOIDI

I carbammati sono sfruttati anche nella progettazione di inibitori della serina idrolasi. In particolare, prendiamo in considerazione gli inibitori degli enzimi che metabolizzano gli endocannabinoidi, nei quali la funzionalità carbammica svolge un ruolo importante.

Il sistema endocannabinoide è noto quale sistema neuromodulatorio ubiquitario presente in tutti gli organismi primitivi, e coinvolto in una vasta gamma di azioni. È composto da recettori cannabinoidi (CBRs), cannabinoidi endogeni (endocannabinoidi, ECs) ed enzimi responsabili per la loro produzione, trasporto e degradazione. Gli ECs sono una classe di lipidi bioattivi, come l'N-arachidonoil etanolamina (anandamide, AEA), l'oleamide e il 2-arachidonoil glicerolo (2-AG), che esercitano le loro azioni attraverso l'interazione con due recettori accoppiati alla proteina G, CB1 e CB2. Questi recettori modulano una serie di risposte e di processi, come il dolore, l'infiammazione, l'appetito, la motilità, il sonno, la termoregolazione, gli stati emozionali e cognitivi. Le azioni di questi lipidi bioattivi sono rapidamente terminate grazie ad un reuptake cellulare e la successiva idrolisi da parte di numerosi enzimi.

Un approccio interessante per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici coinvolge la modulazione del sistema endocannabinoide e mira a provocare gli effetti provenienti dall'attivazione dei recettori cannabinoidi (CBRs) attraverso l'inattivazione farmacologica dei principali enzimi metabolici endocannabinoidi, ovvero la monoacilglicerolo lipasi (MAGL), ed i domini 6 (ABDH6) e 12 (ABDH12) della α/β -idrolasi. Queste tre serina idrolasi sono responsabili di circa il 99% dell'idrolisi di 2-AG nel sistema nervoso centrale, mentre le idrolasi delle ammidi degli acidi grassi (FAAH) sono responsabili dell'inattivazione di AEA.⁽⁷⁶⁾ L'inattivazione di questi enzimi porterebbe ad aumentare le concentrazioni endogene di tutti i substrati cannabinoidi, e di conseguenza ad un prolungamento e potenziamento dei suoi effetti benefici sul dolore e ansia, senza evocare i classici effetti collaterali degli agonisti al recettore CB1R (ipotermia, ipomotilità e catalessi).

La Monoacilglicerolo lipasi (MAGL) è il principale enzima responsabile dell'idrolisi del 2-AG nel SNC. Circa l'85% della totale idrolisi di 2-AG nel cervello è attribuita alla MAGL. La MAGL è un enzima (33kDa) di membrana appartenente alla superfamiglia delle serina idrolasi, con una triade catalitica rappresentata da Ser122, His269 e Asp 239.⁽⁷⁷⁾ E' presente ubiquitariamente nel cervello (corteccia, ippocampo, cervelletto, talamo e corpo striato) dove si localizza nelle terminazioni pre-sinaptiche, anche se livelli più bassi si trovano anche nell'ipotalamo e tronco cerebrale. Pare ci sia una distribuzione concomitante nelle membrane così come nel citosol. La MAGL condivide un legame in comune con l' α/β idrolasi, chiamato legame α/β idrolasico.

Studi effettuati negli ultimi anni hanno evidenziato che gli inibitori della MAGL suscitano un effetto antinocicettivo, ansiolitico e danno risposte antiemetiche. Gli inibitori della MAGL hanno inoltre dimostrato di esercitare un'azione antiinfiammatoria nel cervello e di proteggere dalla neurodegenerazione tramite la riduzione della produzione degli eicosanoidi. Recentemente è stato descritto il potenziale degli inibitori della MAGL nella terapia della sindrome del Fragile X.

I primi inibitori della MAGL erano molecole che avevano come *target* i residui di cisteina presenti nel sito attivo dell'enzima. Successivamente, la ricerca si è focalizzata sulla sintesi di composti che si legano covalentemente alla Ser241 della triade catalitica. Tra questi il carbammato **305** (URB602, Figura 30) è stato il primo inibitore selettivo della degradazione di 2-AG, sebbene la sua potenza sia limitata ($IC_{50} = 28\mu M$ nel cervello di topo).

