

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO

Facoltà di Farmacia

Dottorato di Ricerca in Chimica del Farmaco XXIV ciclo

Settore Scientifico-Disciplinare: CHIM/08



**SINTESI DI NUOVE MOLECOLE PER IL TRATTAMENTO
DI PATOLOGIE INFIAMMATORIE**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa Anna SPARATORE

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Ermanno VALOTI

Tesi di Dottorato di:

Dott. Valerio Tazzari

Matr. N. R08356

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag. 4
2. CHIMICA	Pag. 33
3. PARTE SPERIMENTALE CHIMICA	Pag. 47
4. ATTIVITA' FARMACOLOGICA	Pag. 101
5. CONCLUSIONI	Pag. 121
6. BIBLIOGRAFIA	Pag. 123

SINTESI DI NUOVE MOLECOLE PER IL TRATTAMENTO DI PATOLOGIE INFIAMMATORIE

Abstract

Recentemente il ruolo dell'idrogeno solforato (H_2S), ha suscitato un notevole interesse. Infatti si è visto che esso è prodotto in quantità consistenti dai tessuti dei mammiferi ed esercita molti effetti fisiologici che suggeriscono un suo ruolo potenziale come mediatore regolatorio. L' H_2S è coinvolto nella regolazione del tono vascolare, della funzione erettile, della contrattilità miocardica, nei processi infiammatori, nella neurotrasmissione e nella secrezione dell'insulina. Deficienza di H_2S è stata osservata in vari modelli animali di ipertensione arteriosa e polmonare, malattia di Alzheimer, danni alla mucosa gastrica e cirrosi epatica. L' H_2S esogeno inibisce l'infiammazione, migliora le disfunzioni miocardiche associate con l'ischemia/riperfusion e riduce il danno della mucosa gastrica indotta da farmaci antinfiammatori. D'altra parte, se non opportunamente controllato, ed in dosi eccessive, l' H_2S endogeno può contribuire all'infiammazione tissutale attraverso la stimolazione dei relativi enzimi di conversione (CBA e CBS). H_2S ha anche un ruolo attivo negli squilibri dei processi ossido-riduttivi. In particolare questo mediatore gassoso influisce sull'attivazione dei processi infiammatori cellulari, interagendo con i meccanismi di trasmissione del segnale, con i fattori di trascrizione e neutralizzando i ROS. Inoltre è stato riportato avere proprietà citoprotettive attraverso la produzione di glutatione (GSH) in diversi tessuti.

Su questa base risulta evidente l'utilità di disporre di molecole in grado di modulare opportunamente la concentrazione plasmatica e tissutale di H_2S , soprattutto in presenza di patologie caratterizzate da disturbi nell'omeostasi del glutatione e dall'aumento dello stress ossidativo, come avviene in alcune malattie neurodegenerative (es. malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson) e in molte patologie polmonari, metaboliche e del sistema cardiocircolatorio.

Un approccio interessante e sicuramente innovativo è la sintesi di molecole ibride che uniscano alla struttura di un farmaco noto una porzione solforata in grado di rilasciare lentamente H₂S in vivo. Pertanto, scopo della presente tesi è stata la sintesi di ibridi di farmaci attivi in patologie neurodegenerative (PD), come derivati solforati della L-DOPA e la realizzazione di “H₂S-releasing drugs” attivi sul sistema circolatorio periferico, come ad es. derivati solforati di inibitori delle fosfodiesterasi 5 (PDE-5), allo scopo di migliorare l’efficacia e la tollerabilità del farmaco originale. Sono stati anche sintetizzati ibridi della cisteina accoppiati a ditioltioni, indirizzati al trattamento di particolari condizioni metaboliche come l’iperomocisteinemia.

Dagli studi farmacologici fin’ora realizzati, gli “H₂S-releasing drugs”, sintetizzati nell’ambito della presente tesi, hanno mostrato, attraverso il rilascio e la modulazione di H₂S *in vivo*, importanti proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie e citoprotettive, pur mantenendo le proprietà farmacologiche del farmaco di partenza. Tali dati confermano la potenziale utilità dei nuovi composti nel trattamento delle numerose e diverse patologie in cui sia presente una componente infiammatoria e/o uno squilibrio ossido-riduttivo.

1. INTRODUZIONE

L'infiammazione o flogosi è un meccanismo di difesa non specifico innato, che costituisce una risposta protettiva, seguente all'azione dannosa di agenti fisici, chimici e biologici, il cui obiettivo finale è l'eliminazione della causa iniziale di danno cellulare o tissutale. L'infiammazione consiste in una sequenza dinamica di fenomeni che si manifestano con una intensa reazione vascolare. Questi fenomeni presentano caratteristiche relativamente costanti, nonostante l'infinita varietà di agenti lesivi, in quanto non sono determinati soltanto dall'agente lesivo, quanto soprattutto dalla liberazione di sostanze endogene: i mediatori chimici della flogosi. I fenomeni elementari, che costituiscono la risposta infiammatoria, comprendono vasodilatazione e aumento di permeabilità, che portano al passaggio di liquidi dal letto vascolare al tessuto lesso (edema) ed infiltrazione leucocitaria nell'area di lesione. L'infiammazione serve, dunque, a distruggere, diluire e confinare l'agente lesivo, ma allo stesso tempo mette in moto una serie di meccanismi che favoriscono la riparazione o la sostituzione del tessuto danneggiato.

Clinicamente, i segni cardini dell'infiammazione sono: arrossamento, tumefazione, calore della parte infiammata, dolore, alterazione funzionale (rubor, tumor, calor, dolor, functio lesa). Sono manifestazione delle modificazioni tissutali che consistono in: vasodilatazione, aumento permeabilità, stasi circolatoria e infiltrazione leucocitaria. L'infiammazione viene classificata secondo un criterio temporale in infiammazione acuta e infiammazione cronica. Quest'ultima può poi essere distinta secondo un criterio spaziale in diffusa (infiammazione cronica interstiziale) oppure circoscritta (infiammazione cronica granulomatosa).

Durante il processo infiammatorio vengono prodotti importanti mediatori chimici di origine plasmatica e cellulare, come amine vasoattive (es. istamina e 5-idrossitriptamina), proteasi plasmatiche e metaboliti dell'ac. arachidonico (prostaglandine, leucotrieni e lipoxine). Le cellule infiammatorie e l'endotelio vascolare producono pure un complesso sistema di citochine e chemochine che regolano la funzione leucocitaria attraverso l'attivazione (es di IL-2, IL-4, IFN- α e IFN- β) o l'inibizione (es. di IL-10 e TGF- β) delle risposte immunitarie. Le citochine attivano le cellule infiammatorie (es. TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e IL-6) o stimolano l'ematopoiesi e la crescita e la differenziazione leucocitaria (es. IL-3 e IL-7) [1].

E' stato ipotizzato che mediatori gassosi fisiologici come l'ossido nitrico (NO) e il monossido di carbonio (CO), siano coinvolti nel processo infiammatorio[2].

Più recentemente, un terzo gas endogeno, l'idrogeno solforato (H₂S) è stato proposto come un mediatore infiammatorio addizionale, sebbene il suo preciso ruolo sia tuttora controverso [3].

1.1 Idrogeno solforato (H₂S)

L'idrogeno solforato (H₂S) è conosciuto come gas incolore con un forte odore repellente usato spesso per descrivere l'odore di uova marce [4].

In acqua o nel plasma H₂S si comporta come acido debole con una pKa a 37°C di 6,76. È una molecola altamente lipofila e penetra liberamente tutti i tipi di cellule senza l'utilizzo di trasportatori specifici.

Per secoli l'idrogeno solforato è stato visto soltanto come un gas tossico ed un pericolo ambientale fino a che la scoperta nel 1989 e 1990 di concentrazioni relativamente alte di H₂S nel cervello di ratto, bovino e umano ha suggerito l'esistenza di un suo potenziale ruolo fisiologico [5-7]. Esistono dati contrastanti

sulle concentrazioni di H₂S nei tessuti e nel sangue di soggetti sani, con valori oscillanti dai 10-300 μM a valori di due ordini di grandezza più bassi [8-11]. Questa discrepanza di dati sembra essere legata ai diversi metodi di analisi utilizzati, con formazione di numerosi artefatti dovuti all'instabilità dei solfuri, all'alta volatilità e alla grande suscettibilità all'ossidazione dell'H₂S, alla sua aderenza ai materiali utilizzati o all'erroneo rilascio di solfuri da parte di materiali solforati. Inoltre molti lavori non distinguono tra H₂S libero e solfuri acido-labili e solfuri non acido labili. Studi sperimentali hanno dimostrato che H₂S è sintetizzato nei tessuti dei mammiferi tramite due enzimi piridossal-5'-fosfato-dipendenti, responsabili del metabolismo della L-cisteina: la cistationina-β-sintasi (CBS) e la cistationina-γ-liasi (CSE)[12,13] (Fig.1).

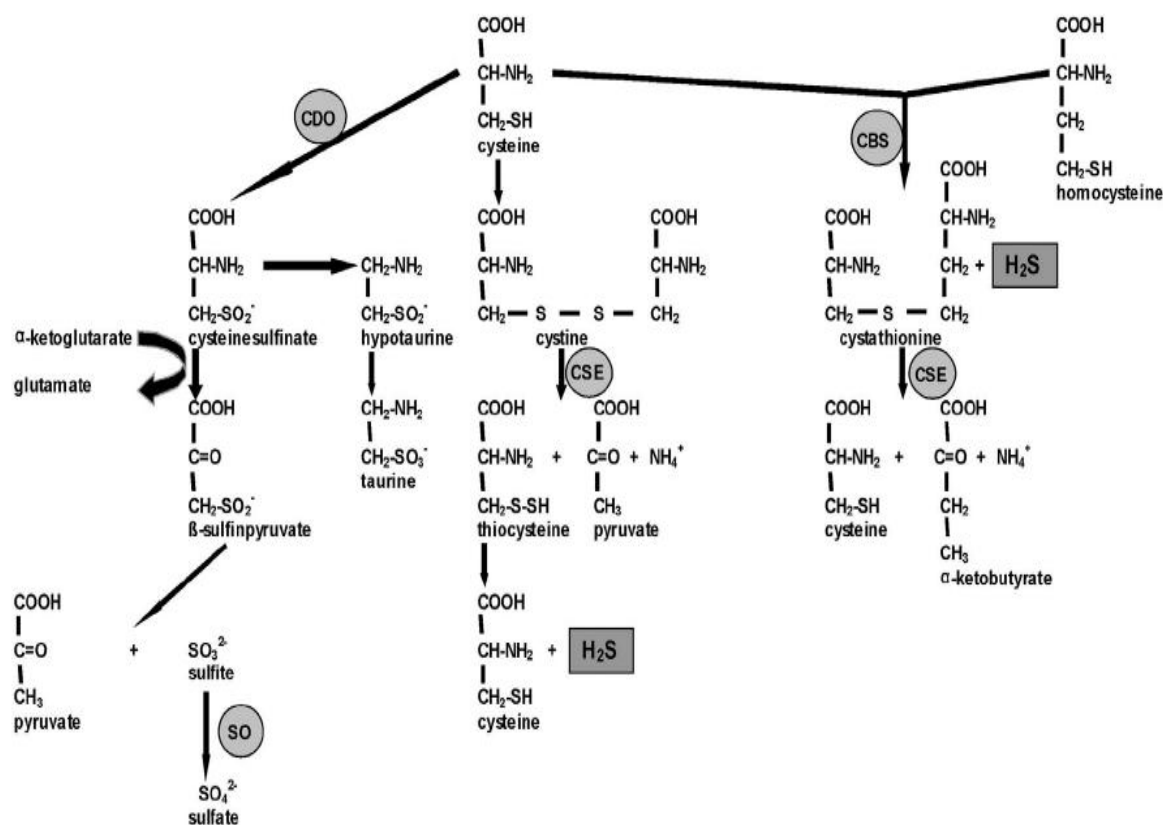


Figura 1. Metabolismo della cisteina. CBS: cistationina β-sintasi. CDO: cisteina di ossigenasi. CSE: cistationina γ-liasi. SO: solfito ossidasi. [47]

Recentemente è stata dimostrata l'esistenza di un terzo enzima produttore di H₂S, la 3-mercaptosulfurtransferasi (3MST) che in combinazione con la cisteina-amino-transferasi (CAT) produce H₂S nel cervello e nel tessuto vascolare endoteliale [14].

Il substrato di CBS e CSE, L-cisteina, può derivare da risorse alimentari o può essere liberata da proteine endogene. Può anche essere sintetizzato endogenamente dalla L-metionina attraverso la via di trans-solforazione [9, 15].

Nei mammiferi, la maggior attività della CBS si sviluppa nel cervello e nel sistema nervoso mentre l'attività di CSE è più alta nei tessuti periferici (fegato, rene e vasi sanguigni) [16].

CBS e CSE sono entrambi enzimi contenenti un gruppo eme la cui attività dipende dal cofattore piridossal-5'-fosfato [12, 17]. L'attività di CBS può essere direttamente inibita dall'ossido nitrico (NO) e dal monossido di carbonio (CO) [18].

La regolazione di CSE è meno conosciuta, ma ci sono evidenze che MZF1 (myeloid zinc finger 1) e la proteina SP1 (conosciuta come fattore di trascrizione Sp1) siano implicati nella sua attività trascrizionale [16], e che l'enzima può essere sovra regolato da endotossine batteriche [19].

CBS è in grado di catalizzare la reazione della cisteina con altri tioli liberi per generare H₂S; inoltre, la tiocisteina generata da CSE può interagire con i tioli per generare H₂S [12, 17].

La flora enterobatterica è un'ulteriore risorsa di H₂S. L'epitelio intestinale esprime sistemi enzimatici specializzati che degradano efficacemente solfuro a tiosolfato e solfato, presumibilmente per proteggersi da alte concentrazioni di solfuro, e per prevenire un'eccessiva entrata nel sistema circolatorio di idrogeno solforato [9, 20].

Ci sono anche molte fonti inorganiche di H₂S nel corpo, inclusa una riduzione non-enzimatica dello zolfo con l'utilizzo di equivalenti riducenti ottenuti dall'ossidazione del glucosio negli eritrociti [21].

Si hanno meno conoscenze in merito alla via di eliminazione di H₂S dal corpo, anche se sono state identificate molte alternative. H₂S può essere ossidato rapidamente nei mitocondri a tiosolfato e quindi convertito poi ulteriormente a solfito e solfato (via probabilmente predominante nel colon) [20]. Può subire anche metilazione nelle cellule citosoliche mediante la tiol-S-metiltransferasi e può legarsi alla metaemoglobina per formare sulfoemoglobina [22]. (fig.2)

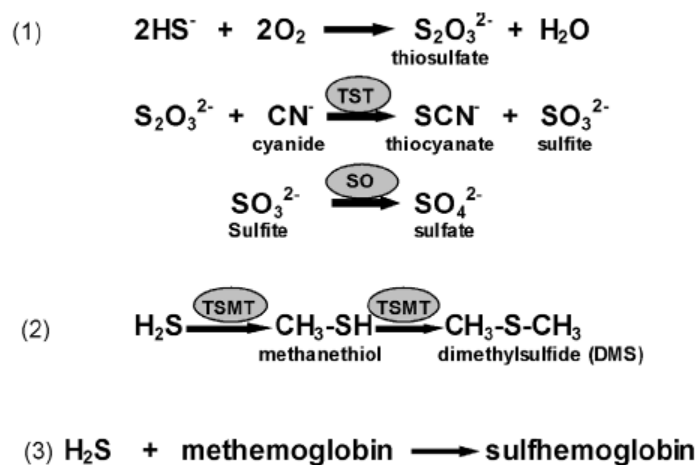


Figura 2. Catabolismo di H₂S.(1): ossidazione mitocondriale. (2): metilazione citosolica. (3): legame all'emoglobina. SO: solfito ossidasi. TSMT: tiolo S-metiltransferasi. TST: tiosolfato-cianuro-zolfo-transferasi (rodanasi).

I ruoli biologici dell'H₂S sono molteplici. Parecchi studi indicano un suo potenziale ruolo fisiologico come modulatore endogeno del tono vascolare e della pressione sanguigna [23-26], nella nocicezione, nella funzione cardiaca, nella funzione dei neutrofili, nella regolazione della risposta infiammatoria e nella funzione erettile. La produzione di idrogeno solforato endogeno sembra avere una funzione protettiva nell'aterosclerosi. Similmente a NO e CO, gli effetti di H₂S variano da effetti fisiologici e citoprotettivi (che si manifestano a basse concentrazioni) a effetti citotossici (che si manifestano a concentrazioni più alte).

I meccanismi molecolari dell'azione biologica dell'H₂S includono effetti antiossidanti, sia tramite reazioni chimiche dirette con varie specie chimiche ossidanti [27-31], come pure attraverso l'aumento dei livelli di glutatione (GSH) cellulare, attraverso l'attivazione/espressione di gammaglutamilcisteina sintetasi [20]; modulazione dei pathway della caspasi e delle chinasi cellulari [21,22], effetti stimolatori dell'AMP ciclico[23]; modulazione dei livelli di calcio intracellulari e aumento delle risposte mediate dai recettori NMDA nel cervello[12].

Un tema molto discusso è l'effetto pro- e anti-infiammatorio di H₂S, dato che entrambi gli effetti vengono riportati in letteratura. Una situazione simile è stata illustrata anche per NO. È stato dimostrato che H₂S può indurre una sovra regolazione dei geni anti-infiammatori e citoprotettivi inclusa la eme-ossigenasi

(HO1; anche nota come HMOX1) nelle cellule della muscolatura liscia polmonare [36], in macrofagi *in vitro* [37] e in tessuti nasali di ratto *in vivo*. Attraverso una sovraregolazione di HO1, H₂S può innescare la produzione di CO, un altro gastrasmittitore con effetti citoprotettivi e anti-infiammatori ben documentati [38]. Inoltre l'azione di H₂S può risultare in una sotto regolazione dei geni dell'infiammazione (COX2, FOS, IL1 β) e in un'inibizione dell'espressione di enzimi che sono coinvolti nella produzione di specie ossidanti reattive quali la NADPH ossidasi e Rac1[31]. H₂S determina l'apertura dei canali del potassio-ATP dipendenti (canali K_{ATP}) [39, 40] con conseguenti effetti vasodilatatori e rilassanti la muscolatura liscia ed effetti protettivi cardiaci. L'esposizione della muscolatura liscia vascolare umana a H₂S provoca anche l'apoptosi di queste cellule [41], un effetto visto in altre cellule, come nei fibroblasti ma non, curiosamente, nei leucociti, nei quali H₂S impedisce l'apoptosi [42]. Studi sugli effetti metabolici di H₂S hanno rivelato che, similmente a NO e a CO, esercita potenti effetti sulla funzione e sulla respirazione mitocondriale [43,44]. Esistono quindi evidenze sempre maggiori che un elevato numero di patologie siano causate o abbiano come conseguenza, un'alterata produzione di H₂S nell'organismo. Studi farmacologici degli ultimi anni stanno cercando di mettere in luce, non solo i meccanismi della regolazione basale del rilascio di H₂S, ma anche il possibile ruolo di molecole esogene donatrici di H₂S.

1.1.1 H₂S nel sistema nervoso

Nel 1996 Abe e Kimura furono i primi a dimostrare un'elevata espressione di CBS nell'ippocampo e nel cervelletto di ratto e la produzione *in vitro* di H₂S da omogenati di cervello[12].

La produzione di H₂S nel cervello è bloccata da inibitori di CBS, ma non da inibitori di CSE ed è significativamente ridotta in topi mancanti del gene codificante per CBS [45]. Inoltre concentrazioni fisiologiche migliorano la neurotrasmissione mediata da recettori NMDA e facilita la propagazione delle Long Term Potentiation (LTP)[35].

L'H₂S aumenta la sensibilità al glutammato dei recettori NMDA in modo cAMP dipendente [46] ed aumenta i livelli di Ca²⁺ negli astrociti principalmente attraverso

l'influsso dall'ambiente extracellulare ed in minor parte dal suo rilascio dai depositi intracellulari [48]. Diversamente da quel che accade nei neuroni, negli astrociti la produzione di H₂S avviene per opera di CSE ed i suoi effetti sugli influssi di Ca²⁺ sono mediati dal cAMP e dalla proteina chinasi A [35].

Inibitori farmacologici della biosintesi di H₂S includono la DL-propargilglicina (PAG) e la β-cianoalanina (BCA) [49, 50]. Questi composti, anche se di bassa potenza, di bassa selettività e di limitata permeabilità della membrana cellulare, sono usati in molti studi per esaminare l'effetto biologico dell'inibizione della produzione di H₂S endogena.

Il gene codificante per CBE è allocato nel cromosoma 21 e si pensa quindi che H₂S sia sovraprodotto in soggetti affetti da Sindrome di Down. Sono stati osservati livelli di tiosolfati 2 volte maggiori in pazienti con Trisomia 21 rispetto a soggetti sani.[51] Assumendo che il tiosolfato sia uno specifico prodotto finale di H₂S, questi risultati suggeriscono una sua sovrapproduzione e sono in accordo con i più bassi livelli di omocisteina e sulfoemoglobina notati in questi pazienti.[52]

E' stato ipotizzato che un eccesso di H₂S eserciti effetti tossici a livello neuronale attraverso l'inibizione della citocromo c ossidasi e/o la sovra stimolazione dei recettori NMDA e contribuisce quindi ad un progressivo ritardo mentale in soggetti con Trisomia 21.[53]

E' stato inoltre osservato che la somministrazione di NaHS (usato come donatore di H₂S) o L-cisteina aumenta, mentre inibitori di CBS e CSE riducono, l'area ischemica del cervello in seguito ad occlusione dell'arteria cerebrale.[54] Questi dati suggeriscono un effetto dannoso dell' H₂S in modelli sperimentali di infarto ischemico.[55]

Tuttavia vi sono dati che suggeriscono che H₂S può avere un effetto positivo per i neuroni e quindi la sua deficienza a livello cerebrale potrebbe essere dannosa. Infatti è stato dimostrato che H₂S protegge i neuroni dalla tossicità indotta dal glutammato. La sovrapproduzione di glutammato è stata osservata in alcune condizioni patologiche come traumi, ischemia cerebrale, attacchi epilettici ecc. Gli effetti neurotossici di questo amminoacido eccitatorio è generalmente attribuito alla sovra stimolazione dei suoi recettori. Tuttavia il glutammato può esercitare effetti neurotossici anche in modo recettore-indipendente (fenomeno denominato ossitosi). Il meccanismo del danno è associato all'inibizione dell'antiporto

cistina/glutammato, responsabile dell'ingresso di cistina nei neuroni e della contemporanea estrusione di glutammato.

Il glutammato extracellulare inibisce questo scambio portando ad una deficienza dei livelli intracellulari di cisteina e una riduzione della sintesi di glutatione (GSH) che rende la cellula più sensibile allo stress ossidativo.

Il trattamento di neuroni corticali con NaHS aumenta le concentrazioni intracellulari di GSH e protegge dalla morte cellulare indotta dal glutammato. NaHS incrementa le concentrazioni intracellulari di cisteina e γ -glutamylcisteina (γ -GC), precursore di GSH, e il suo effetto protettivo è soppresso da inibitori di γ -GC sintasi come la butionina sulfossimina[27]. Il meccanismo attraverso il quale H_2S stimola l'antiporto cistina/glutammato non è chiaro ma non è associato alle proprietà riduttive di questo gasotrasmettitore. Recentemente infatti è stato dimostrato che l'effetto protettivo di H_2S verso la neurotossicità indotta da ischemia o da glutammato è mimata da attivanti dei canali del K_{ATP} ed è soppressa da bloccanti dei canali del K_{ATP} . [30]

L'altro meccanismo attraverso cui H_2S è in grado di proteggere i neuroni è agendo da scavenger per specie radicaliche all'ossigeno e all'azoto. Infatti è stato dimostrato essere in grado di contrastare la nitratura della tirosina indotta da perossinitriti, attenuandone la citotossicità e di limitare gli effetti tossici dell'acido ipocloroso in culture cellulari umane di neuroblastoma SH-SY5Y. [56,57]

Quindi H_2S può avere un ruolo benefico in patologie del sistema nervoso centrale associate ad un aumento della produzione di specie radicaliche, come la malattia di Alzheimer[58] e il morbo di Parkinson [59,60,61].

1.1.2 H_2S nel sistema cardiovascolare

Mentre CBS è l'enzima maggiormente responsabile della sintesi di H_2S a livello cerebrale, nel sistema cardiovascolare è principalmente prodotto da CSE espresso nelle cellule muscolari lisce vasali ma non nelle cellule endoteliali. [62]

È stato dimostrato che H_2S può indurre dilatazione dei vasi sanguigni isolati e ridurre la pressione sanguigna [4, 43]. I dati attualmente disponibili indicano che il suo effetto vaso rilassante è dovuto alla apertura dei canali K_{ATP} a livello delle cellule muscolari lisce vasali. Infatti la glibenclamide, antagonista dei canali K_{ATP} , ne attenua l'effetto ipotensivo *in vivo* e l'effetto vasodilatatorio *in vitro*. [62] L'effetto

vasodilatatorio è inoltre attenuato quando le cellule vasali sono incubate con elevate concentrazioni di K^+ . Attivando questi canali l' H_2S è in grado di indurre iperpolarizzazione delle cellule muscolari lisce vasali. E' interessante notare che inibitori di CSE riducono la corrente iperpolarizzante indicando che H_2S endogeno stimola continuamente questi canali in condizioni basali.[62].

I vasi sanguigni non sono i soli a rispondere con rilassamento; *in vitro* sia la muscolatura liscia gastrointestinale [50] che quella delle vie aeree [63] rispondono con lo stesso effetto. La produzione endogena di idrogeno solforato sembra avere un ruolo nel rilassamento della muscolatura liscia della vescica urinaria.

Comunque l'effetto sui vasi sanguigni non è così semplice, parte del rilassamento è dipendente dall'endotelio, mediato dal rilascio di NO e/o da fattori derivati dalla sua iperpolarizzazione [64]. L'effetto vascolare è drammaticamente dipendente dalla concentrazione di ossigeno circostante, tanto che l'effetto di H_2S in sistemi vascolari ben ossigenati risulta essere una rapida vasocostrizione [65].

Concentrazioni fisiologiche sono state indicate inibire la respirazione mitocondriale, un effetto dose dipendente e transitorio che potrebbe promuovere la sopravvivenza delle cellule miocardiche durante l'ischemia/riperfusion (I/R) del miocardio [43]. Gli effetti mitocondriali sono stati indicati essere mediati in parte tramite l'inibizione reversibile della citocromo c ossidasi (complesso IV della catena di trasporto elettronica) attraverso una reazione che inibisce il suo centro rameoso [43, 44].

Inoltre, H_2S ha attività ionotropica negativa sia *in vivo* che *in vitro* sul cuore [66].

Indagini recenti sugli effetti vascolari di H_2S hanno rivelato che questo gas ha profondi effetti sulla formazione e sulla crescita vascolare. Dosaggi fisiologicamente rilevanti di H_2S promuovono una robusta risposta angiogenica che è in gran parte dipendente all'attivazione di Akt [67].

Il profilo fisiologico di H_2S rende questo gastrasmittitore un interessante strumento farmacologico per il trattamento delle malattie del sistema cardiovascolare, malgrado la sua reputazione di gas nocivo. Sembra infatti che abbia tutti gli effetti positivi di NO tranne la capacità di formare un metabolita tossico quale $ONOO^-$ [68].

Molti studi si sono concentrati sugli effetti cardioprotettivi di H_2S [69,70]. Il meccanismo di questa protezione può essere (almeno in parte) relativa all'abilità di H_2S di attivare i canali K_{ATP} del miocardio: in cellule o animali in cui sono stati

inibiti farmacologicamente i canali K_{ATP} l'effetto cardioprotettivo di H_2S è infatti diminuito [69, 71].

Gli effetti di H_2S sono attribuiti all'abilità del composto di indurre preconditionamento del miocardio [69, 71, 72]. Questo effetto, nuovamente, deve essere collegato (almeno in parte) ai canali K_{ATP} [73, 74] la cui attivazione può indurre anche vasodilatazione locale la quale a sua volta può contribuire agli effetti cardioprotettivi. Un altro meccanismo col quale H_2S esercita il suo effetto cardioprotettivo può essere riferito all'abilità di ridurre l'adesione dei neutrofili [75] ed anche inibire l'effetto dell'aggregazione piastrinica [76].

Effetto supplementare, è l'abilità di neutralizzare specie citotossiche reattive, come il perossinitrito [28], specie reattiva dell'azoto che gioca un ruolo patogeno importante nell'infarto miocardico [77].

1.1.3. H_2S e metabolismo dell'omocisteina

Ci sono evidenze sempre maggiori che mostrano il coinvolgimento di H_2S nel metabolismo dell'omocisteina e nella sintesi di glutatione. Si è visto infatti che la somministrazione di NaHS e donatori di H_2S , protegge le cellule dallo stress ossidativo indotto dall'iperomocisteinemia [7c] aumentando la concentrazione intracellulare di glutatione [8c].

L'omocisteina (Hcy) è un aminoacido tiolico, intermedio del metabolismo della metionina; quest'ultima è un aminoacido solforato assunto con la dieta, in quanto presente in alimenti proteici (latticini, carne, legumi, uova).

L'omocisteina si trova nel plasma di tutti i mammiferi dove circola principalmente sotto forma di complesso di disolfuro e albumina.

Il metabolismo della metionina può seguire due vie: la via della rimetilazione e la via della transulfurazione; entrambe vitamina B dipendenti.

L'unica risorsa di omocisteina negli umani deriva dalla demetilazione dell'amminoacido essenziale metionina (Met), che comporta il passaggio attraverso due composti intermedi: la S-Adenosilmetionina (AdoMet) e la S-Adenosilomocisteina (AdoHcy) [17]. (Fig.3)

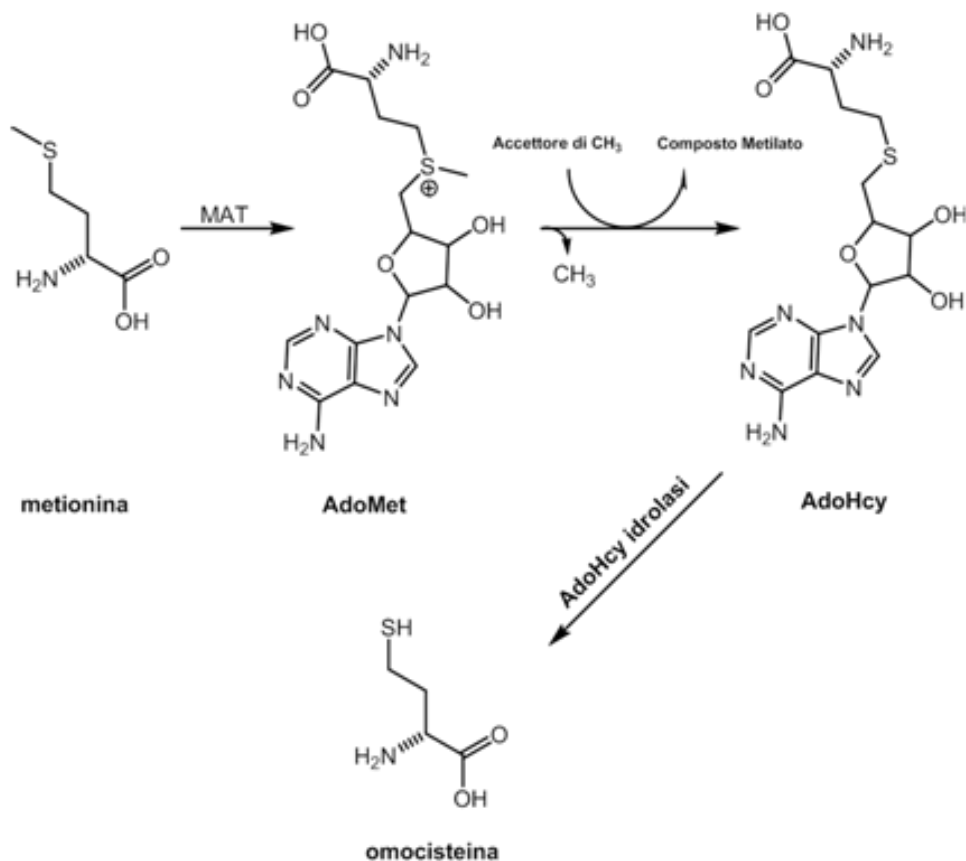


Figura 3. Biosintesi dell'omocisteina:

La sintesi di AdoMet, catalizzata da MAT (ATP-L-Metionina S-Adenosiltransferasi), avviene grazie al trasferimento della porzione adenosilica dell'ATP su Met; l'AdoMet è un composto ad alta energia in quanto il legame sulfureo tra il carbonio 5' del ribosio e il gruppo sulfureo dell'amminoacido ha un'energia paragonabile a quella del legame pirofosforico dell'ATP. La conversione di AdoMet in AdoHcy avviene tramite il trasferimento del gruppo metile da AdoMet ad un altro composto (accettore di gruppi metile), che viene così metilato. AdoHcy viene poi convertita in omocisteina dall'AdoHcy idrolasi (AHCY), enzima ampiamente diffuso nei tessuti dei mammiferi. In vivo, in condizioni fisiologiche, sia l'omocisteina sia l'adenosina vengono normalmente rimosse affinché AdoHcy idrolasi sia diretta verso la degradazione di AdoHcy.

Come si può vedere in figura 4, Hcy può essere ulteriormente metabolizzata attraverso due vie: può essere irreversibilmente degradata tramite la via della transulfurazione, oppure rimetilata a metionina attraverso la via della rimetilazione. La transulfurazione è la via principale del metabolismo della metionina, avviene soprattutto nel fegato e nei reni e determina la conversione del solfuro in cisteina (Cys). Se, alternativamente, l'omocisteina non segue la via della transulfurazione, viene rimetilata a metionina dal 5-metiltetraidrofolato (5-MetilTHF) (rimetilazione folato dipendente), oppure dalla betaina (rimetilazione folato indipendente). Varie vitamine B sono cofattori nel metabolismo dell'omocisteina [17,19,20].

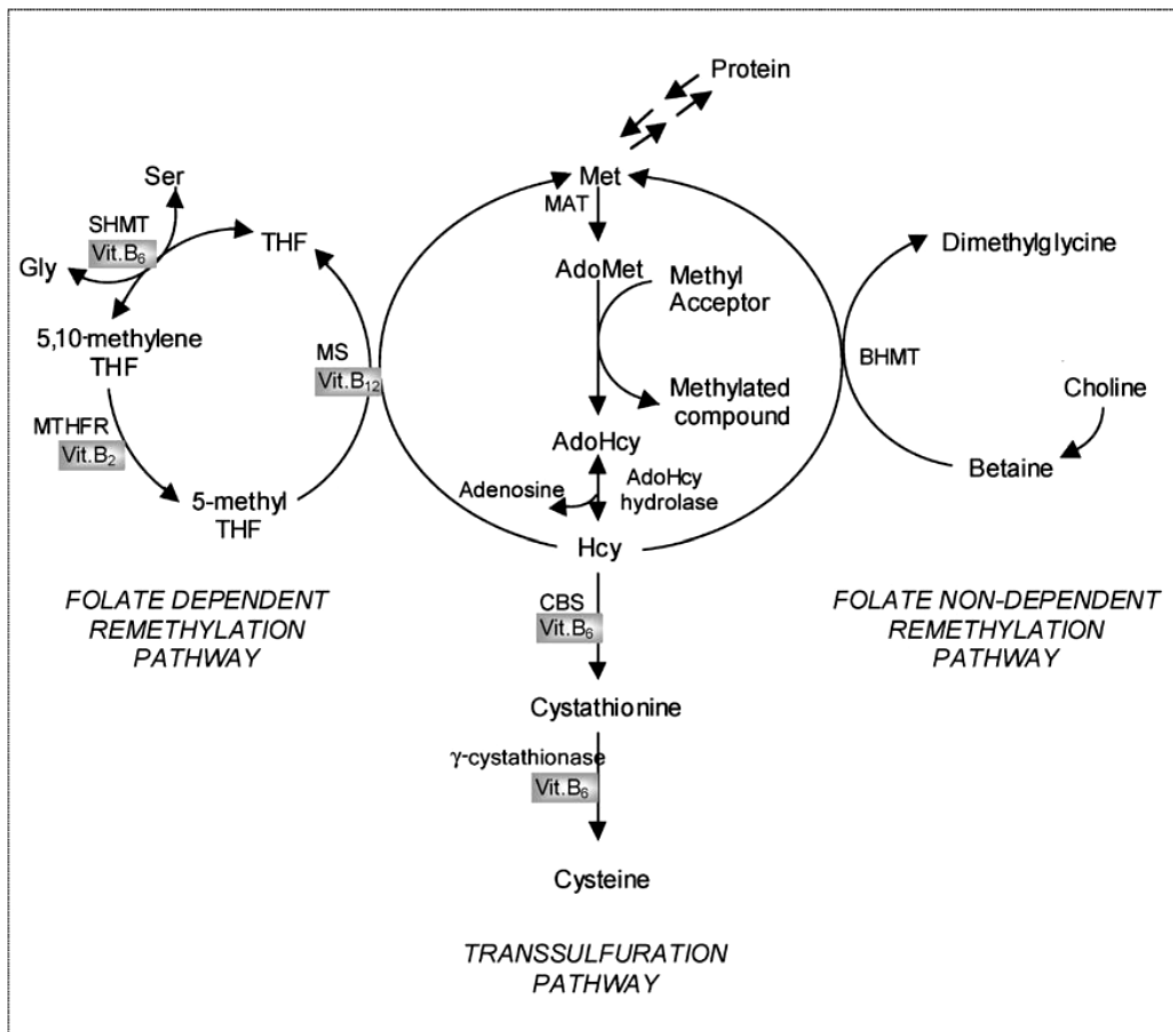


Figura 4. Metabolismo della metionina:

Via della transulfurazione: La fase iniziale è costituita da una condensazione dell'omocisteina con un amminoacido serina per la formazione della cistationina; questa reazione è catalizzata dalla cistationina β-sintasi (CBS) che necessita di piridossalfosfato (PLP) come cofattore. Successivamente la cistationina si separa in cisteina e γ-ossobutirato, tramite un altro enzima PLP dipendente: la γ-cistationasi. La successiva ossidazione del gruppo tiolico della cisteina in solfato avviene attraverso una serie di reazioni enzimatiche che ne permettono l'escrezione come solfato inorganico attraverso le urine.

Rimetilazione folato dipendente: l'enzima metionina sintasi (MS) in presenza della metilcobalamina (vitamina B₁₂) catalizzano il trasferimento del metile da 5-MetilTHF a Hcy, con formazione di metionina e tetraidrofolato (THF). Questa reazione avviene in tutte le cellule dell'organismo ad eccezione dei globuli rossi e comporta la formazione intermedia di un legame enzimatico con la metilcobalamina (MetilCbl). Il metabolismo dell'omocisteina è strettamente collegato al ciclo dei folati, MS è l'unico enzima in grado di convertire la forma di folato circolante (5-MetilTHF) in THF, il quale rappresenta il substrato di molte reazioni cellulari.

Il THF è convertito poi in 5,10-metilentetraidrofolato dall'enzima serina idrossimetiltransferasi (SHMT), e a sua volta è trasformato in 5-MetilTHF, per azione dell'enzima 5,10-metilentetraidrofolato reductasi (MTHFR), rendendolo così nuovamente disponibile per la rimetilazione di Hcy.

Poiché la forma circolante di folato è il 5-MetilTHF monogluttammato e poiché la reazione catalizzata da MTHFR non è reversibile, i folati che entrano nelle cellule devono obbligatoriamente passare attraverso le reazioni della MS allo scopo di generare THF ed altri folati ridotti. Le reazioni di MS sono MetilCbl dipendenti quindi la carenza di cobalamina può interferire con il ciclo intracellulare dei folati e portare all'accumulo di 5-MetilTHF e all'esaurimento degli altri derivati dei folati.

Rimetilazione betaina-dipendente: si ha la riconversione dell'omocisteina in metionina tramite l'azione dell'enzima betainaomocisteina metiltransferasi (BHMT) che usa la betaina (trimetilglicina), intermedio dell'ossidazione della colina, come donatore di gruppi metile. L'enzima BHMT è espresso in concentrazioni maggiori nel fegato e nei reni.

Iperomocisteinemia

Livelli marcatamente elevati di omocisteina nel plasma umano e nelle urine sono stati descritti come conseguenza di errori congeniti riguardanti il metabolismo dell'omocisteina, condizione denominata omocisteinuria (Hcy totale >50 mM). [78,79] Un moderato aumento della concentrazione di omocisteina (iperomocisteinemia) è stato invece più recentemente associato a patologie coronariche, cerebrali e del sistema cardiovascolare periferico [80]. Secondo studi recenti, sembra che il meccanismo molecolare del danno indotto dall'omocisteina [81-87] sia collegato all'autossidazione dell'omocisteina stessa che porta alla formazione di specie reattive all'ossigeno, come l'anione superossido e l'acqua ossigenata [88].

I livelli di omocisteina circolante possono essere elevati per diverse ragioni; tra queste possiamo includere una ridotta funzionalità di CBS, ma anche i ridotti livelli di nutrienti come il folato, la cobalamina e la vitamina B6.

Numerosi studi epidemiologici hanno stabilito che una lieve iperomocisteinemia rappresenta un fattore di rischio indipendente per le patologie cardiovascolari, cerebrovascolari e neurodegenerative (Morbo di Alzheimer) [89]. È interessante notare infatti che nel cervello di pazienti affetti dal Morbo di Alzheimer sono stati riscontrati elevati livelli di omocisteina e ridotti livelli di H₂S. [58]

Sebbene la terapia combinata acido folico e vitamina B sia in grado di ridurre i livelli di omocisteina, i risultati ottenuti da differenti trials clinici non hanno soddisfatto le aspettative [90,91].

È necessario considerare quindi degli approcci alternativi. Alla base delle nuove strategie terapeutiche c'è l'idea di aumentare l'assorbimento epatico o renale di omocisteina o di facilitarne l'escrezione utilizzando agenti in grado di liberare l'omocisteina legata alle proteine tramite ponti disolfuro. La riduzione di questi ultimi a tioli liberi dovrebbe facilitare l'ingresso dell'omocisteina all'interno delle cellule dove può essere trasformata in cisteina attraverso la via della transulfurazione. La cisteina viene poi trasformata in glutathione o, in alternativa, degradata a taurina e solfato. [92]

Studi molto recenti hanno dimostrato che H₂S protegge i neuroni dal danno indotto dall'omocisteina, attribuendo ai donatori di H₂S un promettente ruolo terapeutico per il trattamento del Morbo di Alzheimer. [93].

Negli ultimi anni sono stati pubblicati molti studi riguardanti molecole con l'abilità di ridurre l'omocisteina circolante, in particolare la N-acetilcisteina (NAC) e il 2-mercaptoetansolfonato sodico (Mesna).

La NAC è un tiolo ampiamente utilizzato come agente mucolitico, inoltre si è visto che, in pazienti con funzionalità renale normale, riduce l'Hcy plasmatica e ne aumenta la sua escrezione urinaria. [94]

Il Mesna è invece un tiolo analogo della taurina, indicato per la prevenzione di cistite emorragica durante la chemioterapia e che riduce velocemente i livelli di Hcy plasmatica.

Sebbene i risultati di questi studi dimostrino chiaramente che alcuni composti tiolici sono in grado di ridurre l'omocisteinemia, alcuni aspetti necessitano una chiarificazione. Sussistono infatti incertezze per quanto riguarda l'efficacia del trattamento a lungo termine; si è visto che anche se la NAC o il Mesna provocano un rapido calo di omocisteina plasmatica, i suoi livelli dopo 4 settimane di trattamento non sono significativamente differenti da quanto misurato in precedenza [95]. Ciò può essere conseguenza del trattamento stesso che, come reazione, determina un aumento del flusso di omocisteina dalle cellule; in più bisogna considerare che sono necessari alti dosaggi di farmaco (2,4 g/day di NAC) e che i trattamenti durano per mesi, con una conseguente progressiva riduzione della "compliance" del paziente.

1.2. Modulazione dei livelli di H₂S a scopo terapeutico

I dati che emergono sugli effetti biologici di H₂S supportano due approcci base per lo sviluppo di nuove terapie: inibitori di CSE o CBS, che portano alla soppressione della formazione di H₂S endogena, e la somministrazione di H₂S come gas o di composti rilascianti H₂S.

L'inibitore della serie meno potente *in vitro* (PAG) è il neuroprotettore più efficace *in vivo*, e l'inibitore più potente testato (acido amminoossiacetico) determina qualche protezione contro lo stroke a basse dosi, mentre incrementa la patologia a dosi più alte [54]. Tentando di ottimizzare e quindi sviluppare questi composti è importante ricordare che CSE e CBS hanno ruoli importanti nel metabolismo della cisteina. La deficienza genetica di CBS è risaputa condurre a omocisteinemia, una condizione associata a elevati livelli sierici di omocisteina e omocistina, che portano a disfunzione endoteliale e ad ipertensione [19]. Animali geneticamente modificati, con deficienza di CBS, hanno riportato danni nella funzione vascolare, e mostrano un'errata regolazione dei geni implicati nel metabolismo epatico dei lipidi [96].

Un'ulteriore area di potenziale sviluppo riguarda la somministrazioni di H₂S per inalazione o per via parenterale, così come lo sviluppo di farmaci modificati che contengano un gruppo che rilasci H₂S. Un esempio parallelo è l'inalazione di NO, anch'esso noto come gas tossico, il cui utilizzo è stato attualmente approvato per l'ipertensione polmonare infantile.

Naturalmente, lo sviluppo di farmaci rilascianti H₂S richiede una comprensione particolareggiata del profilo tossicologico, così come la loro farmacocinetica, la distribuzione e il metabolismo.

1.2.1. Molecole donatrici di H₂S

Il donatore di H₂S attualmente più utilizzato negli studi farmacologici è **NaHS**, tuttavia questo sale ha il grosso limite di rilasciare rapidamente H₂S in funzione del pH del mezzo in cui si trova, mentre sarebbe più utile poter disporre di un donatore lento in grado di mimare il rilascio fisiologico di questo gas.

L'attenzione si è rivolta quindi a composti organici di origine naturale, come i **polisolfuri** presenti nell'aglio, che si sono dimostrati in grado di reagire con il glutatione cellulare e produrre il rilascio di H₂S nei tessuti [97]. Alla presenza di

questi prodotti sembra essere legata la ben nota attività vasodilatatoria, cardioprotettiva ed epatoprotettiva dell'aglio e dei suoi estratti[98,99]. La struttura di questi composti polisolforati (fig. 5) potrebbe quindi anche servire come modello per la progettazione e lo sviluppo di nuovi codrugs donatori di H₂S.