Inibitori selettivi della MAGL con una funzione carbammica nella molecola sono stati sviluppati da Cravatt e collaboratori. L'inibitore **306** (JZL184, Figura 30) ha mostrato una selettività verso le FAAH *in vitro* ($IC_{50} = 3,9nM$ e $4\mu M$ rispettivamente per MAGL e FAAH umana ricombinante).⁽⁷⁸⁾

Più recentemente, Cravatt e collaboratori hanno descritto una classe distinta di O-esafluoroisopropil carbammati (HFIP) che porta un gruppo reattivo bioisosterico con quello dei substrati endocannabinoidi. Il composto più rappresentativo, **307** (KML29, Figura 30, $IC_{50} = 5,9 nM$ sulla MAGL umana), mostra un'eccellente potenza, anche *in vivo*. Rispetto ai carbammati O-arilici precedentemente descritti, questo inibitore mostra una miglior selettività verso le FAAH e le altre serina

idrolasi.⁽⁷⁹⁾

Il gene ABDH6 codifica per una proteina (~35 kDa) contenente una regione N-terminale transmembrana, seguita da un dominio catalitico che include il canonico GX SXG del sito attivo delle serina idrolasi. ABDH6 è un enzima unico, altamente conservato nei mammiferi, ed è principalmente espresso in cervello, fegato, rene e tessuto adiposo bruno. Come membro della classe delle serina idrolasi, l'ABDH6 è predisposto a idrolizzare legami esterei, ammidici o tioesterei in substrati che potrebbero includere piccole molecole, lipidi o peptidi. Comunque l'intera gamma di substrati regolata *in vivo* da questo enzima è attualmente sconosciuta. Studi recenti hanno anche mostrato che gli inibitori carbammici dell'ABDH6 producono effetti anti-infiammatori e neuro-protettivi in un modello di topo con trauma cranico. Tra questi, l'inibitore ottimizzato **308** (Figura 30) mostra un valore di IC₅₀ di 70nM e una notevole selettività.

FAAH è un enzima integrale di membrana con un singolo dominio transmembrana N-terminale, appartenente alla famiglia delle amidasi. L'analisi della sua struttura cristallina ha rivelato un nucleo costituito dalla caratteristica triade catalitica Ser-Ser-Lys. I residui catalitici di FAAH sono nascosti nella zona profonda dell'enzima e sono accessibili attraverso due stretti canali. L'importanza di questo enzima è stata dimostrata dalla generazione di topi FAAH *knockout*. I topi FAAH^{-/-} hanno mostrato un'elevata concentrazione cerebrale di anandamide (AEA) in condizione di riposo, e manifestato (i) un fenotipo analgesico sia nel modello di dolore infiammatorio da carragenina, sia nel modello di dolore spontaneo da formalina, (ii) una riduzione della risposta infiammatoria, e (iii) miglioramenti dell'acquisizione della memoria e del sonno a onde lente (stadio 3 e 4). La classe dei composti URB è stata la prima classe di inibitori della FAAH, identificata ed è ben rappresentata dall'inibitore **309** (URB597, Figura 30, IC₅₀ = 4,6 nM). L'analogo N-(6-fenil)esilcarbammato **310** (JP83, Figura 30, IC₅₀ = 14 nM) è un altro composto molto potente, rappresentativo della serie di inibitori bifenilici. Gattinoni e collaboratori hanno sviluppato una serie di inibitori idrossiimmuno carbammici. Il composto **311** (Figura 30, IC₅₀ = 8 nM) mostra una buona affinità e selettività verso FAAH.⁽⁸⁰⁾ Più recentemente Butini e collaboratori hanno sviluppato una nuova classe di potenti e selettivi FAAH inibitori

carbammici reversibili.⁽⁸¹⁾ Tra questi il composto **312** (NF1245, Figura 30, $K_i = 0,16$ nM sul FAAH di cervello di topo) ha mostrato un'attività eccellente. Il composto ha mostrato notevole selettività verso tutti gli enzimi (FAAH, ABDH6 e MAGL) e recettori del sistema endocannabinoide.