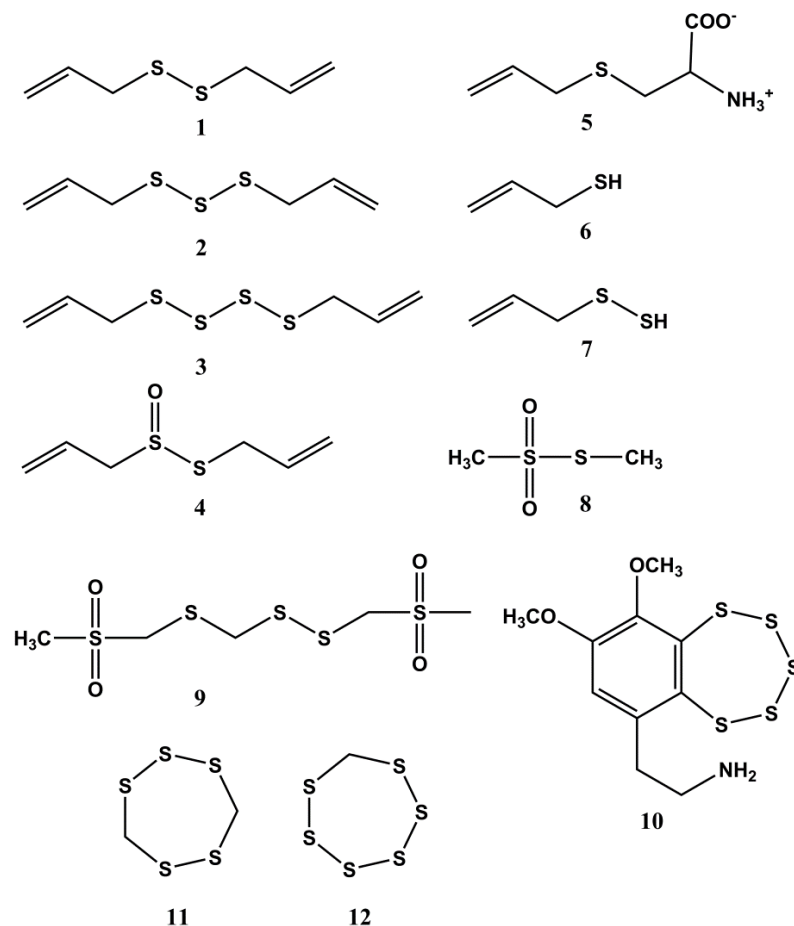


Figura 5. Molecole polisolforate di origine naturale associate alla formazione di idrogeno solforato. DADS (1), DATS (2), DATTS (3), allicina (4), S-allilcisteina (5), allil mercaptano (6), allil pertiolo (7), metantiosolfonato (8), disossisolfone (9) varacina (10), lentionina (11), 1,2,3,4,5,6-esatieptano (12). [100]

Un'altra classe di donatori di H₂S è rappresentata dai **ditiolioni**, di cui sono note le proprietà chemioprotettive verosimilmente legate alla capacità di aumentare i livelli epatici di GSH.

I composti denominati 3*H*-1,2-ditiol-3-tioni (figura 6) costituiscono una classe di composti solforati ciclici fondamentalmente sintetici, con caratteristiche pseudo aromatiche [101-103].

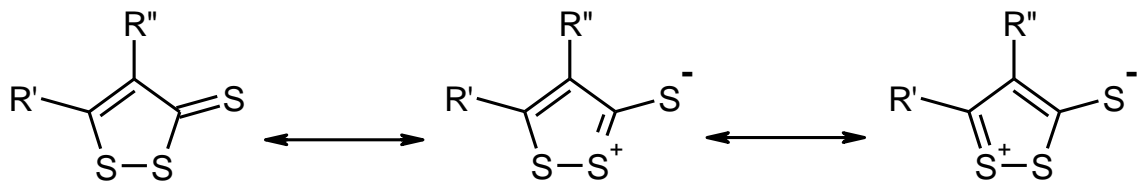
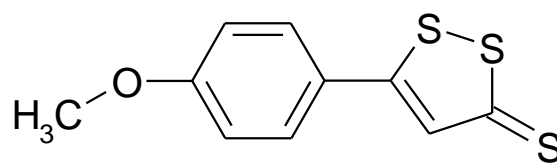


Figura 6. Ditioltioni

Numerosi derivati arilditioltionici sono stati oggetto di ricerche per individuarne le attività biologiche, e il 5-(4-metossifenil)-1,2-ditiol-3-tione (noto anche come anetolditioltione; ADT) è stato particolarmente studiato ed ha trovato applicazioni terapeutiche come coleretico e scialagogo.

L'ADT (fig.7) presenta bassa tossicità; le cavie tollerano dosi di 2-4 g per Kg di peso corporeo. Nell'uomo dosi superiori a 150 mg possono provocare leggeri disturbi digestivi, ma in genere sono ben tollerate anche dosi più alte.



ADT

Figura 7. ADT

Da tempo i ditioltioni e particolarmente l'ADT sono d'interesse come potenti chemioprotettori contro diversi modelli animali di cancro [104, 105], p.es. il tumore epatico indotto da CCl_4 e dal paracetamolo. In questo ambito ADT è risultato superiore alla N-acetilcisteina comunemente usata.

L'azione chemioprotettiva è verosimilmente legata alla capacità dell'ADT e dei composti similari di aumentare i livelli epatici di glutatione e le attività degli enzimi glutatione-reduttasi, glutatione-S-transferasi e NADPH-chinone reduttasi [106-108].

E' peraltro noto che l'ADT è capace di inibire NF-kB responsabile della resistenza cellulare all'apoptosi [109].

Si ricorda ancora che l'ADT protegge contro la perossidazione dei lipidi e il danneggiamento del DNA, riducendo l'interazione dei radicali liberi con queste

molecole. In particolare l'ADT funge da "radical scavenger" contro i radicali non ossigenati ($R\cdot$) precursori di $RO_2\cdot$.

L'attività chemioprotettiva dell'ADT è anche associata alla sua capacità di inibire la topoisomerasi II, un enzima coinvolto nella replicazione del DNA, presente in gran parte solo nelle cellule eucariote in proliferazione, necessario per evitare gravi problemi di avvolgimento ed aggrovigliamento durante la replicazione [110].

Recenti studi hanno evidenziato la liberazione di piccole quantità di idrogeno solforato *in vitro* (dopo incubazione in omogenato di fegato di ratto) ed *in vivo* (in modelli murini) da parte del 5-(4-idrossifenil)-1,2-ditiol-3-tione (ADTOH o ACS1) (fig.6), il principale metabolita dell'ADT e da suoi derivati [96,111] (fig.3).

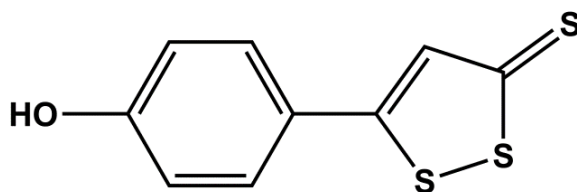


Figura 8. ADTOH (ACS1).

1.2.2. Potenziale terapeutico di composti ibridi rilascianti H_2S

Il concetto di ibridi in chimica farmaceutica non è nuovo ed è stato applicato in molte aree terapeutiche. Questo approccio si basa sull'idea di combinare due farmacofori di due sostanze bioattive allo scopo di creare un nuovo composto con migliorate proprietà biologiche.

L'utilizzazione di donatori di H_2S a lento rilascio come ADTOH per la preparazione di ibridi di farmaci ha aperto prospettive molto promettenti ed ha permesso di ottenere risultati molto interessanti in vari settori terapeutici [31,112,113,117]. Tali ibridi infatti, sono in grado di mantenere le proprietà farmacologiche del farmaco di

partenza, ma al contempo sono risultati in grado di contrastare i fenomeni legati allo squilibrio redox della cellula, migliorando quindi l'efficacia e/o la tollerabilità. A titolo di esempio citiamo tra gli altri, l'ibrido del diclofenac (ACS15)[112] per il trattamento di patologie infiammatorie e l'ibrido dell'aspirina (ACS14)[114] per patologie cardiovascolari (fig.9).

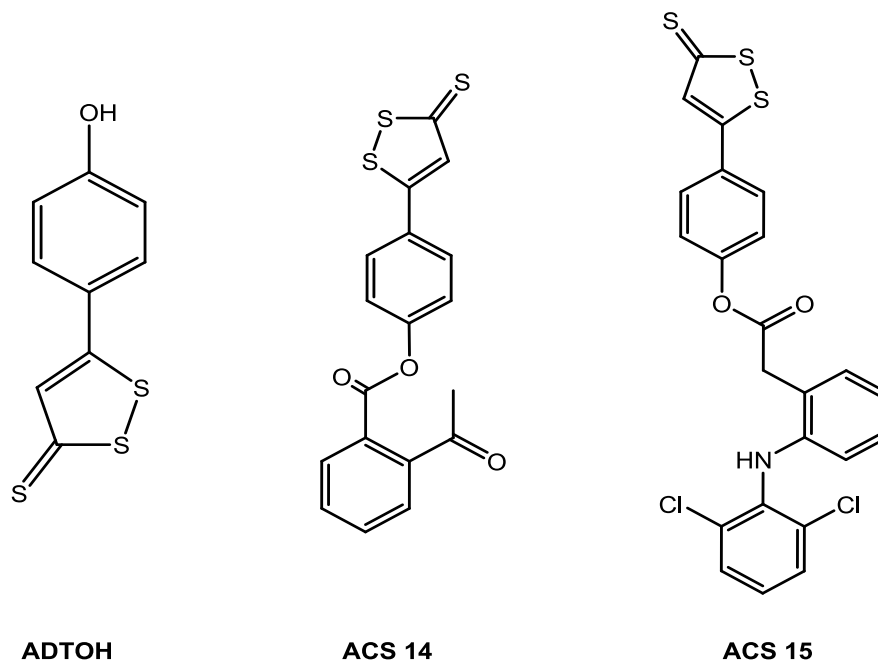


Figura 9. Composti ditioltionici.

Tali composti, dopo somministrazione orale nel ratto, si sono dimostrati in grado di mantenere l'attività trombossano-soppressiva del "parent compound", ma senza i suoi effetti gastrolesivi. Essi, inoltre, influiscono positivamente sugli squilibri ossido-riduttivi, aumentando i livelli plasmatici di H₂S e la produzione di GSH e cisteina intracellulare.

La superiore attività protettiva, rispetto ai parent compounds, mostrata in un modello in vitro di neuroinfiammazione, rende questi composti dei potenziali candidati per il trattamento di disordini neurodegenerativi aventi una componente neuroinfiammatoria prominente, quali la malattia di Alzheimer e il morbo di Parkinson [115].

Recentemente è stato riportato che la somministrazione nel ratto di ADTOH, o di ACS14 influenza profondamente il bilancio tiolo/disolfuro nel plasma [116] e porta ad un abbassamento dei livelli di omocisteina sia nel plasma sia in molti tessuti analizzati.

1.3 Scopo della tesi

Come citato nel paragrafo precedente, un approccio interessante e sicuramente innovativo è la sintesi di molecole ibride che uniscano alla struttura di un farmaco noto una porzione solforata in grado di rilasciare lentamente H₂S *in vivo*. Si è quindi ritenuto interessante estendere tale approccio alla sintesi di ibridi di farmaci attivi in patologie neurodegenerative e in patologie del sistema cardiovascolare e metabolico.

In particolare sono stati realizzati:

- derivati solforati della L-Dopa, potenzialmente utili nel morbo di Parkinson,
- derivati solforati di inibitori della fosfodiesterasi 5 (PDE5), potenzialmente utili, oltre che per il trattamento delle disfunzioni erettile, anche nell'ipertensione polmonare e nella malattia di Alzheimer [118]
- derivati cisteinici donatori di H₂S, potenzialmente utili nel trattamento di particolari condizioni metaboliche come l'iperomocisteinemia, come pure nella protezione epatica e renale da agenti tossici.

A tale scopo è stato innanzitutto necessario individuare e sintetizzare quelle strutture solforate in grado di rilasciare, per via metabolica e in modo controllato, H₂S ed eventualmente funzionalizzarle opportunamente per permettere la formazione di un legame estereo o ammidico con la porzione del farmaco noto.

Come già detto, il 4-idrossifenilditioltione (ADTOH, anche codificato come ACS1), facente parte della classe dei ditioltioni, è risultato in grado di liberare *in vivo* H₂S ed è quindi stato utilizzato anche in questo progetto per la preparazione di un estere del tadalafil (ACS76).

In analogia, si è pensato di sintetizzare altre molecole ditioltioniche aventi però un gruppo carbossilico, necessario per la realizzazione di un legame idrolizzabile con il gruppo amminico o ossidrilico dei farmaci prescelti.

Pertanto sono stati sintetizzati i composti ASC5, ACS48 e ACS50 (fig.10).

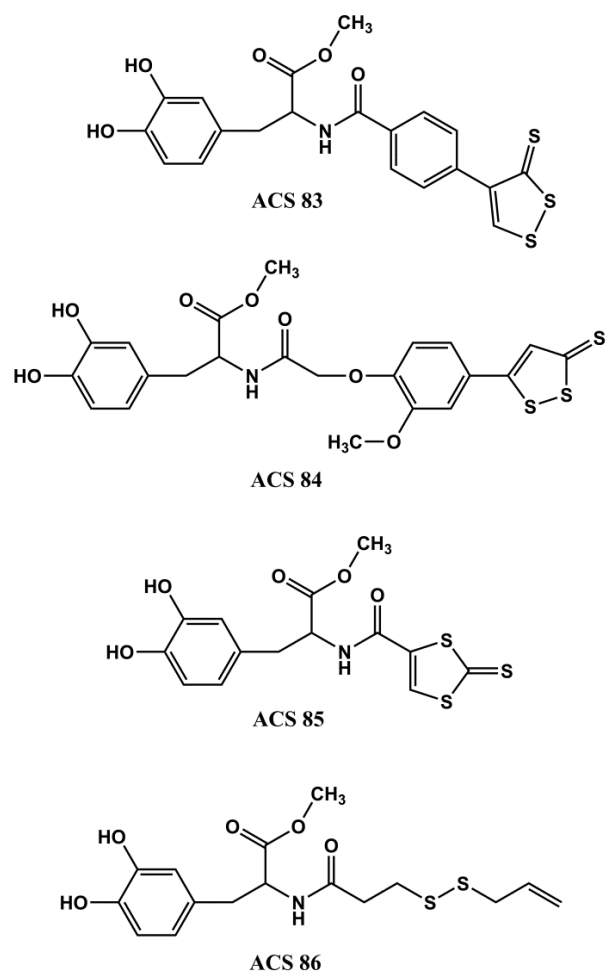


Figura 12. Derivati ibridi di L-DOPA.

1.3.2 Nuovi composti ibridi PDE5 inibitori rilascianti H₂S

Il concetto di “H₂S releasing hybrids” è applicabile anche nel campo urologico con possibili indicazioni cliniche nella disfunzione erettile (ED), nell'ipertrofia prostatica e nelle disfunzioni del basso tratto urinario. Il razionale si basa sul ruolo giocato dalla NADPH ossidasi (NOX) durante l'attivazione delle PDE5.

L'erezione penile è mediata dall'ossido nitrico, che attiva la guanilato-ciclastasi che converte la guanosina trifosfato in cGMP; quest'ultimo fornisce il segnale per il rilasciamento dei muscoli lisci vasali e trabecolari dei corpi cavernosi con conseguente aumento dell'efflusso di sangue negli spazi lacunari [117].

Nelle disfunzioni erettile può incontrarsi sia aumento dell'attività fosfodiesterasi (enzima che degrada il cGMP) a livello dei corpi cavernosi, sia diminuzione della liberazione di ossido nitrico da parte degli endoteli.

In alcune condizioni di squilibrio ossido riduttivo (diabete, fumo) l'anione superossido rilasciato da NOX può interagire con NO e, attraverso la formazione di perossinitrito, avere effetti negativi sul rilassamento delle cellule muscolari lisce mediato da cGMP e sulla proliferazione cellulare indotta dagli inibitori delle PDE5 nel corpo cavernoso e della prostata. Quindi la performance dei convenzionali PDE5 inibitori come il sildenafil può risultare compromessa [122].

PDE5 inibitori che rilasciano H₂S potrebbero quindi essere in grado di inibire sia le PDE5 sia l'espressione e l'attività della NOX e possono rappresentare un valido approccio nel trattamento dei pazienti affetti da disfunzione erettile, iperplasia prostatica benigna, e disfunzioni del basso tratto urinario.

In questi ultimi anni, una maggiore comprensione dei meccanismi regolati da cGMP ha dato via a numerosi tentativi di determinare gli effetti e i potenziali benefici di questa classe di composti in patologie non urologiche. L'inibizione delle PDE5 ha mostrato benefici collaterali per molti fattori di rischio o malattie associate, o che accompagnano, la ED. È stato dimostrato che l'inibizione delle PDE5 è efficace nel trattamento dell'ipertensione arteriosa polmonare idiopatica per cui sia il sildenafil che il tadalafil sono stati approvati per questa applicazione [123]. Ci sono recenti evidenze che dimostrano che processi infiammatori sono coinvolti nella generazione delle modificazioni vascolari che conducono all'ipertensione polmonare, per cui l'utilizzo di agenti antiinfiammatori sembra essere un approccio promettente. Quindi la realizzazione di derivati di PDE-5

inibitori, in grado di rilasciare in vivo H_2S , potrebbe portare all'ottenimento di molecole dotate di migliore efficacia.

Infatti, un derivato ibrido del sildenafil in grado di rilasciare H_2S , ACS6 (fig.14), sintetizzato durante la mia tesi di laurea[124], ha mostrato accanto alla capacità di aumentare i livelli di cGMP e cAMP nella prostata, nella vescica e nel corpo cavernoso e alla capacità di inibire la proliferazione delle cellule prostatiche più efficacemente del sildenafil, la capacità di inibire la formazione di anione superossido e l'espressione di NADPH ossidasi in cellule endoteliali dell'arteria polmonare porcina (PAEC).[31,125]. Questi risultati rendono ACS6 un candidato potenzialmente efficace anche nel trattamento di patologie tipo ARDS (acute respiratory distress syndrome).

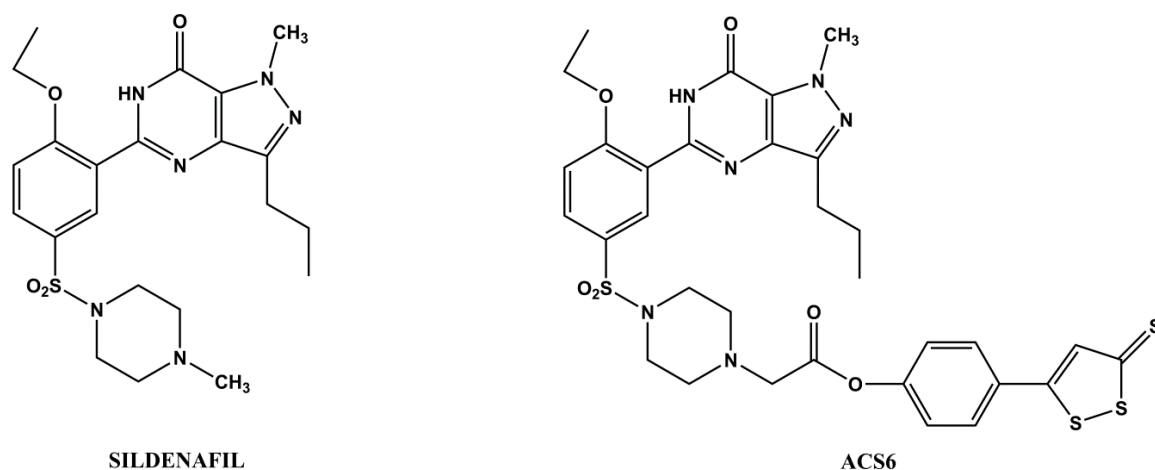


Figura 13. Sildenafil e ACS6.

E' interessante notare che ACS6 conserva inalterata la capacità di inibire le PDE5 rispetto al "parent compound", nonostante sia strutturalmente e chimicamente modificato.

ACS6 non solo è in grado di promuovere l'erezione, ma possiede anche effetti benefici a lungo termine attraverso la downregulation di PDE5 e l'inibizione dello stress ossidativo, fenomeno legato all'aumento dei livelli di GSH osservati nei tessuti interessati [125].

Da recenti dati di letteratura [123], sembra che il potenziale terapeutico dei PDE-5 inibitori sia ancora in espansione e si estenda al sistema cardiovascolare, nervoso e cutaneo e che l'utilizzo di questa classe di composti possa avere un ruolo benefico in molte condizioni come l'insufficienza cardiaca, l'ipertensione, l'infarto e

il fenomeno di Raynaud [123]. Recentemente, è stato anche suggerito che la somministrazione di PDE-5 inibitori possa inibire e prevenire i maggiori processi patogenetici che conducono allo sviluppo della malattia di Alzheimer, giocando un ruolo potenziale come “disease modifying agents” [118].

Con queste premesse e sulla base degli interessanti risultati già ottenuti con ACS6, l'ibrido derivato dal sildenafil e da ADTOH, si è ritenuto interessante estendere l'approccio utilizzato anche ad altri inibitori di PDE5, quali il tadalafil ed il vardenafil (fig.15), come pure realizzare nuovi ibridi del sildenafil, aventi porzioni solforate differenti, che potrebbero quindi modificare la farmacocinetica della molecola finale, come pure la cinetica di rilascio di H₂S.

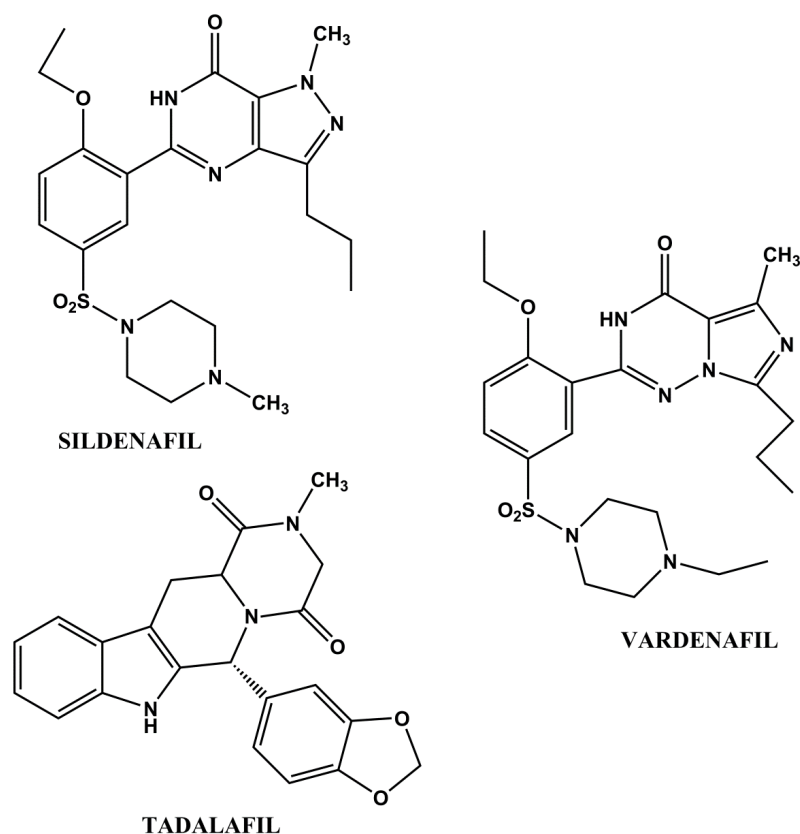


Figura 14. PDE5 inibitori.

Per la realizzazione degli ibridi, le strutture dei farmaci di partenza sono state opportunamente modificate, per permettere la formazione di un legame estereo con la porzione solforata, donatrice di H₂S utilizzata (ADTOH, ACS26, ACS48, ACS50). I nuovi composti ibridi sintetizzati sono rappresentati in figura 16.