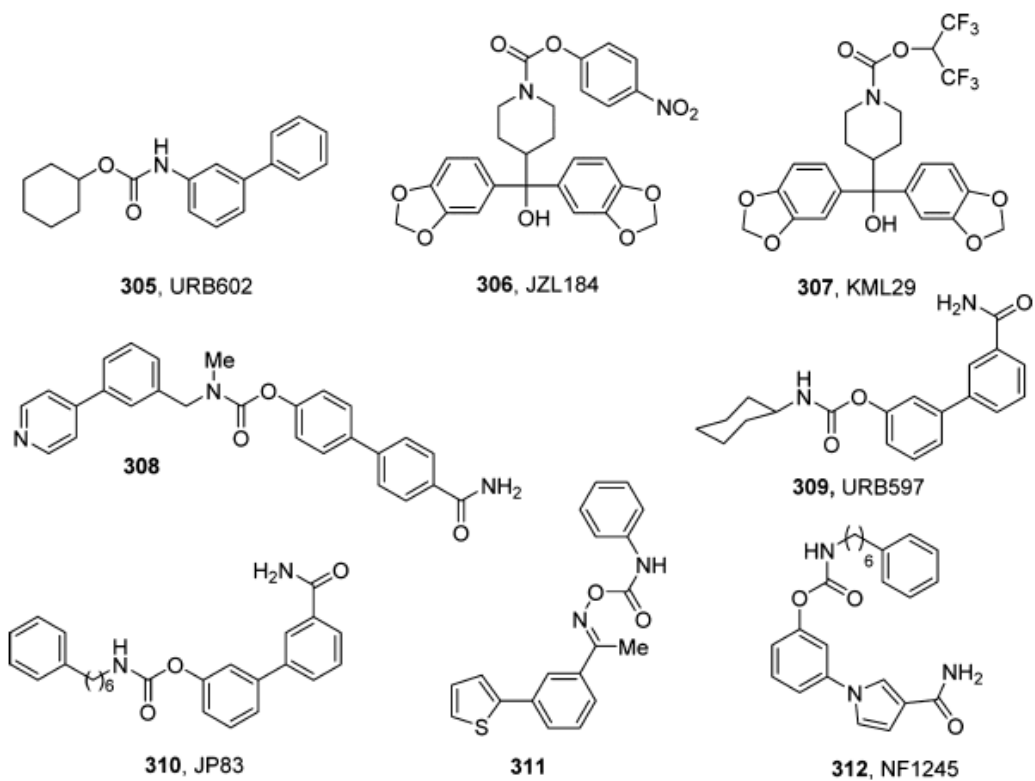


Figura 30. Esempi rappresentativi di inibitori di MAGL, ABDH6 e FAAH contenenti funzioni carbammiche

11. CONCLUSIONI

In questa tesi è stato evidenziato il ruolo dei carbammati organici nel *drug design* ed in *Medicinal Chemistry*. In particolare, sono state riportate le proprietà fisiche dei carbammati e lo sviluppo di metodologie chimiche innovative, che hanno portato al superamento dei problemi di sicurezza e tossicità legati alla loro preparazione. Inoltre, sono stati approfonditi l'importanza dei derivati carbammici nella chimica farmaceutica ed il loro impiego diffuso come farmaci e profarmaci. È stato evidenziato anche l'utilizzo dei carbammati organici nello sviluppo di numerosi inibitori di acido aspartico, serina e cisteina proteasi. Le prospettive future sono quelle di potenziare ulteriormente l'uso di carbammati organici come elemento strutturale nel *drug design* e *Medicinal Chemistry*.

Bibliografia

- (1) Ghosh A. K.; Brindisi M. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 2895-2940.
- (2) Conradi, R. A.; Hilgers, A. R.; Ho, N. F.; Burton, P. S. The influence of peptide structure on transport across Caco-2 cells. II. Peptide bond modification which results in improved permeability. *Pharm. Res.* **1992**, 9, 435–439.
- (3) Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 292–296.
- (4) Martin, L. L.; Davis, L.; Klein, J. T.; Nemoto, P.; Olsen, G. E.; Bores, G. M.; Camacho, F.; Petko, W. W.; Rush, D. K.; Selk, D.; Smith, C. P.; Vargas, H. M.; Winslow, J. T.; Effland, R. C.; Fink, D. M. Synthesis and preliminary structure–activity relationships of 1-[(3-fluoro-4-pyridinyl)amino]-3-methyl-1H-indol-5-yl methyl carbamate (P10358), a novel acetylcholinesterase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 157–162.
- (5) Rablen, P. R. Computational analysis of the solvent effect on the barrier to rotation about the conjugated C–N bond in methyl N,N-dimethylcarbamate. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7930–7937.
- (6) Dugave, C.; Demange, L. Cis–trans isomerization of organic molecules and biomolecules: implications and applications. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2475–2532.
- (7) Marcovici-Mizrahi, D.; Gottlieb, H. E.; Marks, V.; Nudelman, A. On the stabilization of the syn-rotamer of amino acid carbamate derivatives by hydrogen bonding. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 8402–8406.