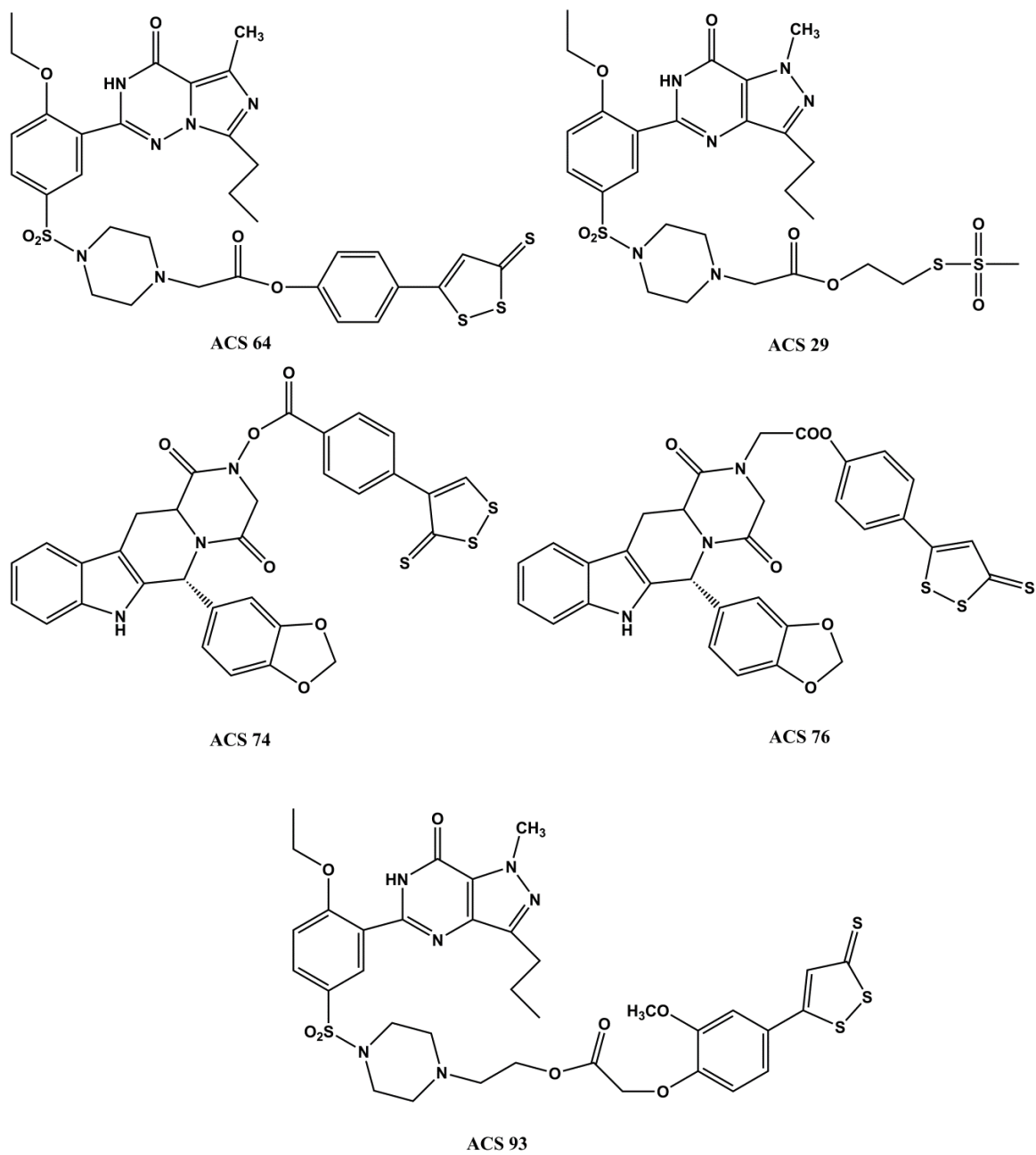


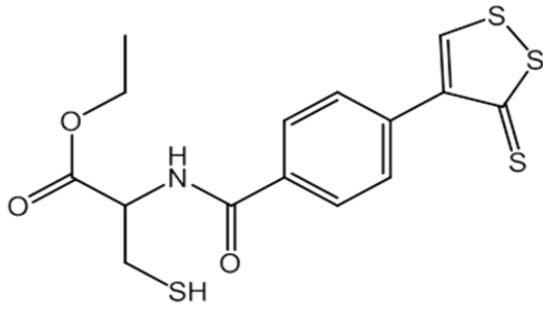
Figura 15. Nuovi ibridi PDE5 inibitori donatori di H₂S.

1.3.3. Nuovi derivati cisteinici donatori di H₂S come potenziale trattamento dell'iperomocisteinemia

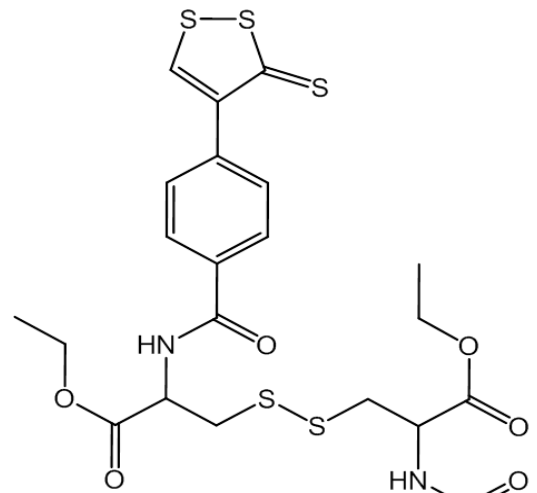
Come si è detto, studi epidemiologici hanno stabilito che una moderata iperomocisteinemia è un fattore di rischio per malattie cardiovascolari e cerebrovascolari. Il mancato successo della terapia vitaminica da una parte e l'osservazione che molecole tioliche come la N-acetilcisteina (NAC) e il 2-mercaptoetansolfonato sodico (Mesna), come pure molecole ditioltoniche come ADTOH e ACS14 sono in grado di ridurre l'omocisteina circolante [116], ci hanno portato a progettare nuovi composti ibridi, costituiti da derivati della cisteina legati ad un gruppo ditioltonico (ACS 48), allo scopo di individuare nuovi farmaci potenzialmente efficaci nel trattamento dell'iperomocisteinemia, che agiscano tramite la modulazione del bilancio extracellulare tiolo/disolfuro. L'ipotesi alla base di questo lavoro è che le due componenti presenti in tali composti possano avere un effetto sinergico sulla riduzione dell'omocisteina plasmatica e nel correggere gli squilibri ossido-riduttivi presenti in diversi stati patologici, tramite l'aumento del glutathione tissutale. Nei composti realizzati, ACS 94, ACS 96 e ACS 97 (Fig. 17), il gruppo ditioltonico è legato al gruppo amminico della cisteina (o della cistina) attraverso un legame ammidico.

I composti sintetizzati sono strettamente correlati tra di loro. ACS 96 è il disolfuro di ACS 94, mentre ACS 97 è il corrispondente acido libero di ACS 96. Essi sono stati progettati in quanto potenziali metaboliti di ACS 94, ma anche perché certamente dotati di caratteristiche farmacocinetiche differenti da esso. Il disolfuro, più lipofilo, può essere ridotto a tiolo dalla reduttasi, formando *in vivo* ACS94, mentre la presenza del carbossile libero in ACS96 migliorerà la idrosolubilità del composto altrimenti molto scarsa.

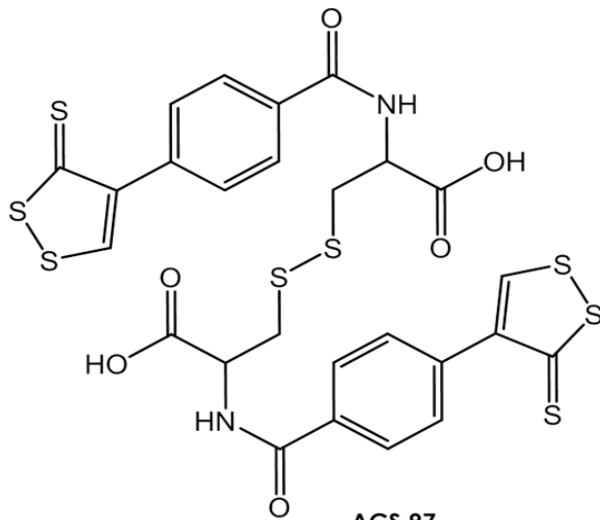
In questo modo, una volta appurata la eventuale capacità di ACS 94 di influire positivamente sull'equilibrio dei vari tioli biologici ed in particolare su glutathione e omocisteina, si potrà poi selezionare quello che dei tre composti ha il profilo farmacocinetico più utile in vista di un suo potenziale sviluppo come farmaco.



ACS 94



ACS 96



ACS 97

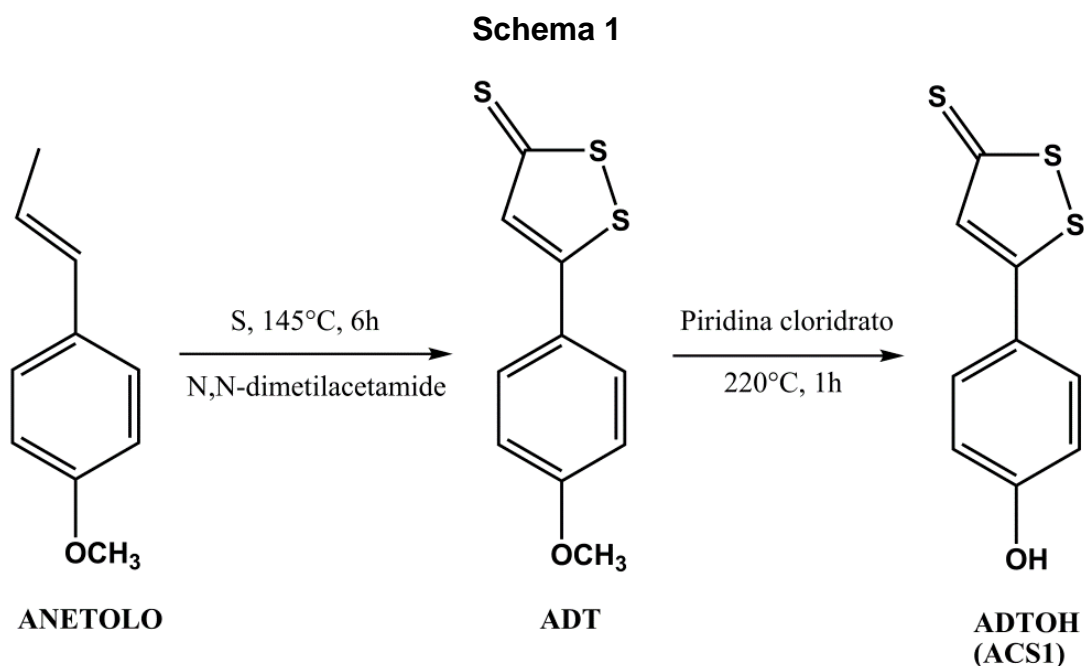
Figura 17. Derivati cisteinici donatori di H₂S.

2. CHIMICA

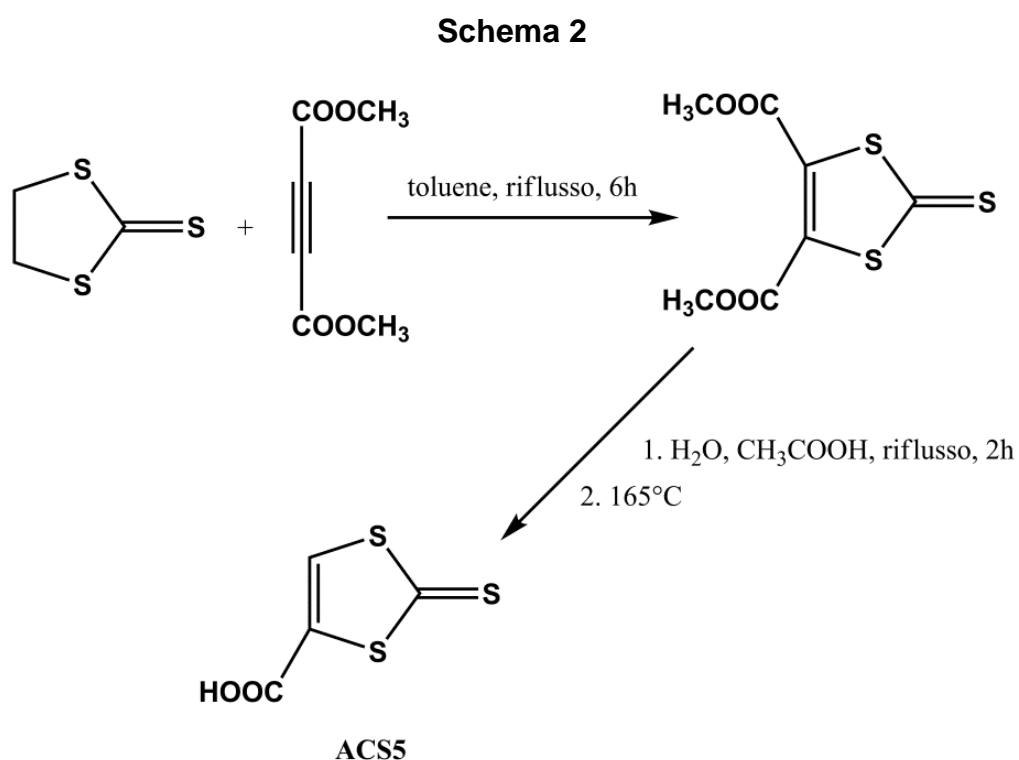
Intermedi solforati

Gli “H₂S-releasing hybrids” oggetto della presente tesi sono esteri o ammidi del 5-(4-idrossifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tione (ADTOH o ACS1), dell’acido 4-(3-tiosso-3H-[1,2]ditiol-4-il)benzoico (ADTCOOH o ACS48), dell’acido 2-(2-metossi-4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-5-il)fenossiacetico (ACS50), dell’acido 2-tiosso-3H-[1,3]ditiol-4-ilpropanoico (ACS5), dell’acido 3-(allildisulfanil)propanoico (ACS81) e dell’S-2-idrossimetilmetantiosolfonato (HEMTS o ASC26) che non essendo disponibili commercialmente sono stati sintetizzati in laboratorio seguendo, con alcune modifiche, metodi riportati precedentemente in letteratura.

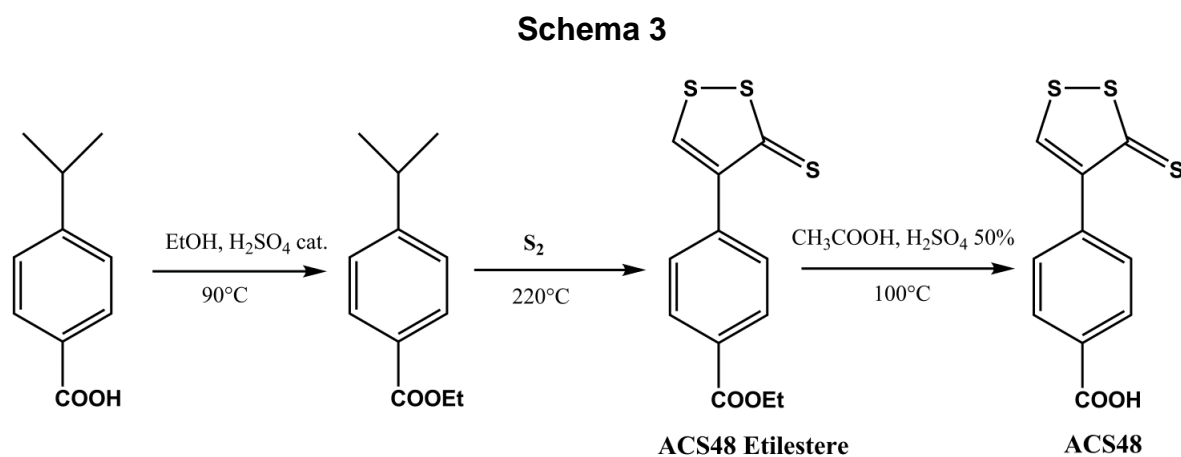
Il 5-(4-idrossifenil)-3H-1,2-ditiol-3-tione (ADTOH o ACS1) è stato preparato, con buona resa, per demetilazione dell’anetolo ditioltione (ADT) riscaldato a 220°C, per 20 minuti con piridina cloridrato [127]. L’ADT a sua volta era stato preparato, seguendo con alcune modifiche le indicazioni di [128], riscaldando l’anetolo e lo zolfo elementare in N,N-dimetilacetamide, a 145°C per 6 ore circa. (Schema1)



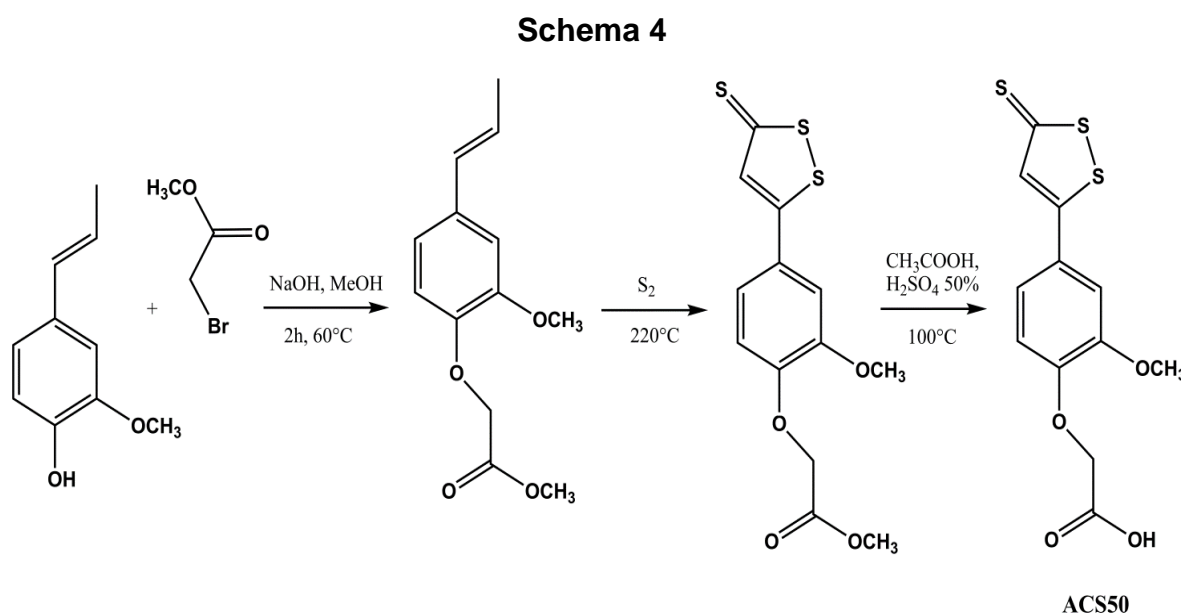
ACS5 è stato preparato a partire dall'estere dimetilico dell'acido 2-tiosso-1,3-ditiol-4,5-dicarbossilico per idrolisi delle funzioni esteree in ambiente acido e successiva mono-decarbossilazione a caldo seguendo le indicazioni di [129]. A sua volta l'estere era stato preparato seguendo le indicazioni di [130] mediante una reazione di Diels Alder tra l'etilene tritiocarbonato e il dimetil acetilenedicarbossilato (Schema 2).



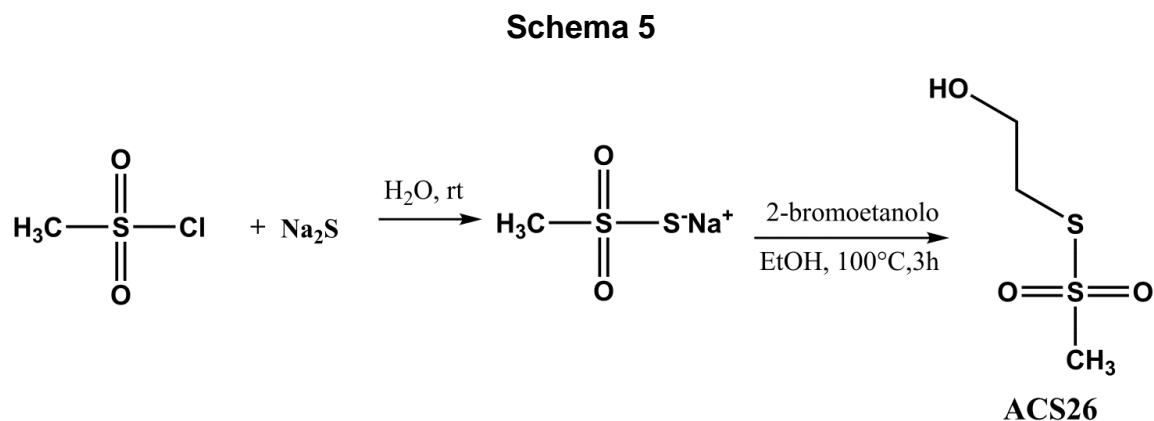
L'acido 4-(3-tiosso-3H-[1,2]ditiol-4-il)benzoico (ACS 48) è stato sintetizzato a partire dall'estere etilico dell'acido 4-isopropilbenzoico (ottenuto per esterificazione di Fischer dell'acido con etanolo), che è stato riscaldato con zolfo elementare a 220°C per 5 ore e 30 minuti [131]. Il 4-(3-tiosso-3H-[1,2]ditiol-4-il)-benzoato di etile (ACS 48 etilestere) così ottenuto è stato poi idrolizzato a 100°C con una miscela di acido acetico glaciale e acido solforico al 50% (Schema 3).



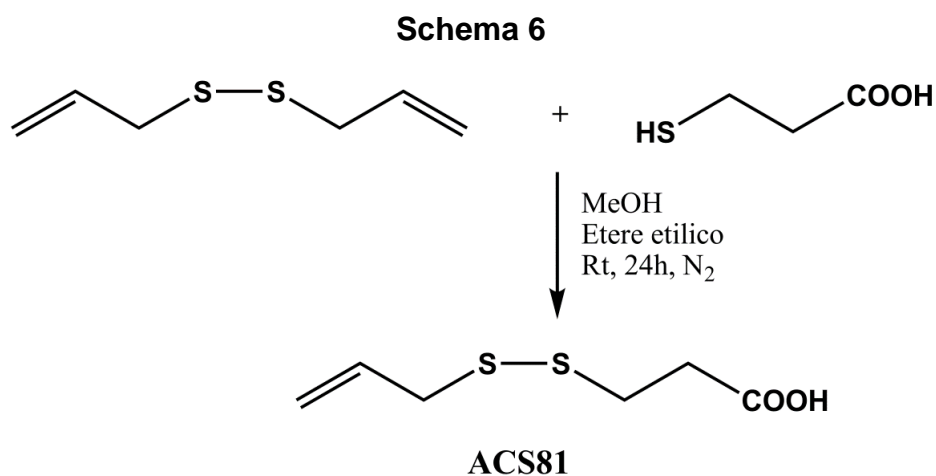
ACS50 è stato ottenuto per idrolisi acida del corrispondente metil estere, già noto, che è stato sintetizzato a partire da eugenolo e bromoacetato di metile, seguendo le indicazioni riportate in [132] (Schema 4).



L'S-2-idrossietil metantiosolfonato (ACS26) è stato ottenuto scaldando a riflusso per 3 ore il 2-bromoetano con il metantiosolfonato di sodio, a sua volta preparato trattando il cloruro di mesile con Na₂S a t.a. per 1 ora [133] (Schema 5).

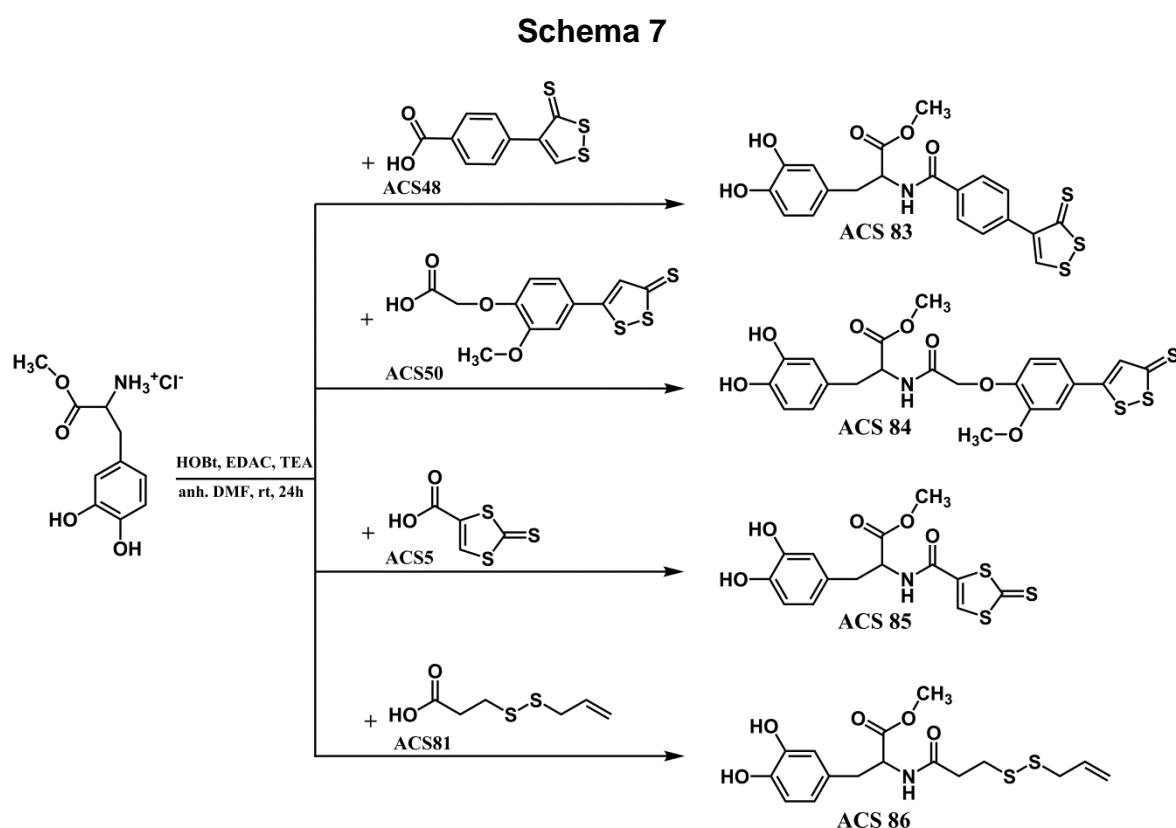


ACS81 è stato ottenuto per reazione tra l'allildisolfuro e l'acido 3-mercaptopropanoico in ambiente basico (Schema 6).