- (8) Moraczewski, A. L.; Banaszynski, L. A.; From, A. M.; White, C. E.; Smith, B. D. Using hydrogen bonding to control carbamate C–N rotamer equilibria. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7258–7262.
- (9) Vacondio, F.; Silva, C.; Mor, M.; Testa, B. Qualitative structuremetabolism relationships in the hydrolysis of carbamates. *Drug Metab. Rev.* **2010**, 42, 551–589.
- (10) Matsumura, Y.; Maki, T.; Satoh, Y. Electrochemically induced Hofmann rearrangement. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8879–8882.
- (11) Curtius, T. Hydrazide und azide organischer säuren I. Abhandlung. *J. Prakt. Chem.* **1894**, 50, 275–294.
- (12) Wolff, O.; Waldvogel, S. R. Reliable protocol for the large scale synthesis of diphenylphosphoryl azide (DPPA). *Synthesis* **2004**, 1303–1305.
- (13) Abila, M.; Chol, J. C.; Sakakura, T. Halogen-free process for the conversion of carbon dioxide to urethanes by homogeneous catalysis. *Chem. Commun.* **2001**, 2238–2239.
- (14) Kim, J. G.; Jang, D. O. Indium-catalyzed reaction for the synthesis of carbamates and carbonates: selective protection of amino groups. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 2688–2692.
- (15) Roberts, N. A.; Martin, J. A.; Kinchington, D.; Broadhurst, A. V.; Craig, J. C.; Duncan, I. B.; Galpin, S. A.; Handa, B. K.; Kay, J.; Krohn, A.; Lambert, R. W.; Merrett, J. H.; Mills, J. S.; Parkes, K. E. B.; Redshaw, S.; Ritchie, A. J.; Taylor, D. L.; Thomas, G. J.; Machin, P. J. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* **1990**, 248, 358–361.

- (16) Takeda, K.; Tsuboyama, K.; Hoshino, M.; Kishino, M.; Ogura, H. A synthesis of a new type of alkoxycarbonylating reagents from 1,1-bis[6-(trifluoromethyl)benzotriazolyl] carbonate (BTBC) and their reactions. *Synthesis* **1987**, 557–560.
- (17) Lee, H. G.; Kim, M. J.; Park, S. E.; Kim, J. J.; Kim, B. R.; Lee, S. G.; Yoon, Y. J. Phenyl 4,5-dichloro-6-oxopyridazine-1(6H)-carboxylate as carbonyl source: facile and selective synthesis of carbamates and ureas under mild conditions. *Synlett* **2009**, 2809–2814.
- (18) Salvatore, R. N.; Flanders, V. L.; Ha, D.; Jung, K. W. Cs₂CO₃-promoted efficient carbonate and carbamate synthesis on solid phase. *Org. Lett.* **2000**, 2, 2797–2800.
- (19) Abila, M.; Choi, J. C.; Sakakura, T. Halogen-free process for the conversion of carbon dioxide to urethanes by homogeneous catalysis. *Chem. Commun.* **2001**, 2238–2239.
- (20) Peterson, S. L.; Stucka, S. M.; Dinsmore, C. J. Parallel synthesis of ureas and carbamates from amines and CO₂ under mild conditions. *Org. Lett.* **2010**, 12, 1340–1343.
- (21) Ren, L.; Jiao, N. PdCl₂ catalyzed efficient assembly of organic azides, CO, and alcohols under mild conditions: a direct approach to synthesize carbamates. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 3706–3709.
- (22) Batey, R. A.; Yoshina-Ishii, C.; Taylor, S. D.; Santhakumar, V. A new protocol for the formation of carbamates and thiocarbamates using carbamoyl imidazolium salts. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2669–26

- (23) Lebel, H.; Leogane, O. Boc-protected amines via a mild and efficient one-pot Curtius rearrangement. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4107–4110.
- (24) Lebel, H.; Leogane, O. Curtius rearrangement of aromatic carboxylic acids to access protected anilines and aromatic ureas. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5717–5720.
- (25) Black, D. A.; Arndtsen, B. A. General approach to the coupling of organoindium reagents with imines via copper catalysis. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 1991–1993.
- (26) Shimizu, M.; Sodeoka, M. Convenient method for the preparation of carbamates, carbonates, and thiocarbonates. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5231–5234.
- (27) Liu, C. H.; Cheng, C. H. The role of alcohol in the catalytic reductive carbonylation of nitrobenzenes to carbamates in the presence of $\text{Rh}(\text{CO})_4^-$ or $\text{Ru}_3(\text{CO})_{12}$. *J. Organomet. Chem.* **1991**, *420*, 119–123.
- (28) Shivarkar, A. B.; Gupte, S. P.; Chaudhari, R. V. Carbamate synthesis via transfunctionalization of substituted ureas and carbonates. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, *223*, 85–92.
- (29) Han, C.; Porco, J. R. Synthesis of carbamates and ureas using Zr(IV)-catalyzed exchange processes. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1517–1520