Derivati solforati della L-DOPA

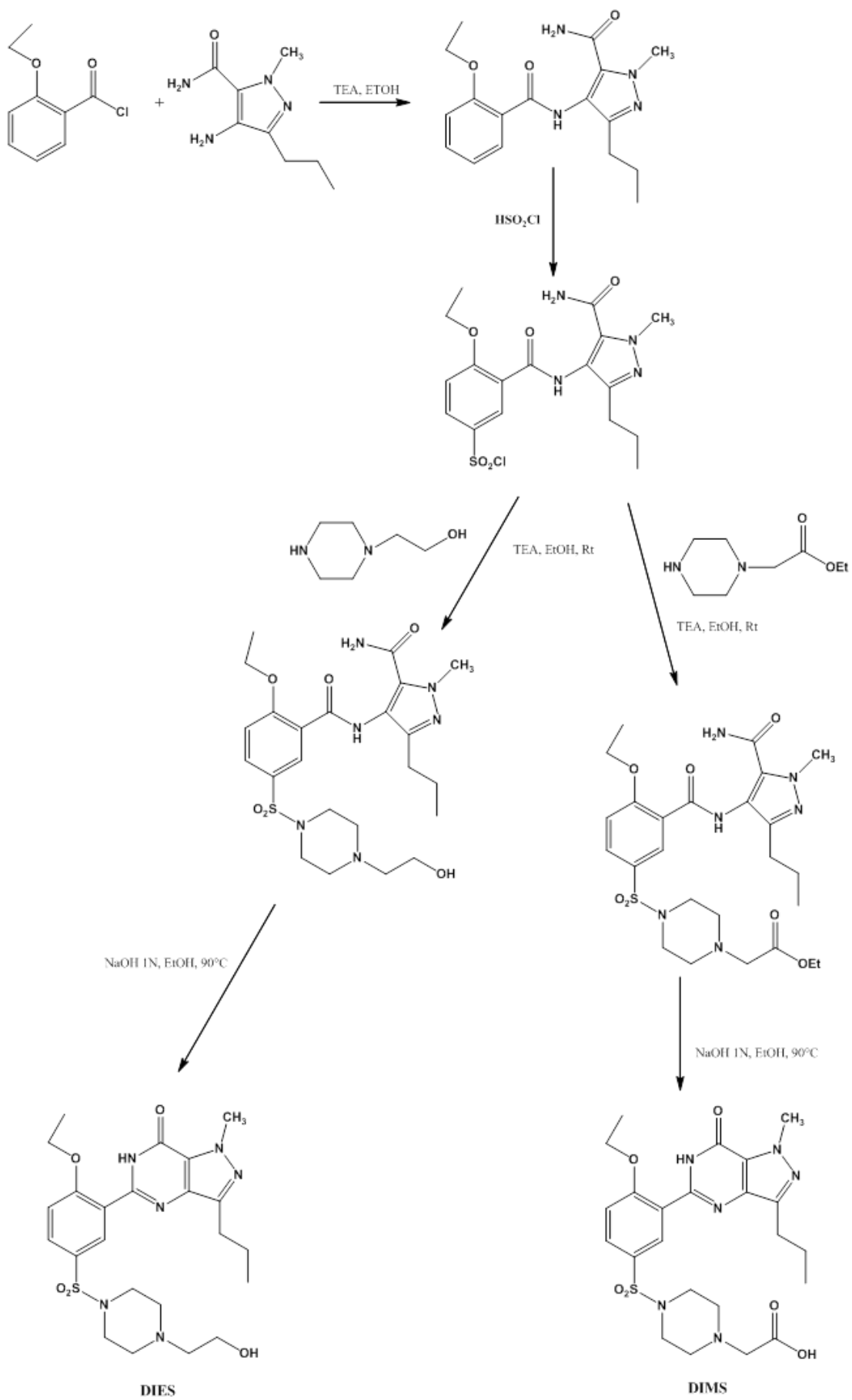
I derivati solforati dell' L-DOPA (ACS83, ACS84, ACS85, ACS86) sono stati realizzati attraverso la formazione del legame ammidico tra L-DOPA metilestere cloridrato, preparato da L-DOPA per reazione con cloruro di tionile e metanolo, e ACS48, ACS50, ACS5 e ACS81 rispettivamente, in presenza di agenti accoppianti quali EDAC, HOBT e trietilammina (TEA) in N,N'-dimetilformamide anidra (DMF) (Schema 7).



Derivati solforati di inibitori della PDE-5

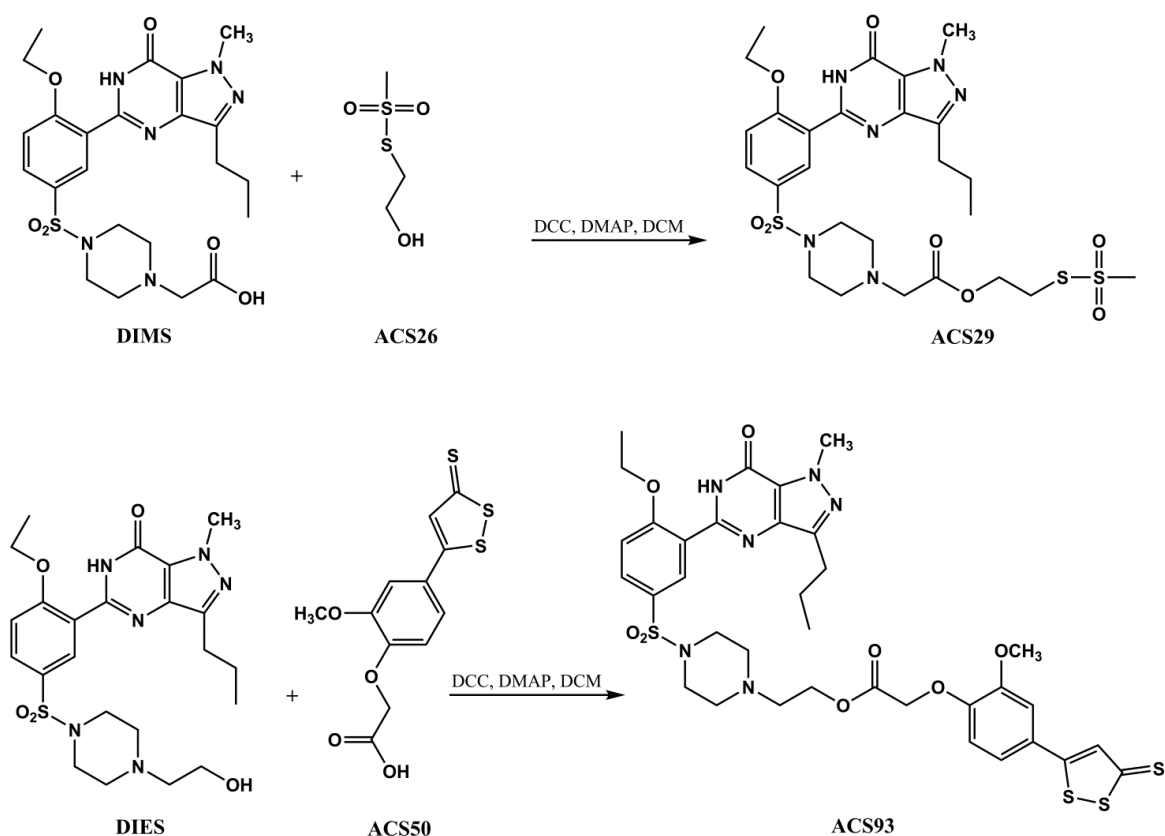
Per ottenere i derivati del sildenafil ACS29 e ACS93 è stato prima necessario preparare gli intermedi N-demetil-N-idrossicarbonilmetil-sildenafil (DIMS) e l'N-demetil-N-idrossietil-sildenafil (DIES) seguendo le indicazioni di [134,135] (Schema 8).

Schema 8



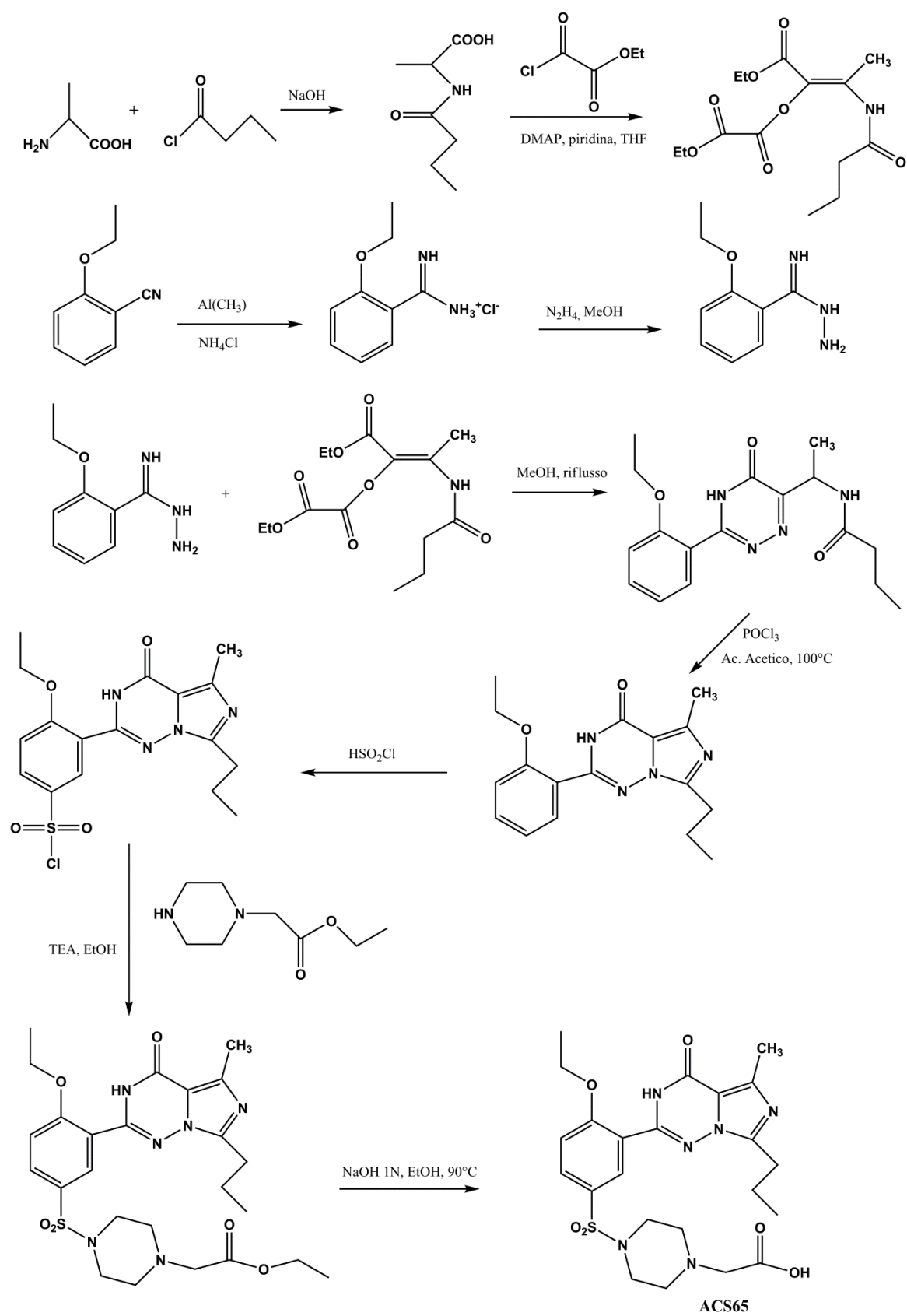
ACS29 e ACS93 sono stati ottenuti per reazione rispettivamente dell’N-demetil-N-idrossicarbonilmetil-sildenafil (DIMS) con ACS26 e di N-demetil-N-idrossietil-sildenafil con ACS50, in presenza di agenti accoppianti quali N,N'-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) e 4-dimetilamminopiridina (DMAP) per favorire la formazione del legame estereo (Schema 9).

Schema 9

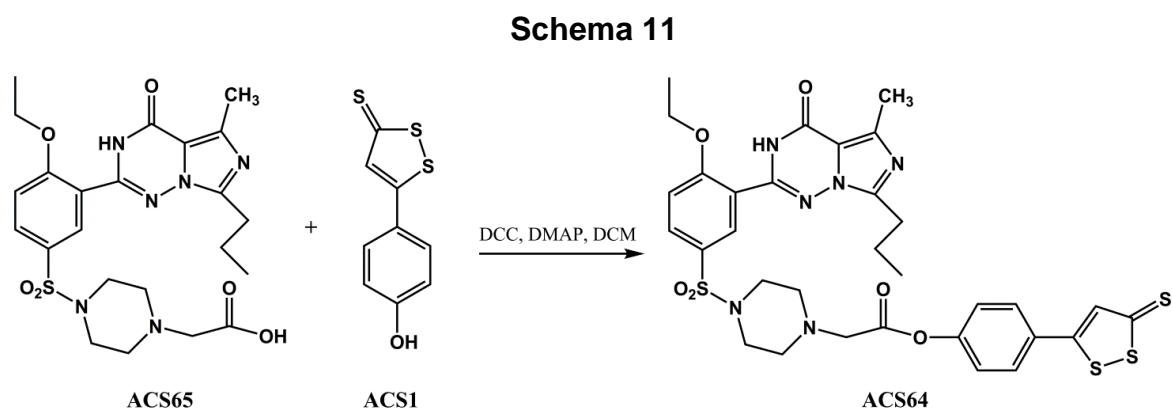


Per ottenere il derivato del vardenafil ACS64 è stato necessario preparare l'intermedio ACS65 seguendo le indicazioni di [136] (Schema 10).

Schema 10



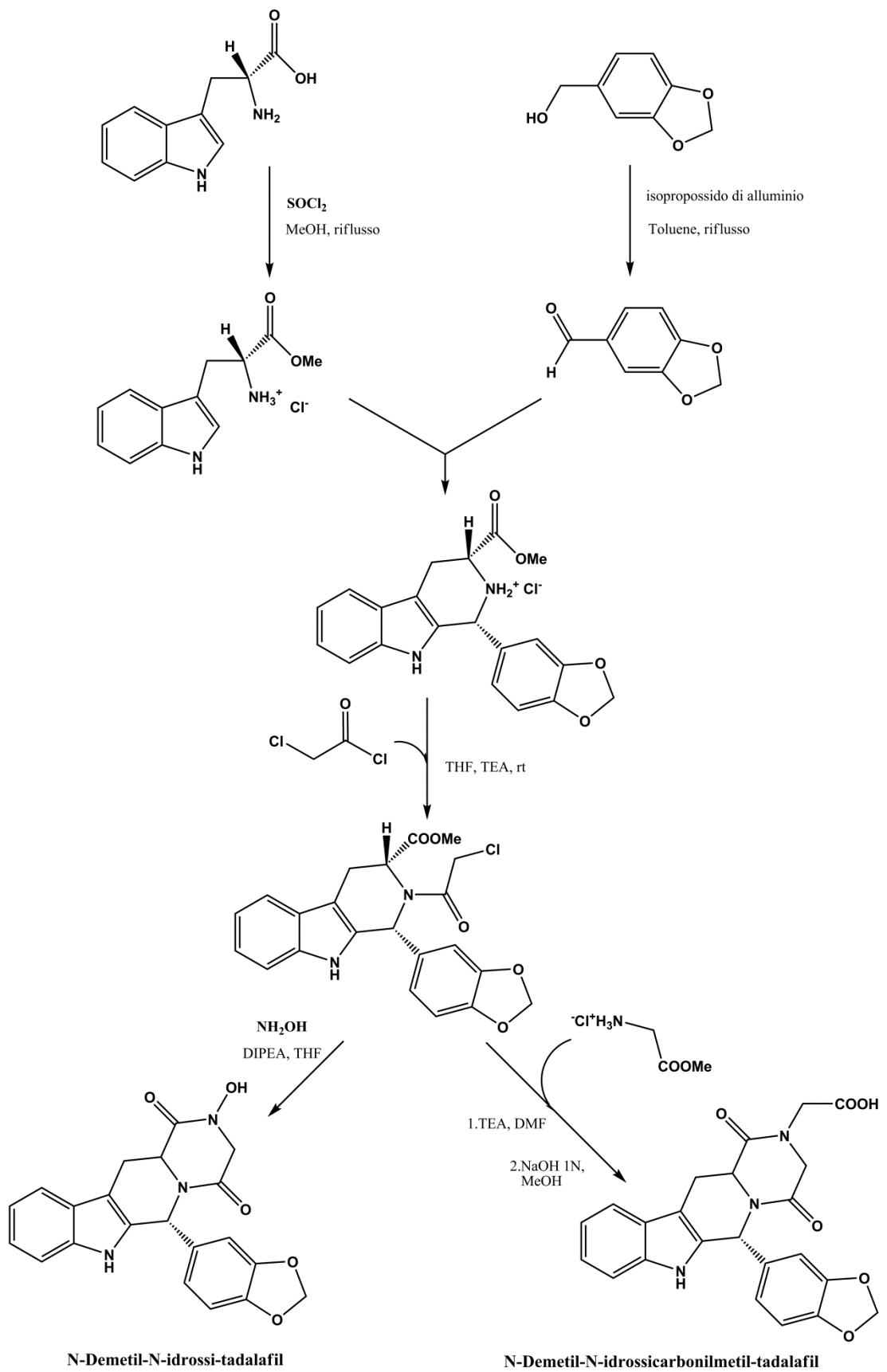
ACS64 è stato realizzato attraverso la formazione di un legame estereo tra ACS65 e ACS1 in presenza di DCC e DMAP (Schema 11).



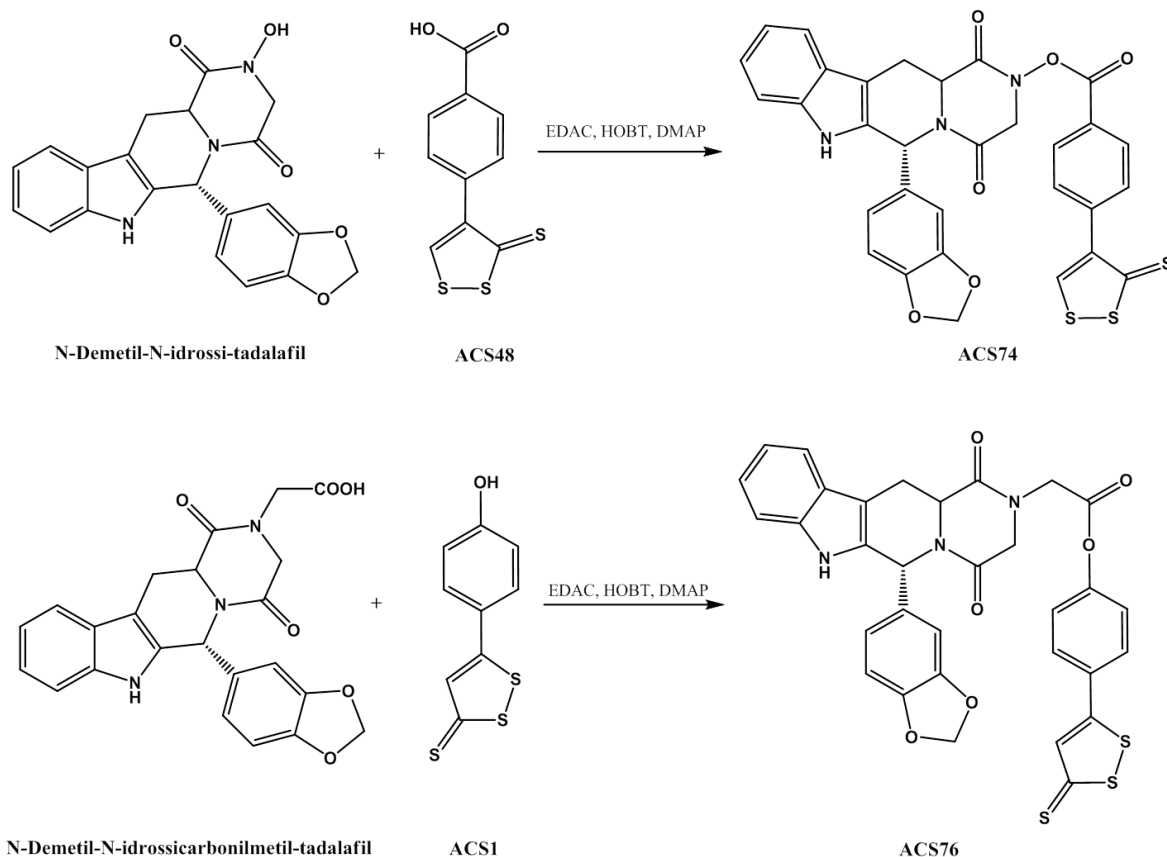
Per la sintesi di ACS74 e ACS76 sono stati prima preparati i derivati del tadalafil N-demetil-N-idrossi-tadalafil e N-demetil-N-idrossicarbonilmetil-tadalafil secondo le indicazioni di [137] (Schema 12).

I composti ibridi ACS74 e ACS76 sono stati ottenuti per reazione rispettivamente dell’N-demetil-N-idrossi-tadalafil con ACS48 e di N-demetil-N-idrossicarbonilmetil-tadalafil con ACS1, in presenza di agenti accoppianti quali idrossibenzotriazolo (HOBt), 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimide cloridrato (EDAC) e 4-dimetilamminopiridina (DMAP) per favorire la formazione del legame estereo (Schema 13).