- (30) Padiya, K. J.; Gavade, S.; Kardile, B.; Tiwari, M.; Bajare, S.; Mane, M.; Gaware, V.; Varghese, S.; Harel, D.; Kurhade, S. Unprecedented “in water” imidazole carbonylation: paradigm shift for preparation of urea and carbamate. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 2814–2817.
- (31) Williams, B. R.; Nazarians, A.; Gill, M. A. A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor. *Clin. Ther.* **2003**, *25*, 1634–1653.
- (32) Bristol-Myers Squibb announces discontinuation of development of investigational oral treatment for type 2 diabetes. <http://www.chemeuropa.com/en/news/54972/bristol-myers-squibb-announcesdiscontinuation-of-development-of-investigational-oral-treatment-fortype-2-diabetes.html> (accessed November 15, 2014).
- (33) Rosato, R. R.; Almenara, J. A.; Grant, S. The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21^{CIP1}/WAF1 1. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3637–3645.
- (34) Jakovlev, V.; Achterrath-Tuckermann, U.; von Schlichtegroll, A.; Stroman, F.; Thiemer, K. [General pharmacologic studies on the analgesic flupirtine]. *Arzneimittelforschung* **1985**, *35*, 44–55.
- (35) Ogburn, E. T.; Jones, D. R.; Masters, A. R.; Xu, C.; Guo, Y.; Desta, Z. Efavirenz primary and secondary metabolism in vitro and in vivo: identification of novel metabolic pathways and cytochrome P450 2A6 as the principal catalyst of efavirenz 7-hydroxylation. *Drug. Metab. Dispos.* **2010**, *38*, 1218–1229.

- (36) Matassa, V. G.; Maduskuie, T. P., Jr.; Shapiro, H. S.; Hesp, B.; Snyder, D. W.; Aharony, D.; Krell, R. D.; Keith, R. A. Evolution of a series of peptidoleukotriene antagonists: synthesis and structure/activity relationships of 1,3,5-substituted indoles and indazoles. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1781–1790.
- (37) Snodgrass, R. G.; Collier, A. C.; Coon, A. E.; Pritsos, C. A. Mitomycin C inhibits ribosomal RNA: a novel cytotoxic mechanism for bio-reductive drugs. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19068–19075.
- (38) Navia, M. A.; Fitzgerald, P. M.; McKeever, B. M.; Leu, C. T.; Heimbach, J. C.; Herber, W. K.; Sigal, I. S.; Darke, P. L.; Springer, J. P. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **1989**, *337*, 615–620.
- (39) Ghosh, A. K.; Thompson, W. J.; McKee, S. P.; Duong, T. T.; Lyle, T. A.; Chen, J. C.; Darke, P. L.; Zugay, J. A.; Emini, E. A.; Schleif, W. A.; Huff, J. R.; Anderson, P. F. 3-Tetrahydrofuran and pyran urethanes as high-affinity P2-ligands for HIV-1 protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 292–294.
- (40) Bold, G.; Fassler, A.; Capraro, H. G.; Cozens, R.; Klimkait, T.; Lazdins, J.; Mestan, J.; Poncioni, B.; Rosel, J.; Stover, D.; Tintelnot-Blomley, M.; Acemoglu, F.; Beck, W.; Boss, E.; Eschbach, M.; Hurlimann, T.; Masso, E.; Roussel, S.; Ucci-Stoll, K.; Wyss, D.; Lang, M. New aza-dipeptide analogues as potent and orally absorbed HIV-1 protease inhibitors: candidates for clinical development. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3387–3401

- (41) Ghosh, A. K.; Chapsal, B. D.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. Design of HIV protease inhibitors targeting protein backbone: an effective strategy for combating drug resistance. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 78–86.
- (42) Rautio, J.; Kumpulainen, H.; Heimbach, T.; Oliyai, R.; Oh, D.; Jarvinen, T.; Savolainen, J. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 255–270.
- (43) Florencio Zaragoza, D. Lead Optimization for Medicinal Chemists: Pharmacokinetic Properties of Functional Groups and Organic Compounds. 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2012.
- (44) Niculescu-Duvaz, D.; Scanlon, I.; Niculescu-Duvaz, I.; Springer, C. J. A higher yielding synthesis of the clinical prodrug ZD2767P using di-protected 4-[N,N-bis(2-hydroxyethyl)amino]-phenyl chloroformate. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6919–6922.
- (45) Slatter, J. G.; Su, P.; Sams, J. P.; Schaaf, L. J.; Wienkers, L. C. Bioactivation of the anticancer agent CPT-11 to SN-38 by human hepatic microsomal carboxylesterases and the in vitro assessment of potential drug interactions. *Drug Metab. Dispos.* **1997**, *25*, 1157–1164.
- (46) Tunek, A.; Levin, E.; Svensson, L. A. Hydrolysis of 3Hbambuterol, a carbamate prodrug of terbutaline, in blood from humans and laboratory animals in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 3867–3876

(47) de Groot, F. M. H.; van Berkom, L. W. A.; Scheeren, H. W. Synthesis and biological evaluation of 2'-carbamate-linked and 2'-carbonate-linked prodrugs of paclitaxel: selective activation by the tumor-associated protease plasmin. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3093–3102.

(48) Cundy, K. C.; Annamalai, T.; Bu, L.; De Vera, J.; Estrela, J.; Luo, W.; Shirsat, P.; Torneros, A.; Yao, F.; Zou, J.; Barrett, R. W.; Gallop, M. A. XP13512 [(±)-1-([(alpha-isobutanoyloxyethoxy)-carbonyl] aminomethyl)-1-cyclohexane acetic acid], a novel gabapentin prodrug: II. Improved oral bioavailability, dose proportionality, and colonic absorption compared with gabapentin in rats and monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 311, 324–333.

(49) HORIZANT: NDA 022399-FDA approved labeling text.
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/022399s006,s007lbl.pdf (accessed September 1, 2014).

(50) Miwa, M.; Ura, M.; Nishida, M.; Sawada, N.; Ishikawa, T.; Mori, K.; Shimma, N.; Umeda, I.; Ishitsuka, H. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur. J. Cancer.* **1998**, 34, 1274–1281.

(51) Ghosh, A. K.; Ramu Sridhar, P.; Kumaragurubaran, N.; Koh, Y.; Weber, I. T.; Mitsuya, H. Bis-tetrahydrofuran: a privileged ligand for darunavir and a new generation of hiv protease inhibitors that combat drug resistance. *ChemMedChem* **2006**, 1, 939–950.

(52) Tung, R. D.; Livingston, D. J.; Rao, B. G.; Kim, E. E.; Baker, C. T.; Boger, J. S.; Chambers, S. P.; Deininger, D. D.; Dwyer, M.; Elsayed, L.; Fulghum, J.; Li, B.; Murcko, M. A.; Navia, M. A.; Novak, P.; Pazhanisamy, S.; Stuver, C.; Thomson, J. A., Design and synthesis of Amprenavir, a novel HIV protease inhibitor. In *Protease Inhibitors in AIDS Therapy*; Ogden, R. C., Flexner, C. W., Eds.; Marcel Dekker Inc.: New York, **2001**; pp 101–137.

(53) Ghosh, A. K.; Kincaid, J. F.; Cho, W.; Walters, D. E.; Krishnan, K.; Hussain, K. A.; Koo, Y.; Cho, H.; Rudall, C.; Holland, L.; Buthod, J. Potent HIV protease inhibitors incorporating high-affinity P2-ligands and (R)-(hydroxyethylamino)sulfonamide isostere. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 687–690.

(54) Ghosh, A. K.; Chapsal, B. D.; Mitsuya, H., Darunavir, a new PI with dual mechanism: from a novel drug design concept to new hope against drug-resistant HIV. In *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*; Ghosh, A. K., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2010**; Vol. 45, pp 205–243

(55) Ghosh, A. K.; Xu, C. X.; Rao, K. V.; Baldrige, A.; Agniswamy, J.; Wang, Y. F.; Weber, I. T.; Aoki, M.; Miguel, S. G.; Amano, M.; Mitsuya, H. Probing multidrug-resistance and protein-ligand interactions with oxatricyclic designed ligands in HIV-1 protease inhibitors. *ChemMedChem* **2010**, 5, 1850–1854.

(56) Tang, J.; Hong, L.; Ghosh, A. K. The discovery of β -secretase and development toward a clinical inhibitor for AD: an exciting academic collaboration. In *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*; Ghosh, A. K., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2010**; Vol. 45, pp 413–440.

- (57) Ghosh, A. K.; Kumaragurubaran, N.; Hong, L.; Lei, H.; Hussain, K. A.; Liu, C. F.; Devasamudram, T.; Weerasena, V.; Turner, R.; Koelsch, G.; Bilcer, G.; Tang, J. Design, synthesis and X-ray structure of protein-ligand complexes: important insight into selectivity of memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5310–5311.
- (58) Freskos, J. N.; Fobian, Y. M.; Benson, T. E.; Bienkowski, M. J.; Brown, D. L.; Emmons, T. L.; Heintz, R.; Laborde, A.; McDonald, J. J.; Mischke, B. V.; Molyneaux, J. M.; Moon, J. B.; Mullins, P. B.; Bryan Prince, D.; Paddock, D. J.; Tomasselli, A. G.; Winterrowd, G. Design of potent inhibitors of human beta-secretase. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 73–77.
- (59) Freskos, J. N.; Fobian, Y. M.; Benson, T. E.; Moon, J. B.; Bienkowski, M. J.; Brown, D. L.; Emmons, T. L.; Heintz, R.; Laborde, A.; McDonald, J. J.; Mischke, B. V.; Molyneaux, J. M.; Mullins, P. B.; Bryan Prince, D.; Paddock, D. J.; Tomasselli, A. G.; Winterrowd, G. Design of potent inhibitors of human beta-secretase. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 78–81.
- (60) Peters, J. U.; Galley, G.; Jacobsen, H.; Czech, C.; David-Pierson, P.; Kitas, E. A.; Ozmen, L. Novel orally active, dibenzazepinone-based gamma-secretase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5918–5923.
- (61) Guo, T.; Gu, H.; Hobbs, D. W.; Rokosz, L. L.; Stauffer, T. M.; Jacob, B.; Clader, J. W. Design, synthesis, and evaluation of tetrahydroquinoline and pyrrolidine sulfonamide carbamates as gamma-secretase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3010–3013.