Schema 12



Schema 13

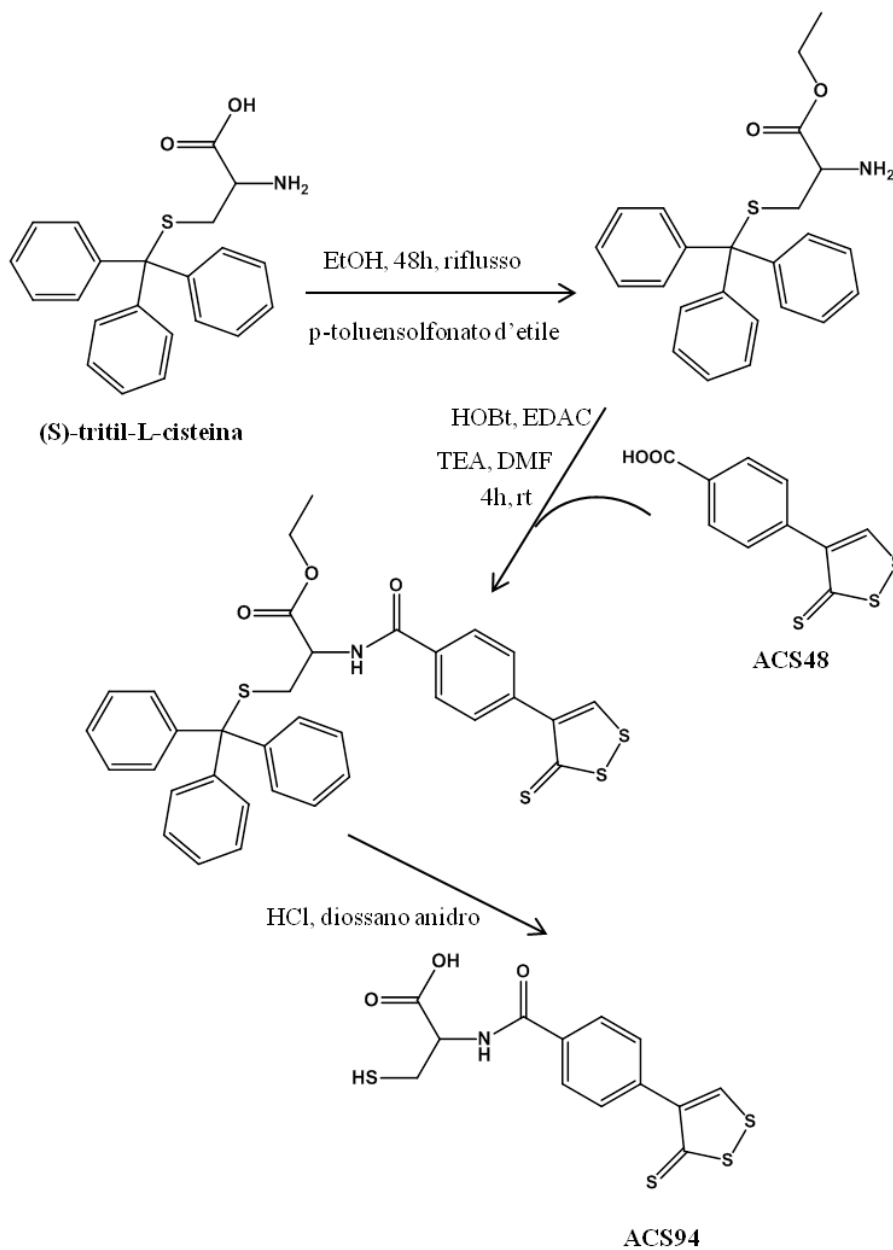


Ibridi di derivati della cisteina

Il 3-mercapto-2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditioil-4-il)benzamido)propanoato di etile (ACS 94) è stato ottenuto tramite formazione di un legame ammidico tra la funzione carbossilica di ACS 48 e quella amminica della cisteina etil estere, opportunamente protetta sulla funzione tiolica da un gruppo tritilico. A tale scopo la (S)-tritil-L-cisteina di origine commerciale è stata fatta reagire con p-toluensolfonato di etile in EtOH secondo le indicazioni di [138] e la (S)-tritil-L-cisteina etil estere così ottenuta è stata poi fatta condensare con ACS 48 in presenza di agenti accoppianti quali EDAC, HOBT e TEA.

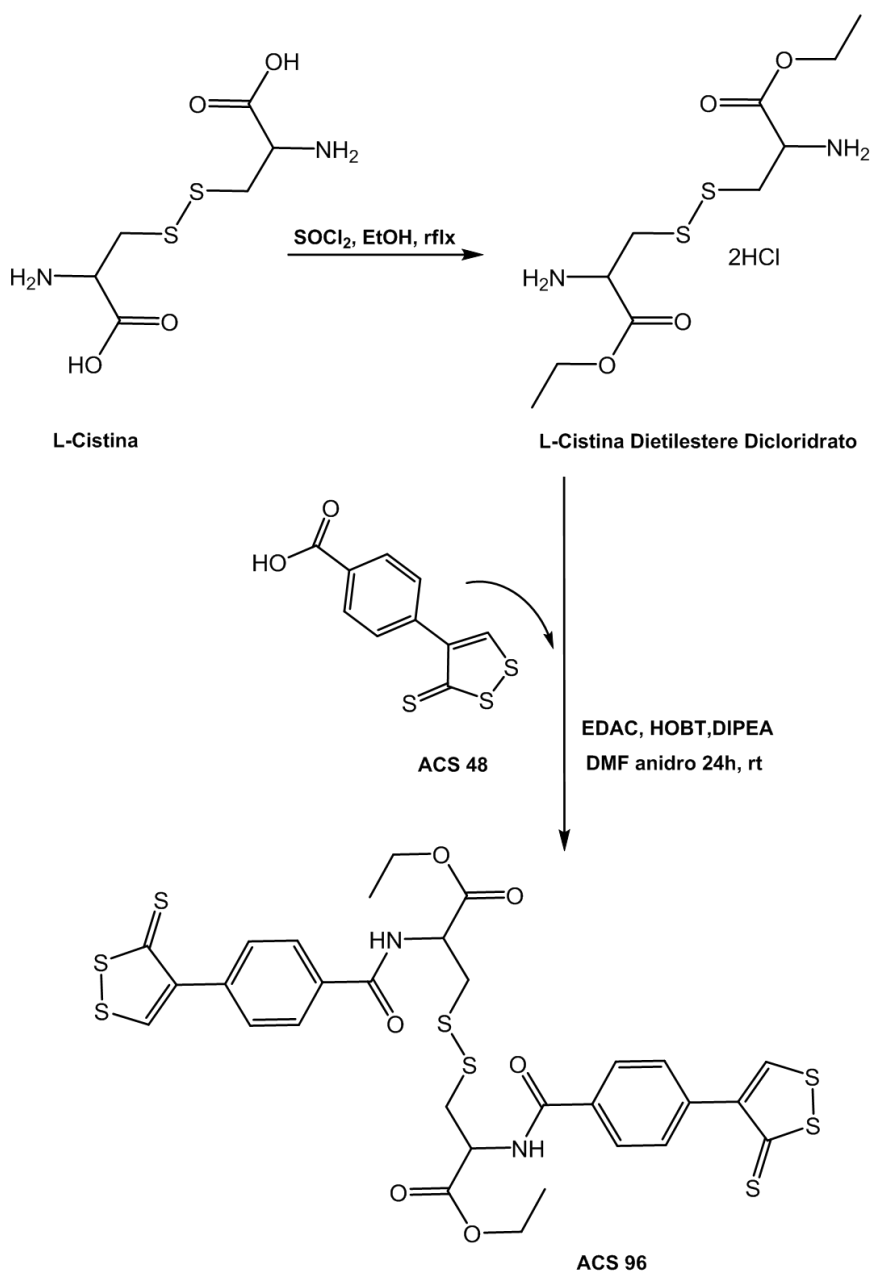
La successiva deprotezione del derivato cisteinico è stata infine realizzata tramite idrolisi con HCl in diossano anidro (Schema 14).

Schema 14



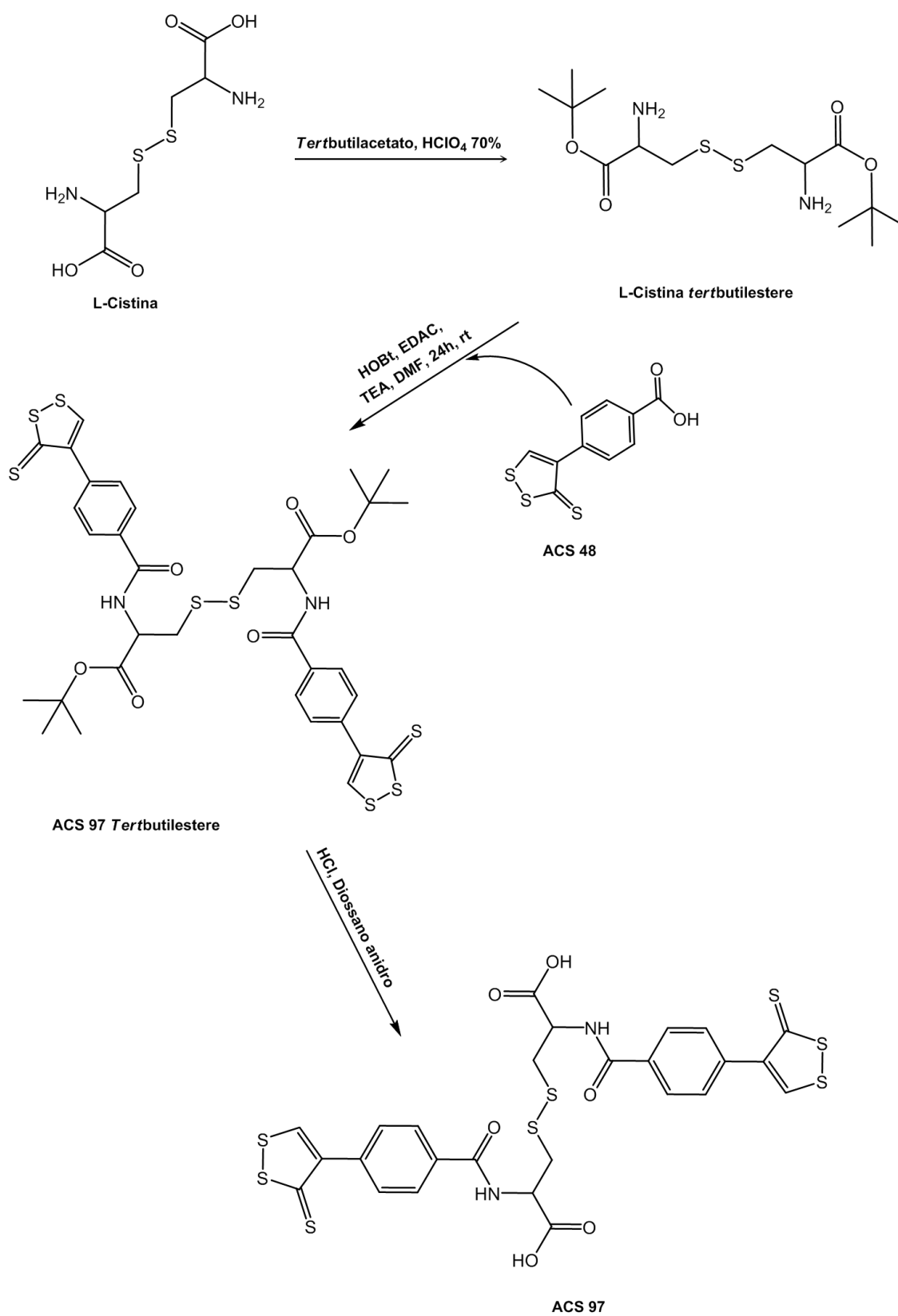
Il 3,3'-disulfan-diilbis(2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditioil-4-il)benzamido)propanoato) d'etile (ACS 96) è stato realizzato mediante formazione del legame ammidico tra il gruppo carbossilico di ACS 48 e le due funzioni amminiche della L-cistina dietilestere dicloridrato, precedentemente preparata facendo reagire la L-cistina (di origine commerciale) con EtOH e SOCl_2 a riflusso per 4h, secondo le indicazioni di [139]. Il cloridrato della L-cistina dietilestere è stato poi condensato con il composto ACS 48 in presenza di HOBt, EDAC e diisopropilettilammina (DIPEA) (Schema 15).

Schema 15



Infine l'acido 3,3'-disulfan-diilbis(2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzamido)propanoico) (ACS 97) è stato ottenuto mediante l'attacco di due molecole di ACS 48 alle due funzioni amminiche della L-cistina, con i due gruppi carbossilici protetti. A tale scopo è stata preparata la L-cistina terbutil estere facendo reagire la L-cistina con *ter*-butilacetato in presenza di acido perclorico al 70%, secondo le indicazioni di [140]; la cistina così protetta è stata quindi condensata con ACS 48 in presenza di EDAC, HOBt e TEA. La deprotezione del derivato cistinico è stata infine ottenuta mediante idrolisi con HCl in diossano anidro (Schema 16).

Schema 16



3. PARTE SPERIMENTALE CHIMICA

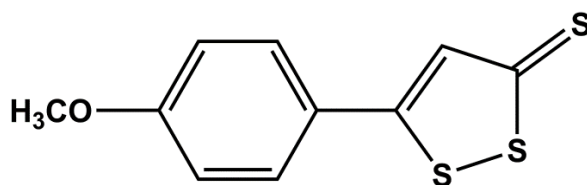
I punti di fusione sono stati determinati con il metodo del capillare su un apparecchio Büchi e non sono corretti.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati eseguiti con uno spettrometro Varian Mercury 300 VX usando CDCl_3 o DMSO-d_6 come solvente.

Gli spettri di massa ad alta risoluzione sono stati eseguiti presso il Centro Interdipartimentale Grandi Apparecchiature (C.I.G.A) dell'Università degli Studi di Milano con uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (HRMS) APEX II ICR-FTMS Bruker Daltonics con sorgente ESI.

INTERMEDI SOLFORATI

Anetolo ditioltione (ADT)

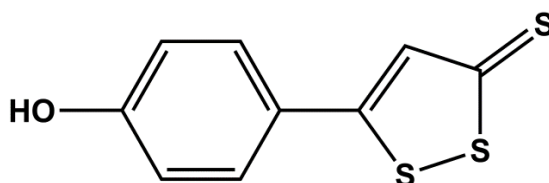


Ad una soluzione di 2,97g (20 mmoli) di anetolo in 10 ml di N,N-dimetilacetamide vengono aggiunti 3,2 g (100 mmoli) di zolfo e si scalda per 6 ore e 30 min a 145°C sotto agitazione e.m., avendo cura di mantenere il collo del refrigerante collegato mediante un tubo di gomma ad un sistema di trappole contenenti soda e candeggina, allo scopo di impedire il diffondersi di H₂S nell'ambiente. La miscela assume un colore arancione-bruno. L'andamento della reazione viene controllato ogni ora mediante TLC su SiO₂ (miscela eluente CH₂Cl₂ / etere di petrolio in rapporto 10:2). Dopo aver lasciato a riposo per tutta la notte a temperatura ambiente, si filtra sotto vuoto lo zolfo che non ha reagito e si diluisce il filtrato con 100 ml di H₂O per favorire la precipitazione dell'anetolditioltione e dello zolfo ancora presente. All'aggiunta dell'acqua, infatti, si nota la formazione di un precipitato di colore bruno, mentre la soluzione passa da un colore bruno a giallo-arancio. Dalla seconda filtrazione si ottiene un precipitato bruno, inizialmente pastoso, appiccicoso e difficile da trattare, che viene lavato con abbondante acqua e con etere etilico in successione, fino ad ottenere 1,732 g di polvere arancione-marrone molto fine.

Dopo ricristallizzazione da acetato di etile si ottengono 0,77g di cristalli con p.f. 108,7-109,7°C e, per successive concentrazioni delle madri, altre due frazioni di cristalli per un totale di 1,327g di anetolditioltione (ADT) (resa 28,1%).

¹H-N.M.R. (CDCl₃): δ = 7.65 (d, J = 8.20 Hz, 2H); 7.41 (s, 1H); 6.95 (d, J = 8.20 Hz, 2H); 3,85 (s, 3H).

5-(4-Idrossifenil)-1,2-ditiol-3-tione (ADTOH)

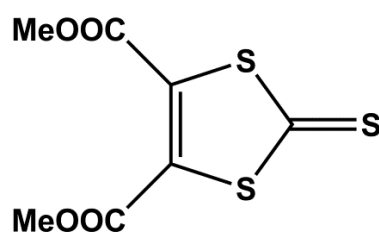


In un pallone da 50 ml vengono riuniti 1,5 g (6,2 mmoli) di anetolditioltione (ADT) e 7,5 g (62 mmoli) di piridina cloridrato e si scalda a 220°C per 20 min. Terminata la reazione si esegue una TLC di controllo su SiO₂ (miscela eluente CH₂Cl₂ e metanolo in rapporto 10:0,5).

Quando la miscela di reazione, raffreddandosi, raggiunge una temperatura inferiore a 100°C, si aggiunge HCl 1N in eccesso rispetto alle moli di ADT. In questo modo il composto fenolico precipita e viene raccolto su filtro, dove può essere lavato con abbondante acqua per eliminare la piridina cloridrato. Per separare il prodotto demetilato dall'ADT che non ha reagito, il residuo solido viene disciolto in NaOH 0,1 N e la soluzione basica, dopo essere stata filtrata, viene acidificata con acido acetico 4N fino a raggiungere pH 6. In queste condizioni il composto fenolico precipita abbondantemente. Dopo filtrazione a pressione ridotta e lavaggio del precipitato con abbondante acqua, il solido di colore rosso-bruno viene lasciato asciugare in essiccatore. Dopo ricristallizzazione da etanolo del prodotto grezzo (1,130g) si ottengono 650 mg di cristalli con p.f. 191-192°C e per successiva concentrazione delle madri altre due frazioni (con p.f. leggermente inferiori) per un totale di 947 mg (resa 67%) di 5-(4-idrossifenil)-1,2-ditiol-3-tione (ADTOH).

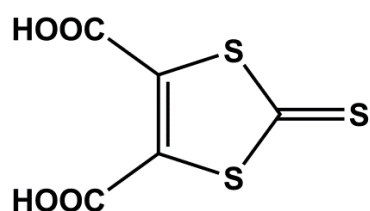
¹H-N.M.R. (DMSO-*d*₆): δ = 7.75 (d, J = 8.20 Hz, 2H); 7.69 (s, 1H); 6.95 (d, J = 8.20 Hz, 2H).

Estere dimetilico dell'acido 2-tiosso-1,3-ditiol-4,5-dicarbossilico



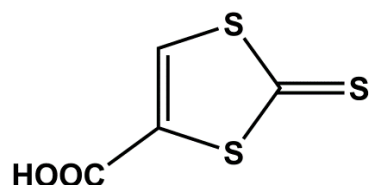
Una sospensione di etilene tritiocarbonato (2,82 g; 20 mmoli) e di dimetil acetilene dicarbossilato (2,91 g; 20 mmoli) in 10 ml di toluene viene scaldata a riflusso e agitata per 6 ore al termine delle quali si raffredda e si concentra sotto vuoto. All'aggiunta di 3 ml di etere di petrolio alla soluzione toluenica concentrata, si osserva la formazione di abbondante precipitato giallo che viene raccolto su filtro e lavato con etere di petrolio. Le madri di lavaggio vengono concentrate e raffreddate in bagno di ghiaccio, permettendo la precipitazione di ulteriore prodotto che viene anch'esso lavato su filtro con etere di petrolio. Si recuperano 3,96 g di prodotto solido cristallino giallo con p.f. 86-87°C[130] (Resa 79%).

Acido 2-tiosso-1,3-ditiol-4,5-dicarbossilico



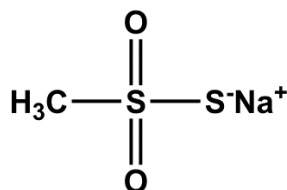
Ad una sospensione di estere dimetilico dell'acido 2-tiosso-1,3-ditiol-4,5-dicarbossilico (3 g; 0,012 mol) in 18 ml di acqua si aggiungono 12,7 ml di HCl conc. e 6 ml di acido acetico glaciale. La miscela di reazione viene posta in agitazione elettromagnetica per 2 ore a 110°C. Dopo raffreddamento in bagno di ghiaccio si ha la precipitazione di abbondante prodotto che viene recuperato per filtrazione e lavato con pochi ml di acqua ghiacciata. Il prodotto, posto in essiccatore per 24 h, pesa 2,1 g e si presenta come un solido cristallino giallo con p.f. 154,2-154,6°C, conforme a quanto riportato in letteratura[129]. (resa 78%).

Acido 2-tiosso-1,3-ditiol-4-carbossilico (ACS5)



Si pongono 300 mg di acido 2-tiosso-1,3-ditiol-4,5-dicarbossilico (1,35 mmoli) in una provetta e si scalda in assenza di solvente a 165°C. Durante il riscaldamento il solido fonde e si nota sviluppo di CO₂. Dopo 20 minuti si raffredda a temperatura ambiente e si riprende con una soluzione satura di NaHCO₃. La frazione di prodotto insolubile viene eliminata per filtrazione, mentre il filtrato viene acidificato con HCl 1N e raffreddato in un bagno di ghiaccio per permettere la cristallizzazione del prodotto desiderato, che viene raccolto su filtro e lavato con acqua fredda. Dopo essiccamento il prodotto pesa 200 mg e si presenta come un solido cristallino di colore marrone con p.f. 199,5-200,5°C conforme a quanto riportato in letteratura[129]. (Resa 83%).

Sodio metantiosolfonato

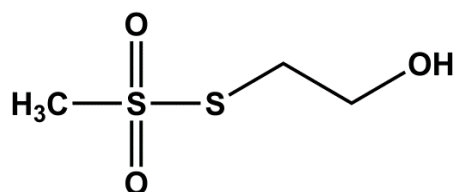


In una soluzione di 4 g (16,32 mmoli) di sodio solfuro nonaidrato in 2,5 ml di H₂O, si fa gocciolare 1,4 g (12,55 mmoli) di cloruro di mesile. Ad ogni aggiunta compare un precipitato giallo che si solubilizza se si mantiene la miscela sotto agitazione e.m. Al termine del gocciolamento, la soluzione assume colorazione arancione. La reazione procede per circa 1h, a temperatura ambiente, sotto agitazione e.m. L'andamento della reazione è controllato con TLC su silice, con miscela eluente CH₂Cl₂: CH₃OH/ 9,7: 0,3.

Al termine della reazione, si evapora a secchezza la soluzione. Si ottiene un residuo solido giallo (3,2 g) che viene ricristallizzato da etanolo, ottenendo 891 mg di prodotto solido bianco (resa 53%).

¹H-N.M.R. (DMSO-d₆): δ = 2.90 (s, 3H)

2-Idrossietil metantiosolfonato (HETMS; ACS26)



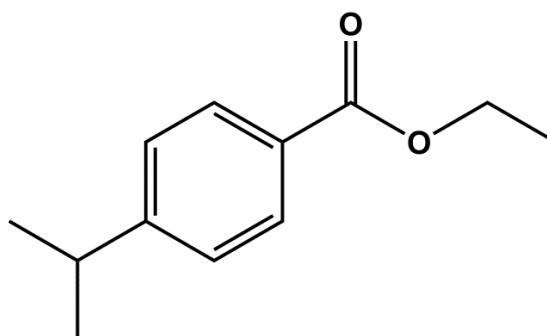
Ad una soluzione di 3 g (22,40 mmoli) di sodio metantiosolfonato in 35 ml di etanolo si fa gocciolare una soluzione di 3,34 ml (44,80 mmoli) di 2-bromoetanolo in 4,5 ml di etanolo. La miscela di reazione viene scaldata a riflusso per 6 h sotto agitazione e.m.

L'andamento della reazione è seguito con TLC su silice, utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂ - CH₃OH (9,7: 0,3) e come rivelatore acido fosfomolibdico.

Al termine della reazione si filtra il NaBr formatosi e la soluzione filtrata viene evaporata a secchezza. Il residuo ottenuto viene ridisciolto in cloroformio e la soluzione organica viene estratta con H₂O. La fase acquosa separata viene evaporata a pressione ridotta ed il residuo ottenuto viene ripreso con THF. Si filtra a pressione ridotta l'eventuale NaBr rimasto e si evapora a secchezza la soluzione tetraidrofurana, ottenendo 2,72 g di prodotto di consistenza oleosa e di colore giallo, che viene cromatografato su SiO₂, utilizzando come miscela eluente etere di petrolio/acetato di etile in rapporto 65:35. Si recuperano 2,360 g di prodotto come olio incolore (resa 67,4%).

¹H-N.M.R. (CDCl₃): δ = 3.90 (t, J = 7.10 Hz, 2H); 3.40 (s, 3H); 3.38 (t, J = 7.10 Hz, 2H); 2.00 (s, 1H, scambia con D₂O).

4-Isopropilbenzoato di etile

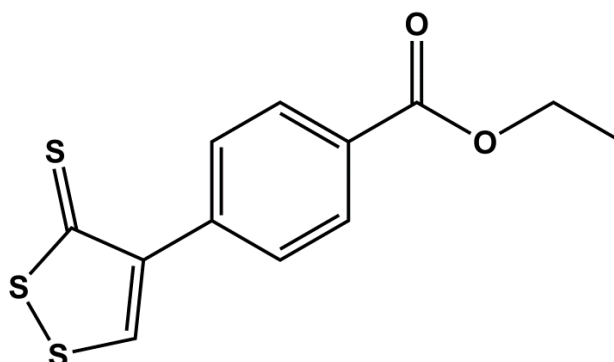


Ad una soluzione di acido 4-isopropilbenzoico (3 g; 18,3 mmoli) in etanolo (75 ml) vengono aggiunti 0,73 ml di H₂SO₄ conc. e si scalda a riflusso per 8 ore. L'andamento della reazione viene controllato mediante TLC su SiO₂ utilizzando CH₂Cl₂ come eluente.

Al termine della reazione si evapora il solvente, il residuo viene ripreso con CH₂Cl₂ e la soluzione organica viene dibattuta in successione con una soluzione satura fredda di NaHCO₃ e una soluzione satura di NaCl.

La fase organica viene seccata su Na₂SO₄ anidro ed evaporata a secchezza, ottenendo così 2,76 g (resa: 78,6%) di prodotto oleoso incolore.

4-(3-Tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzoato di etile



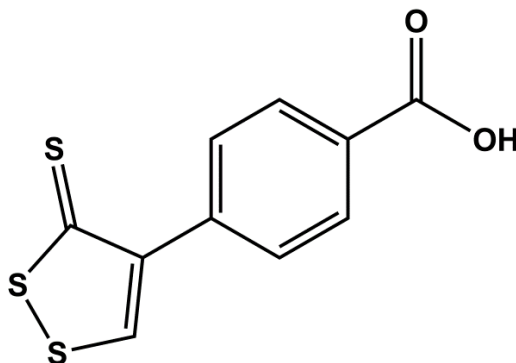
In un pallone da 100 ml viene fuso zolfo elementare (3,5 g; 109,2 mmoli), impostando una vigorosa agitazione e.m. e una temperatura di 145°C, avendo cura di mantenere il collo del refrigerante collegato mediante un tubo di gomma, ad un sistema di trappole contenenti soda e candeggina, allo scopo di impedire il diffondersi di H₂S nell'ambiente.

Dopo 30 minuti dall'avvenuta fusione nel pallone viene fatto gocciolare molto lentamente il 4-isopropilbenzoato di etile (2,72 g; 14,15 mmoli) e si scalda la miscela di reazione a 220°C per 5 ore e 30 minuti. La miscela di reazione quando è a 187°C è di colore rosso, poi diventa bruna con l'aumentare della temperatura. L'andamento della reazione viene controllato mediante TLC su SiO₂ utilizzando CH₂Cl₂ come eluente.

Al termine della reazione, dopo aver lasciato raffreddare la miscela fino a 110°C, si introducono 8,5 ml di toluene e 19,5 ml di acetone e la sospensione che si forma viene mantenuta sotto agitazione e.m. costante e a temperatura ambiente per una notte. Si filtra lo zolfo non reagito ed il filtrato viene evaporato a secchezza a pressione ridotta ottenendo un grezzo (3,57 g) che viene cromatografato su SiO₂ (107 g), utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/cicloesano in rapporto 6:4.

Si recupera un prodotto polveroso arancione (1,08 g; resa: 27%) che dopo lavaggio con etere etilico ha p.f.=157,9-159,1°C[131]

Acido 4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzoico (ACS 48)



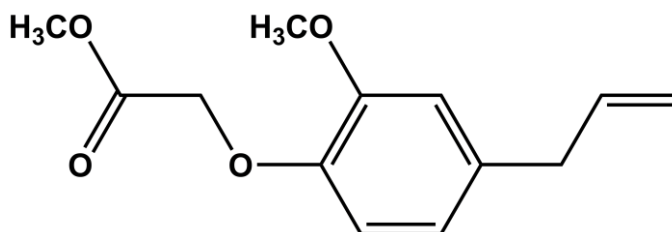
Ad una sospensione dell'estere etilico dell'acido 4-(3-tiosso-3H-[1,2]ditiol-4-il)benzoico (1,08 g; 3,83 mmoli) in acido acetico (49 ml), mantenuta in costante agitazione e.m., vengono aggiunti 8 ml di H₂SO₄ al 50% e si scalda a 100°C per 5 ore seguendo l'andamento dell'idrolisi mediante TLC su SiO₂ (miscela eluente CH₂Cl₂/metanolo in rapporto 9:1).

Al termine della reazione si filtra l'abbondante precipitato formatosi, lavandolo a fondo con H₂O distillata per eliminare tracce di acido acetico e acido solforico eventualmente trattenute.

Il prodotto (911 mg), dopo essere stato mantenuto in essiccatore per una notte, viene lavato su filtro in successione con etere di petrolio ed etere etilico, ottenendo 899 mg (resa: 92,3%) di prodotto cristallino arancione (P.f.=257-263°C) [131].

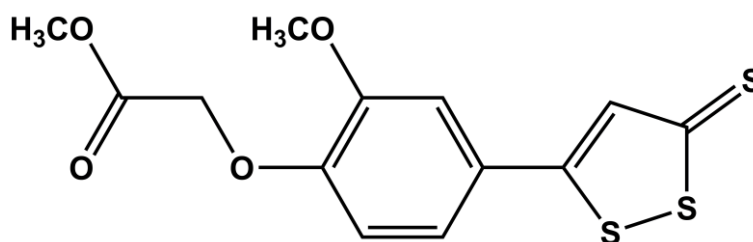
¹H NMR (Varian Mercuri 300, DMSO-d₆): δ = 13.03 (s, 1H, scambia con D₂O); 9.23 (s, 1H); 7.97 (d, J = 7.63 Hz, 2H); 7.69 (d, J = 7.63 Hz, 2H).

2-(4-Allil-2-metossifenossi)acetato di metile



Ad una soluzione di NaOH (1,23 g; 30,7 mmoli) in etanolo (35 ml) viene aggiunto eugenolo (4,72 ml; 30,7 mmoli) e dopo aver lasciato in agitazione e.m. ed in corrente di azoto per circa 10 minuti, si aggiunge metil bromoacetato (4,2 ml; 37,58 mmoli) e si scalda a refluxo per 6 ore. Si segue l'andamento della reazione con TLC su SiO₂, utilizzando diclorometano come eluente ed esponendo la lastrina ai vapori di iodio per la rivelazione. La soluzione si presenta gialla e dopo 1 ora di riscaldamento compare un precipitato di NaBr. Al termine della reazione, si elimina per filtrazione il NaBr formatosi ed il filtrato viene evaporato a secchezza. Si ottiene un residuo oleoso giallo che viene ripreso con una soluzione fredda di NaOH 0,1N ed estratto con etere etilico. La fase organica, seccata su Na₂SO₄ anidro, viene evaporata a secchezza ottenendo un grezzo (6,6 g) che viene cromatografato su silice, utilizzando come miscela eluente cicloesano/diclorometano in rapporto 3:1. Si ottengono 4,2 g di prodotto oleoso giallo (resa: 50%).

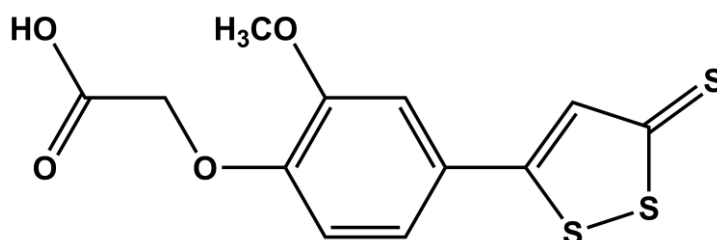
2-(2-Metossi-4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-5-il)fenossi)acetato di metile



In un pallone da 100 ml munito di refrigerante collegato, mediante tubo di gomma, ad un sistema di trappole contenenti soda e candeggina, allo scopo di impedire il diffondersi di H₂S nell'ambiente, viene fuso zolfo elementare (2,06g; 64,44 mmoli), ad una temperatura di 146°C, impostando una vigorosa agitazione con agitatore meccanico. Si fa quindi gocciolare lentamente 2-(4-allyl-2-metossifenossi)acetato di metile (2,06 g; 8,72 mmoli) e si porta la temperatura a 220°C per 40 minuti. L'andamento della reazione viene controllato mediante TLC su silice (miscela eluente: etile acetato/cicloesano in rapporto 1:1). Si lascia raffreddare lentamente fino a 90°C e si aggiungono 2 ml di toluene e 5 di acetone. La sospensione formatasi viene mantenuta in agitazione a temperatura ambiente per una notte, quindi lo zolfo non reagito viene filtrato e lavato con acetone. Il filtrato viene evaporato a secchezza ed il residuo grezzo ottenuto (3,84 g) viene cromatografato su silice, utilizzando come miscela eluente CH₂Cl₂/cicloesano in rapporto 98:2. Si recuperano 534 mg di prodotto che vengono lavati su filtro con etere etilico, ottenendo 424 mg (resa 15%) di solido cristallino rosso avente p.f. 165-166°C, corrispondente a quello riportato in letteratura [132].

Acido 2-(2-metossi-4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-5-il)fenossiacetico

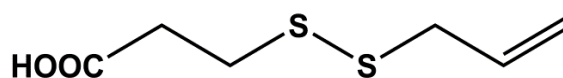
(ACS 50)



Ad una sospensione di 2-(2-metossi-4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-5-il)fenossiacetato di metile (587 mg; 1,79 mmoli) in acido acetico (25 ml) si aggiungono 4 ml di H₂SO₄ al 50% e si scalda a 100°C per 4 ore, mantenendo in costante agitazione e.m. e controllando l'andamento della reazione con TLC su SiO₂ (miscela eluente CH₂Cl₂/metanolo/CH₃COOH in rapporto 9:1:0.1). Al termine della reazione, la miscela viene fatta raffreddare in un bagno di ghiaccio e il precipitato che si forma viene filtrato e lavato in successione con acqua ed etere etilico, recuperando 530 mg di prodotto cristallino bruno avente p.f. 198-200°C.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 7.86 (s, 1H); 7.45-7.42 (m, 2H); 6.96 (d, J = 9.09 Hz, 1H); 4.78 (s, 2H); 3.86 (s, 3H).

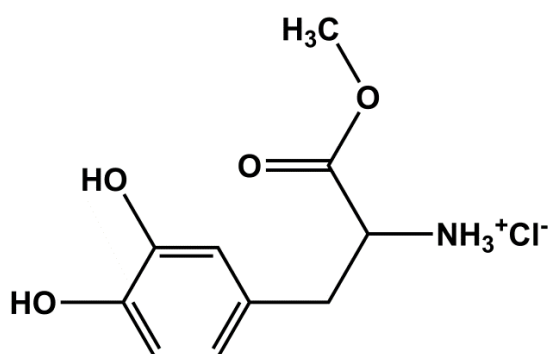
Acido 3-(allildisulfanil)propanoico (ACS81)



Ad una soluzione di allildisolfuro (2,4 g; 13,6 mmoli) in etere etilico (10 ml) e metanolo (20 ml) viene fatta gocciolare una soluzione eterea (5 ml) di acido 3-mercaptopropanoico (0,49 g; 4,6 mmoli), seguita da una soluzione 10M di NaOH (0,46 ml; 4,6 mmoli). La miscela di reazione viene agitata per 24 ore a temperatura ambiente e in atmosfera d'azoto. Si eseguono TLC di controllo su SiO₂ utilizzando come eluente una misceladi cicloesano/etile acetato in rapporto 1:1. Dopo evaporazione dei solventi, il grezzo viene ripreso con etere e la soluzione eterea viene dibattuta con una soluzione di HCl 1N. La fase eterea viene seccata su Na₂SO₄ anidro ed evaporata a secchezza. Si ottiene un prodotto oleoso che viene ulteriormente purificato mediante cromatografia su SiO₂, utilizzando diclorometano/metanolo (98:2) come miscela eluente. Si isola il prodotto puro (520 mg) come olio incolore (resa: 63%). ¹H NMR (CDCl₃): δ = 5.91-5.77 (m, 1H); 5.24-5.13 (m, 2H); 3.33 (d, *J* = 7.30 Hz, 2H); 2.92 (t, *J* = 6.90 Hz, 2H); 2.80 (t, *J* = 6.90 Hz, 2H).

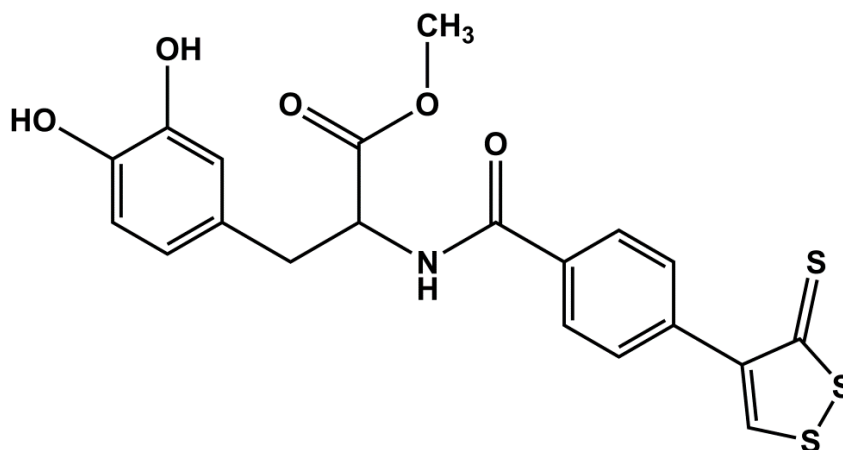
DERIVATI SOLFORATI DELLA L-DOPA

L-DOPA metil estere cloridrato



Ad una sospensione di 1 g (5,07 mmoli) di L-DOPA in 20 ml di metanolo si fanno gocciolare 1,1 ml (15,21 mmoli) di cloruro di tionile, quindi si scalda a riflusso e conagitazione e.m. per 4 ore, al termina delle quali si evapora a pressione ridotta il solvente ed il cloruro di tionile in eccesso. Il residuo solido viene lasciato in essiccatore sotto vuoto per una notte allo scopo di favorire la completa eliminazione del cloruro di tionile. Il prodotto ottenuto (1,255 g; resa:100%) viene utilizzato tal quale per le reazioni successive, senza ulteriore purificazione.

**Metil 3-(3,4-diidrossifenil)-2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditio-
4-il)benzamido)propanoato (ACS83)**



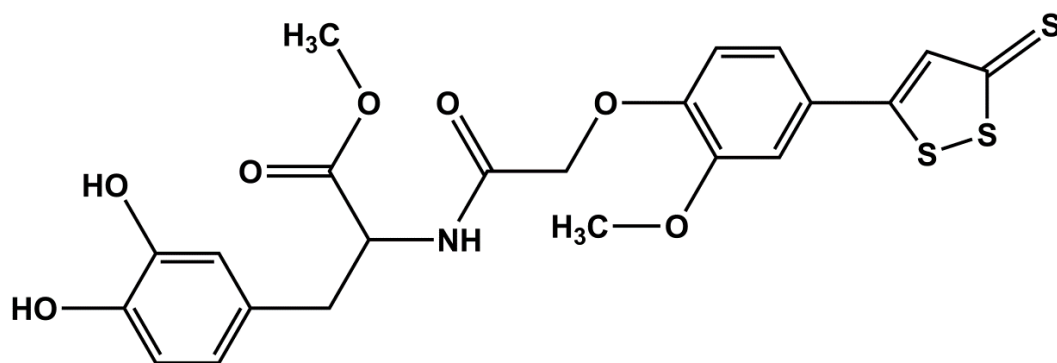
L-DOPA metil estere cloridrato (200 mg; 0,8mmoli), 1-idrossibenzotriazolo (HOBT, 185 mg; 1,2 mmoli) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide cloridrato (EDAC, 232 mg; 0,96 mmol) vengono aggiunti ad una soluzione di ACS48 (204 mg; 0,8 mmoli) in 4 ml di DMF anidra e, dopo l'aggiunta di trietilamina (0,22 ml; 1,6 mmoli), la soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 24 h sotto atmosfera d'azoto. Dopo aver evaporato la DMF, il residuo viene ripreso con diclorometano e lavato in sequenza con acqua, HCl 1N e ancora acqua e infine viene seccato su Na₂SO₄ anidro ed evaporato a secchezza. Il residuo grezzo viene purificato mediante cromatografia flash (silice, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). Si ottengono 125 mg di prodotto cristallino rosso-arancione con p.f. 160-165°C (resa: 35%).

¹H NMR (DMSO-d₆): δ= 9.21 (s, 1H); 8.81 (d, J = 7.63 Hz, 1H, scambia con D₂O); 8.74 (s, 1H, scambia con D₂O); 8.66 (s, 1H, scambia con D₂O); 7.85 (d, J = 8.21 Hz, 2H); 7.65 (d, J = 8.21 Hz, 2H); 6.65 (d, J = 1.76 Hz, 1H); 6.59 (d, J = 8.21 Hz, 1H); 6.51 (dd, J = 1.76, 8.21 Hz, 1H); 4.57-4.50 (m, 1H); 3.62 (s, 3H); 2.99-2.85 (m, 2H).

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]: 470.01620.

Log P calcolato: 3.58

Metil 3-(3,4-diidrossifenil)-2-(2-(2-metossi-4-(3-tiosso-3H-1,2-ditioil-5-il)fenossi)acetoamido)propanoato
(ACS84)



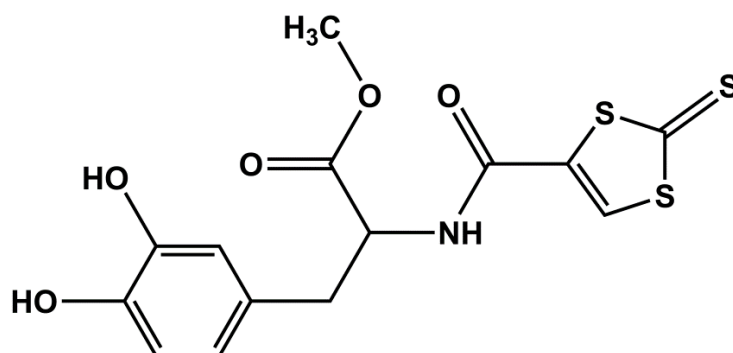
L-DOPA metil estere cloridrato (200 mg; 0,8mmoli), 1-idrossibenzotriazolo (HOBT, 185 mg; 1,2 mmoli), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide cloridrato (EDAC, 232 mg; 0,96 mmol) vengono aggiunti ad una soluzione di ACS50 (251,5 mg; 0,8 mmoli) in 4 ml di DMF anidra e, dopo l'aggiunta di trietilamina (0,22 ml; 1,6 mmoli), la soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 24 h sotto atmosfera d'azoto. Dopo aver evaporato la DMF, il residuo viene ripreso con diclorometano e lavato in sequenza con acqua, HCl 1N e ancora acqua e infine viene seccato su Na₂SO₄ anidro ed evaporato a secchezza. Il grezzo viene purificato mediante cromatografia flash (silice, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). Si ottengono 215 mg di prodotto cristallino rosso-arancione con p.f. 153-155°C (resa: 53%).

¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 8.79 (s, 1H, scambia con D₂O); 8.75 (s, 1H, scambia con D₂O); 8.29 (d, *J* = 7.91 Hz, 1H, scambia con D₂O); 7.85 (s, 1H); 7.42-7.37 (m, 2H); 6.77 (d, *J* = 8.21 Hz, 1H); 6.61 (d, *J* = 7.91 Hz, 1H); 6.56 (d, *J* = 2.05 Hz, 1H); 6.41 (dd, *J* = 2.05, 7.91 Hz, 1H); 4.65-4.54 (m, 2H); 4.51-4.43 (m, 1H); 3.85 (s, 3H); 3.61 (s, 3H); 2.91-2.72 (m, 2H).

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]: 530.03660.

Log P calcolato: 3.19

Metil 3-(3,4-diidrossifenil)-2-(2-tiosso-1,3-ditiol-4-carbossamido)propanoato (ACS85)



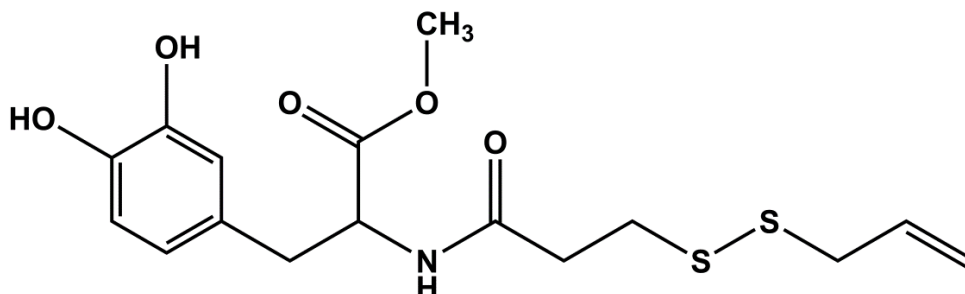
L-DOPA metilestere cloridrato (200 mg; 0,8mmoli), 1-idrossibenzotriazolo (HOBT, 185 mg; 1,2 mmoli), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide cloridrato (EDAC, 232 mg; 0,96 mmol) vengono aggiunti ad una soluzione di ACS5 (142,5 mg; 0,8 mmoli) in 4 ml di DMF anidra e, dopo l'aggiunta di trietilammina (0,22 ml; 1,6 mmoli), la soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 24 h sotto atmosfera d'azoto. Dopo aver evaporato la DMF, il residuo viene ripreso con diclorometano e lavato in sequenza con acqua, HCl 1N e ancora acqua e infine viene seccato su Na₂SO₄ anidro ed evaporato a secchezza. Il grezzo viene purificato mediante cromatografia flash (silice, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). Si ottengono 166 mg di prodotto cristallino giallo-arancione con p.f. 66-70°C (resa: 56%).

¹H NMR (DMSO-d₆): δ = 9.24 (d, 1H, J = 7.92 Hz, scambia con D₂O); 8.76 (s, 1H, scambia con D₂O); 8.71 (s, 1H, scambia con D₂O); 8.31 (s, 1H); 6.61-6.58 (m, 2H); 6.46 (dd, J = 1.76, 7.92 Hz, 1H); 4.47-4.39 (m, 1H); 3.61 (s, 3H); 2.96-2.76 (m, 2H).

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]: 393.98524.

Log P calcolato: 1.68

Metil 2-(3-(allildisulfanil)propanamido)-3-(3,4-diidrossifenil)propanoato (ACS86)



L-DOPA metilestere cloridrato (200 mg; 0,8mmoli), 1-idrossibenzotriazolo (HOBT, 185 mg; 1,2 mmoli), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimmide cloridrato (EDAC, 232 mg; 0,96 mmol) vengono aggiunti ad una soluzione di ACS81 (142,5 mg; 0,8 mmoli) in 4 ml di DMF anidra e, dopo l'aggiunta di trietilammina (0,22 ml; 1,6 mmoli,) la soluzione viene agitata a temperatura ambiente per 24 h sotto atmosfera d'azoto. Dopo aver evaporato la DMF, il residuo viene ripreso con diclorometano e lavato in sequenza con acqua, HCl 1N e ancora acqua e infine viene seccato su Na₂SO₄ anidro ed evaporato a secchezza. Il grezzo viene purificato mediante cromatografia flash (silice, CH₂Cl₂/MeOH, 98:2). Si ottengono 157 mg di prodotto con consistenza semisolida (resa: 50%).

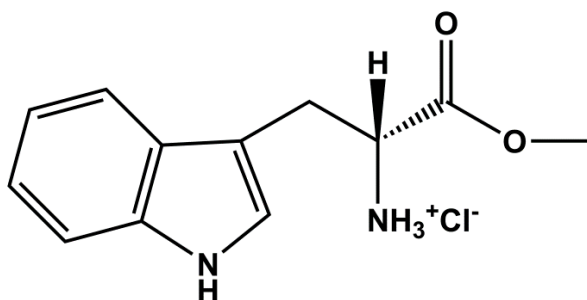
¹H NMR (DMSO-d₆): δ= 8.74 (s, 1H, scambia con D₂O); 8.68 (s, 1H, scambia con D₂O); 8.34 (d, J = 7.92 Hz, 1H, scambia con D₂O); 6.59 (d, J = 7.91 Hz, 1H); 6.54 (d, J = 2.06 Hz, 1H); 6.41 (dd, J = 2.06, 7.91 Hz, 1H); 5.86-5.72 (m, 1H); 5.20-5.09 (m, 2H); 4.37-4.30 (m, 1H); 3.56 (s, 3H); 3.35 (d, J = 7.33 Hz, 2H); 2.82-2.64 (m, 4H); 2.49-2.46 (m, 2H).