(62) Bergstrom, C. P.; Sloan, C. P.; Lau, W. Y.; Smith, D. W.; Zheng, M.; Hansel, S. B.; Polson, C. T.; Corsa, J. A.; Barten, D. M.; Felsenstein, K. M.; Roberts, S. B. Carbamate-appended Nalkylsulfonamides as inhibitors of gamma-secretase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 464–468.

(63) Walker, B.; Lynas, J. F. Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, 58, 596–624.

(64) Imperiali, B.; Abeles, R. H. Inhibition of serine proteases by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochemistry* **1986**, 25, 3760–3767.

(65) Edwards, P. D.; Andisik, D. W.; Bryant, C. A.; Ewing, B.; Gomes, B.; Lewis, J. J.; Rakiewicz, D.; Steelman, G.; Strimpler, A.; Trainor, D. A.; Tuthill, P. A.; Mauger, R. C.; Veale, C. A.; Wildonger, R. A.; Williams, J. C.; Wolanin, D. J.; Zottola, M. Discovery and biological activity of orally active peptidyl trifluoromethyl ketone inhibitors of human neutrophil elastase. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1876–1885.

(66) Malcolm, B. A.; Liu, R.; Lahser, F.; Agrawal, S.; Belanger, B.; Butkiewicz, N.; Chase, R.; Gheyas, F.; Hart, A.; Hesk, D.; Ingravallo, P.; Jiang, C.; Kong, R.; Lu, J.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Skelton, A.; Tong, X.; Venkatraman, S.; Xia, E.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha interferon in replicon cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50, 1013–1020.

(67) Bogen, S. L.; Arasappan, A.; Bennett, F.; Chen, K.; Jao, E.; Liu, Y. T.; Lovey, R. G.; Venkatraman, S.; Pan, W.; Parekh, T.; Pike, R. E.; Ruan, S.; Liu, R.; Baroudy, B.; Agrawal, S.; Chase, R.; Ingravallo, P.; Pichardo, J.; Prongay, A.; Brisson, J. M.; Hsieh, T. Y.; Cheng, K. C.; Kemp, S. J.; Levy, O. E.; Lim-Wilby, M.; Tamura, S. Y.; Saksena, A. K.; Girijavallabhan, V.; Njoroge, F. G. Discovery of SCH446211 (SCH6): a new ketoamide inhibitor of the HCV NS3 serine protease and HCV subgenomic RNA replication. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 2750–2757.

(68) Edwards, P. D.; Bernstein, P. R. Synthetic inhibitors of elastase. *Med. Res. Rev.* **1994**, 14, 127–194.

(69) Guedj, J.; Dahari, H.; Rong, L.; Sansone, N. D.; Nettles, R. E.; Cotler, S. J.; Layden, T. J.; Uprichard, S. L.; Perelson, A. S. Modeling shows that the NS5A inhibitor daclatasvir has two modes of action and yields a shorter estimate of the hepatitis C virus half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, 110, 3991–3996.

(70) Afdhal, N.; Zeuzem, S.; Kwo, P.; Chojkier, M.; Gitlin, N.; Puoti, M.; Romero-Gomez, M.; Zarski, J. P.; Agarwal, K.; Buggisch, P.; Foster, G. R.; Brau, N.; Buti, M.; Jacobson, I. M.; Subramanian, G. M.; Ding, X.; Mo, H.; Yang, J. C.; Pang, P. S.; Symonds, W. T.; McHutchison, J. G.; Muir, A. J.; Mangia, A.; Marcellin, P. Ledipasvir and sofosbuvir for untreated HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 1889–1898.

(71) Buhling, F.; Fengler, A.; Brandt, W.; Welte, T.; Ansorge, S.; Nagler, D. K. Review: novel cysteine proteases of the papain family. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2000**, 477, 241–254.

- (72) Nicoll-Griffith, D. A. Use of cysteine-reactive small molecules in drug discovery for trypanosomal disease. *Expert Opin. Drug Discovery* **2012**, 7, 353–366.
- (73) Kong, J. S.; Venkatraman, S.; Furness, K.; Nimkar, S.; Shepherd, T. A.; Wang, Q. M.; Aube, J.; Hanzlik, R. P. Synthesis and evaluation of peptidyl Michael acceptors that inactivate human rhinovirus 3C protease and inhibit virus replication. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 2579–2587.
- (74) Kim, T. S.; Hague, A. B.; Lee, T. I.; Lian, B.; Tegley, C. M.; Wang, X.; Burgess, T. L.; Qian, Y. X.; Ross, S.; Tagari, P.; Lin, C. H.; Mayeda, C.; Dao, J.; Jordan, S.; Mohr, C.; Cheetham, J.; Viswanadhan, V.; Tasker, A. S. 4-Piperidinylphenyl)aminoethyl amides as a novel class of non-covalent cathepsin K inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 87–90.
- (75) Thurmond, R. L.; Beavers, M. P.; Cai, H.; Meduna, S. P.; Gustin, D. J.; Sun, S.; Almond, H. J.; Karlsson, L.; Edwards, J. P. Nonpeptidic, noncovalent inhibitors of the cysteine protease cathepsin S. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 4799–4801.
- (76) Seierstad, M.; Breitenbucher, J. G. Discovery and development of fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7327–7343.
- (77) Labar, G.; Bauvois, C.; Borel, F.; Ferrer, J. L.; Wouters, J.; Lambert, D. M. Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling. *ChemBioChem* **2010**, 11, 218–227.

(78) Long, J. Z.; Li, W.; Booker, L.; Burston, J. J.; Kinsey, S. G.; Schlosburg, J. E.; Pavon, F. J.; Serrano, A. M.; Selley, D. E.; Parsons, L. H.; Lichtman, A. H.; Cravatt, B. F. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 37–44.

(79) Chang, J. W.; Niphakis, M. J.; Lum, K. M.; Coggnetta, A. B., III; Wang, C.; Matthews, M. L.; Niessen, S.; Buczynski, M. W.; Parsons, L. H.; Cravatt, B. F. Highly selective inhibitors of monoacylglycerol lipase bearing a reactive group that is bioisosteric with endocannabinoid substrates. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 579–588.

(80) Gattinoni, S.; Simone, C. D.; Dallavalle, S.; Fezza, F.; Nannei, R.; Battista, N.; Minetti, P.; Quattrociochi, G.; Caprioli, A.; Borsini, F.; Cabri, W.; Penco, S.; Merlini, L.; Maccarrone, M. A new group of oxime carbamates as reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4406–4411.

(81) Butini, S.; Brindisi, M.; Gemma, S.; Minetti, P.; Cabri, W.; Gallo, G.; Vincenti, S.; Talamonti, E.; Borsini, F.; Caprioli, A.; Stasi, M. A.; Di Serio, S.; Ros, S.; Borrelli, G.; Maramai, S.; Fezza, F.; Campiani, G.; Maccarrone, M. Discovery of potent inhibitors of human and mouse fatty acid amide hydrolases. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6898–6915.

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto volevo ringraziare le mie relatrici, la Dott.ssa Silvia Salerno e la Prof.ssa Sabrina Taliani per aver contribuito, con la loro disponibilità e i loro consigli, alla realizzazione della mia tesi.

Il ringraziamento più grande però va alla mia famiglia: ai miei fratelli Marco e Daniele, ma soprattutto ai miei genitori per aver mantenuto economicamente i miei studi e per avermi sempre sostenuto, lasciandomi sempre tranquillo durante il percorso di studi.

Un grandissimo grazie va a Ilaria la mia compagna universitaria, e amica di tutti i giorni, che mi ha da sempre aiutato con i suoi preziosissimi consigli. Grazie perché hai sempre creduto in me anche nei momenti di difficoltà.

Ringrazio poi tutti i miei amici e amiche che hanno condiviso con me tutti i momenti durante il mio percorso all'università. Per me siete come una seconda famiglia e senza di voi tutto questo sarebbe stato molto più duro.

Grazie anche a tutti i miei compagni d'università, soprattutto alle bimbe dell' "iper" con cui ho passato anche dei bei momenti al di fuori dell'ambito universitario.

Insomma un'infinite grazie a tutti, anche quelli che non ho citato e che sono presenti in questo giorno importante, chi magari ha speso un semplice 'in bocca al lupo' prima di un mio esame, oppure chi, facendo un piccolo gesto mi ha aiutato durante questi anni.