HRMS (ESI) *m/z* [M+Na]: 394.07469.

Log P calcolato: 2.32

DERIVATI SOLFORATI INIBITORI DELLA PDE5

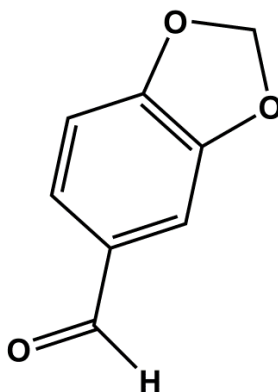
D-Triptofano metilestere cloridrato



Ad una sospensione di 3 g (14,7 mmoli) di D-triptofano in 20 ml di MeOH si fanno gocciolare 2,4 ml di SOCl_2 , mantenendo il pallone di reazione in un bagno di ghiaccio e in corrente di azoto. Finita l'aggiunta si lascia risalire la temperatura a quella ambiente e poi si scalda a riflusso per 1 h e mezza, controllando l'andamento della reazione con TLC su SiO_2 (miscela eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3 = 10:1:0,1$). Si evapora quasi completamente alla pompa ad acqua il metanolo e si aggiungono 20 ml di *tert*-butilmetiletere (MTBE). Si mantiene la soluzione in agitazione in un bagno di ghiaccio per 1 h, si filtra e si lava il prodotto solido con MTBE freddo. Si ottiene un solido bianco che, dopo essiccamento sotto vuoto a 60°C , pesa 3,616 g (resa: 96,6 %).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta = 11.15$ (s, 1H); 8.70 (s, 2H); 7.50 (d, $J=8.2$ Hz, 1H); 7.35 (d, $J=8.2$ Hz, 1H); 7.24 (s, 1H); 7.08-7.05 (m, 1H); 7.00-6.97 (m, 1H); 4.18-4.16 (m, 1H); 3.61 (s, 3H); 3.36-3.25 (m, 2H).

Piperonale



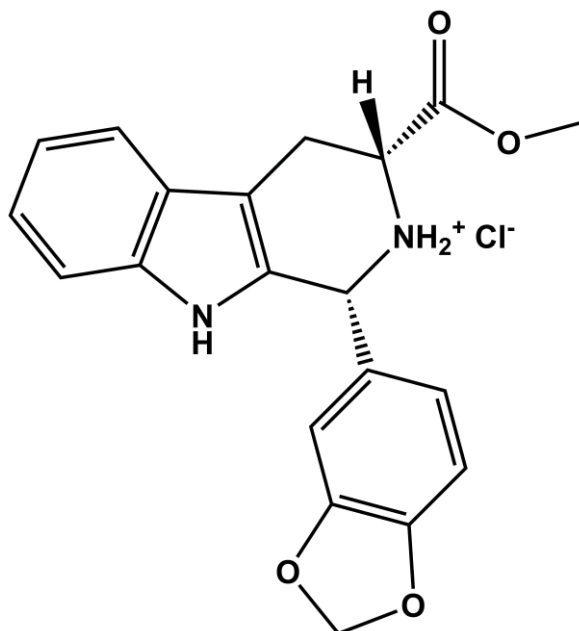
In un pallone a 3 colli da 250 ml con ricadere e in corrente d'azoto si caricano 4,08 g (0,026 mmoli) di alcol piperonilico e quantità catalitiche (10%) di alluminio isopropossido (0,55 g). Si aggiungono 45 ml di toluene e si ottiene una soluzione lattescente. Si porta a riflusso (a circa 110°C) e nell'arco di mezz'ora si aggiungono 1,6 g di para-formaldeide. Si controlla l'andamento della reazione con TLC (CH₂Cl₂), utilizzando come rivelatore acido fosfomolibdico.

Si lascia reagire per 2 h, poi si raffredda la miscela, si aggiungono 60 ml di NaOH 1 M, si trasferisce in imbuto separatore e si separano le due fasi. Si secca la fase organica con Na₂SO₄, si filtra e si porta a secchezza mantenendo la temperatura del bagno a 30°C.

Si ottengono 3,646 g di prodotto grezzo che viene cromatografato su SiO₂, utilizzando come miscela eluente cicloesano ed etile acetato (9:1).

Si ottengono 1,773 g di piperonale (resa: 45%).

(1R,3R)-1-(Benzo[d][1,3]diossol-5-il)-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indolo-3-carbossilato di metile cloridrato



Ad una sospensione di D-triptofano metilestere cloridrato (2,8 g; 0,011 mmoli) in 25 ml di isopropanolo si aggiunge una soluzione di piperonale (1,750 g; 0,012 mmoli) in isopropanolo (2 ml), si porta la temperatura a 66-70°C e si lascia in agitazione sotto atmosfera di azoto per tutta la notte.

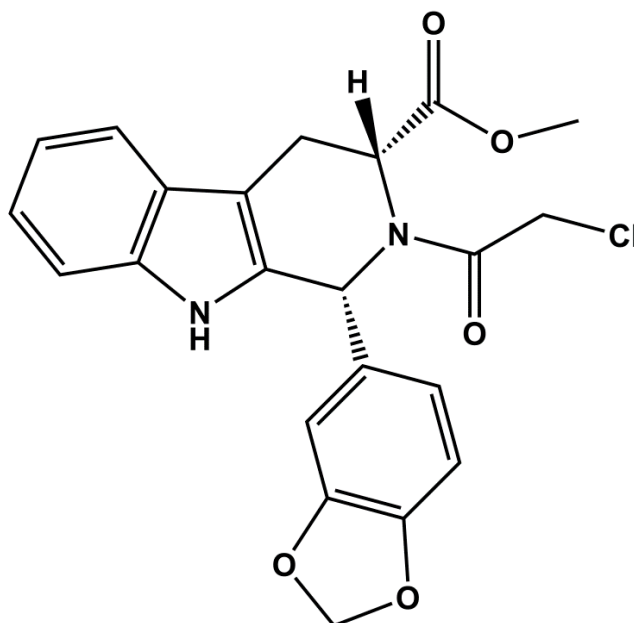
Si controlla l'andamento della reazione con TLC su SiO₂ (CH₂Cl₂:MeOH= 98:2).

La miscela di reazione viene filtrata e il solido bianco recuperato viene lavato con isopropanolo freddo e fatto asciugare in essiccatore.

Si ottengono 2,655 g di prodotto. (Resa: 62,3%).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ= 10.81 (1H, s); 10.67 (s, 1H, scambia con D₂O); 10.21 (s, 1H, scambia con D₂O); 7.52 (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.27 (d, J=8.0 Hz, 1H); 7.11 (m, 1H); 7.05-6.95 (m, 4H); 6.08 (s, 2H); 5.85 (m, 1H); 4.71 (m, 1H); 3.82 (s, 3H); 3.39-3.23 (m, 2H).

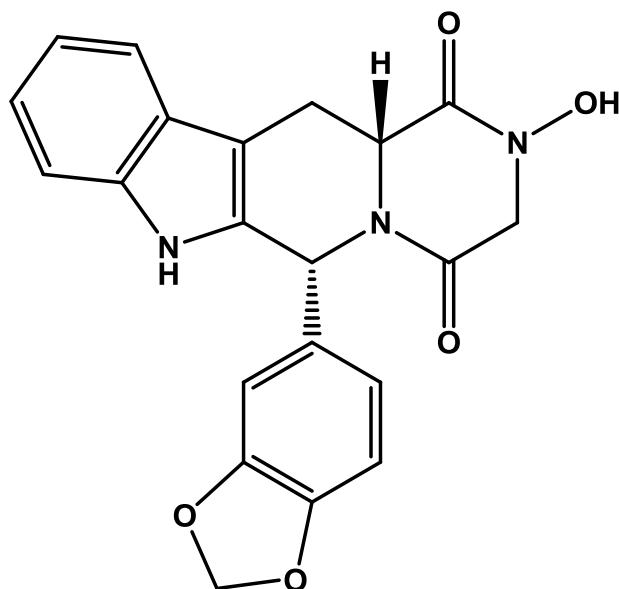
(1R,3R)-1-(Benzo[d][1,3]diossol-5-il)-2-(2-cloroacetil)-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indolo-3-carbossilato di metile



Ad una sospensione raffreddata a 0°C di (1R,3R)-1-(benzo[d][1,3]diossol-5-il)-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indolo-3-carbossilato di metile cloridato (2,6 g; 6,7 mmoli) in 14 ml di THF anidro, si fanno gocciolare 2,4 ml di trietilammina.

Si fa poi gocciolare una soluzione di cloroacetil cloruro (1,047 g; 0,72 ml) in 2 ml di THF anidro, mantenendo la temperatura tra 0°C-10°C con un bagno di ghiaccio. Al termine del gocciolamento, si lascia in agitazione, sotto atmosfera d'azoto per un'ora. Dopo evaporazione del solvente, si riprende il residuo con etile acetato. La fase organica viene dibattuta con acqua, seccata su Na₂SO₄ anidro e evaporataa secchezza. Si ottiene un prodotto solido che, dopo lavaggio con isopropanolo, pesa 2,595 g ed ha p.f. 209-210°C, conforme a quanto riportato in letteratura[137].

(6R,12aR)-6-(1,3-Benzodiossol-5-il)-2,3,6,7,12,12a-esaidro-2-idrossipirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indol-1,4-dione
(N-Demetil-N-idrossi-tadalafil)

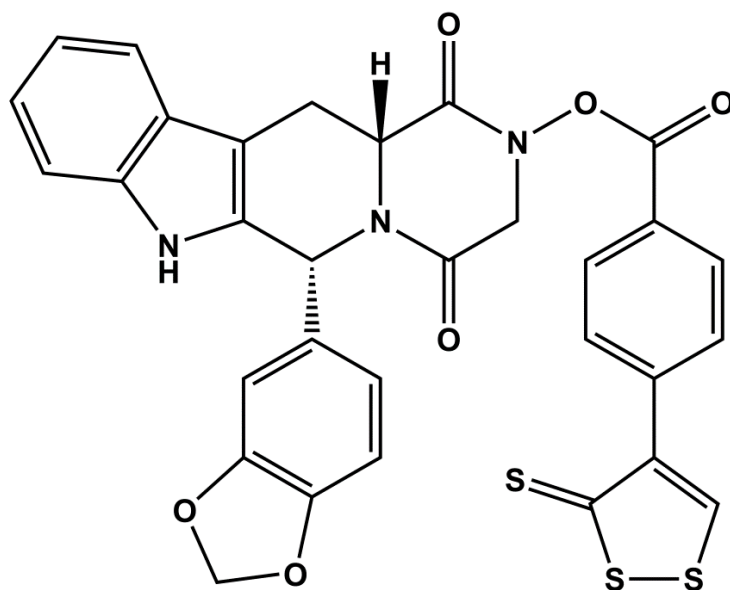


A una soluzione di 150 mg (0,35 mmoli) di (1R,3R)-1-(benzo[d][1,3]dio-5-il)-2-(2-cloroacetil)-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indolo-3-carbossilato di metile in 1 ml di THF anidro si aggiungono 49 mg (0,7 mmoli) di $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ e, mantenendo bene in agitazione, 0,15 ml di H_2O e 0,12 ml (0,7 mmoli) di diisopropiletilammina. La soluzione dei reagenti viene agitata a 45°C per 24 h, al termine delle quali si evapora il solvente e si riprende il residuo con etile acetato. La fase organica viene lavata in imbuto separatore con acqua e poi con una soluzione satura di NaCl , poi viene seccata su Na_2SO_4 anidro ed evaporata a secchezza.

Si ottengono 135 mg del prodotto desiderato come solido bianco (resa: 66 %).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): $\delta = 11.02$ (s, 1H); 8.88 (s, 1H); 7.52 (d, $J=7.3$ Hz, 1H); 7.28 (d, 7.9 Hz, 1H); 7.06-6.98 (m, 2H); 6.85 (s, 1H); 6.76 (s, 2H); 6.11 (s, 1H); 5.91 (s, 2H); 4.40-4.35 (dd, $J=4.27, 11.60$ Hz, 1H); 4.17 (d, $J=17.10$ Hz, 1H); 3.93 (d, $J=17.10$ Hz, 1H); 3.54-3.47 (dd, $J=4.60, 11.30$ Hz, 1H); 3.00-2.91 (dd, $J=4.60, 11.30$, 1H).

(6R,12aR)-6-(1,3-Benzodiossol-5-il)-3,4,6,7,12,12a-esaidro-1,4-diossopirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indol-2-il
4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzoato
(ACS74)



Ad una soluzione di 52 mg (0,2 mmol) di ACS48, 34 mg (0,22 mmol) di HOBT e 42 mg (0,22 mmol) di EDAC in 1 ml di DMF anidra, viene aggiunta una soluzione di 80 mg (0,2 mmol) di N-desmetil-N-idrossi-tadalafil in DMF anidra. La miscela dei reagenti viene agitata in atmosfera d'azoto a temperatura ambiente per 24h.

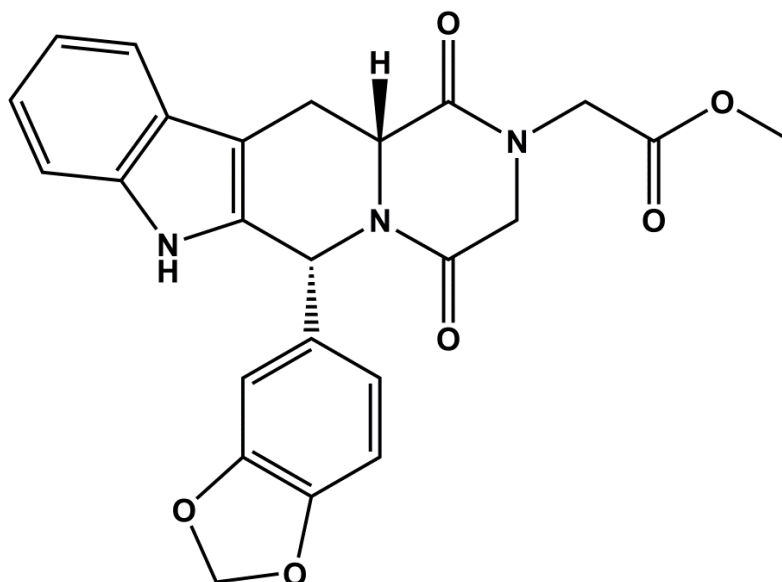
La reazione viene monitorata mediante TLC su SiO₂ (CH₂Cl₂/MeOH;95:5).

Dopo avere evaporato al rotavapor la DMF, si riprende il residuo con CH₂Cl₂ e si lava la fase organica in imbuto separatore con acqua e infine con bicarbonato di sodio.

Dalla fase organica seccata con Na₂SO₄, ed evaporata a secchezza, si ottengono 200 mg di prodotto grezzo che viene cromatografato su SiO₂, eluendo con CH₂Cl₂ e MeOH (99,5:0,5). Il prodotto recuperato dalla cromatografia viene lavato con etere etilico. Si ottengono 80 mg del composto desiderato come solido rosso-arancione (resa: 64%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ = 11.02 (s, 1H); 9.23 (s, 1H); 7.97 (d, $J=7.63$ Hz, 2H); 7.69 (d, $J=7.63$ Hz, 2H); 7.52 (d, $J=7.3$ Hz, 1H); 7.28 (d, 7.9 Hz, 1H); 7.06-6.98 (m, 2H); 6.85 (s, 1H); 6.76 (s, 2H); 6.11 (s, 1H); 5.91 (s, 2H); 4.40-4.35 (dd, $J=4.27, 11.60$ Hz, 1H); 4.17 (d, $J=17.10$ Hz, 1H); 3.93 (d, $J=17.10$ Hz, 1H); 3.54-3.47 (d, $J=4.60, 11.30$ Hz, 1H); 3.00-2.91 (dd, $J=4.60, 11.30$, 1H).

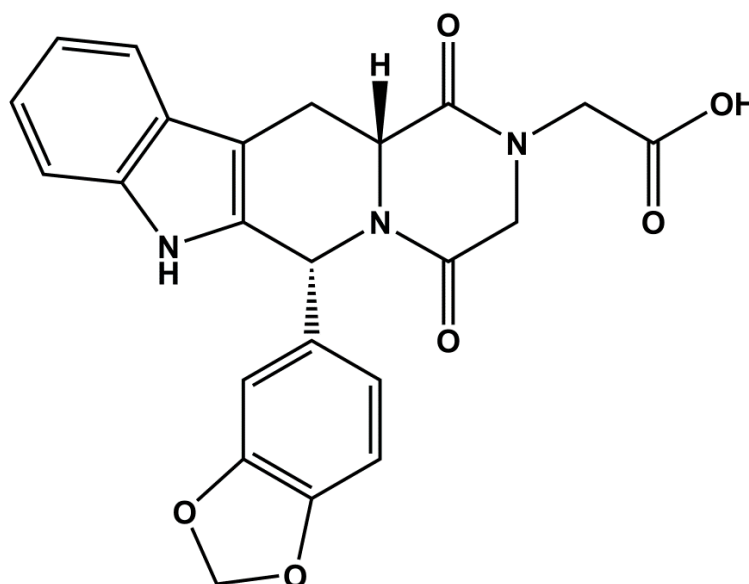
(6R,12aR)-6-(1,3-Benzodiossolo-5-il)-3,4,6,7,12,12a-esaidro-1,4-diossopirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indolo-2(1H)-acetato di metile
(N-Demetil-N-metossicarbonilmetil-tadalafil)



Ad una soluzione di 1 g (2,3 mmol) di (1R,3R)-1-(benzo[d][1,3]diossolo-5-il)-2-(2-cloroacetil)-2,3,4,9-tetraidro-1H-pirido[3,4-b]indolo-3-carbossilato di metile e 379 mg (3 mmol) di glicina metil estere cloridrato in 0,4 ml di DMF, si aggiungono 0,38 ml (2,5 mmol) di trietilammina. La miscela dei reagenti viene agitata in atmosfera di N₂ a 78°C per 4h al termine delle quali si elimina al rotavapor la DMF e si riprende il residuo con CH₂Cl₂. La fase organica viene lavata con acqua, seccata su Na₂SO₄ anidro ed evaporata a secchezza. Il grezzo viene cromatografato su SiO₂ con CH₂Cl₂ e MeOH (99,8:0,2). Si ottengono 575 mg di prodotto con p.f. 208-210°C (resa: 56%).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ= 11.02 (s, 1H); 7.52 (d, J=7.3 Hz, 1H); 7.28 (d, 7.9 Hz, 1H); 7.06-6.98 (m, 2H), 6.85 (s, 1H), 6.76 (s, 2H); 6.11 (s, 1H); 5.91 (s, 2H); 4.40-4.35 (dd, J=4.27, 11.60 Hz, 1H); 4.20-3.90 (m, 4H); 3.57-3.49 (m, 4H); 3.00-2.91 (dd, J=4.60, 11.30, 1H).

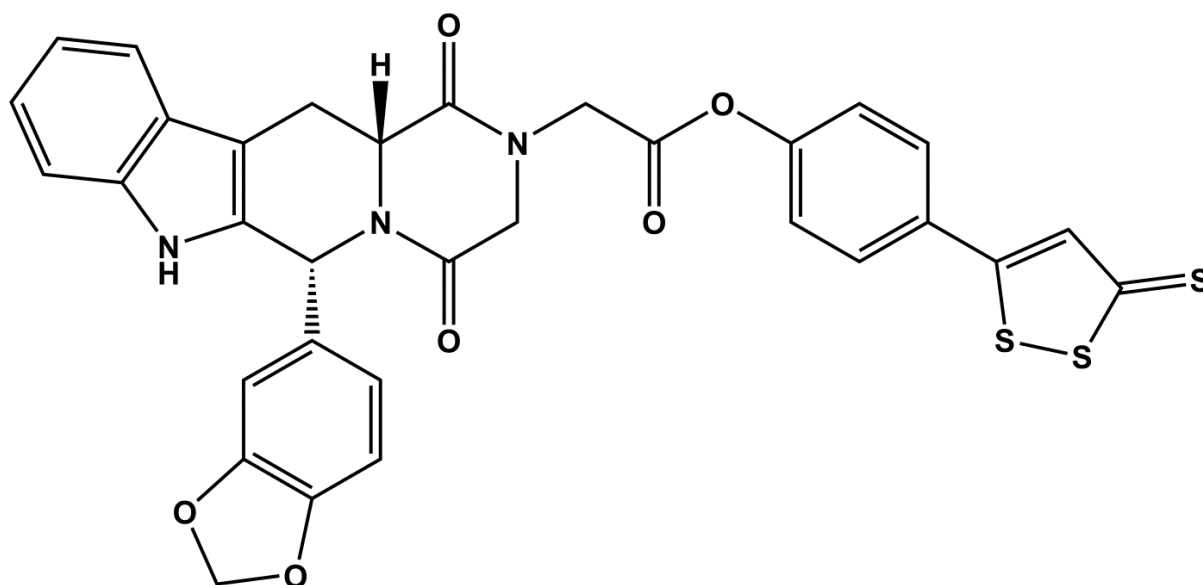
Acido (6R,12aR)-6-(1,3-benzodiossol-5-il)-3,4,6,7,12,12a-esaidro-1,4-diossopirazino[1',2':1,6]pirido[3,4-b]indol-2(1H)-acetico
(N-Demetil-N-idrossicarbonilmetil-tadalafil)



A 575 mg (1,33 mmoli) di N-desmetil-N-idrossicarbonilmetil-tadalafil si aggiungono 8,8 ml di NaOH 1N e 4,4 ml di MeOH. La reazione procede a 40°C sotto agitazione e.m. per 2h al termine delle quali si aggiunge HCl 1N fino a pH=3. Il precipitato formatosi viene raccolto per filtrazione e lavato con acqua. Si ottengono 485 mg del prodotto desiderato (resa: 87%).

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ= 11.02 (s, 1H); 7.52 (d, J=7.3 Hz, 1H); 7.28 (d, 7.9 Hz, 1H); 7.06-6.98 (m, 2H); 6.85 (s, 1H); 6.76 (s, 2H); 6.11 (s, 1H); 5.91 (s, 2H); 4.40-4.35 (dd, J=4.27, 11.60 Hz, 1H); 4.20-3.90 (m, 4H); 3.57-3.49 (dd, J=4.60, 11.30, 1H); 3.00-2.91 (dd, J=4.60, 11.30, 1H).

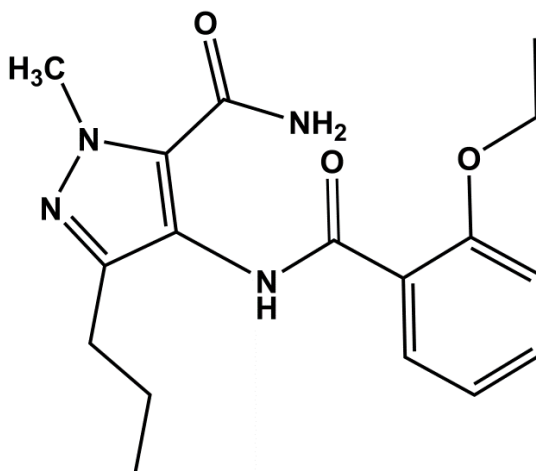
4-(3-Tiosso-3H-1,2-ditioil-5-il)fenil (6R,12aR)-6-(1,3-benzodiossol-5-il)-
3,4,6,7,12,12a-esaidro-1,4-diossopirazino[1',2':1,6]pirido
[3,4-b]indol-2(1H)-acetato
(ACS76)



Ad una sospensione di 480 mg (1,10 mmoli) di N-desmetil-N-idrossicarbonilmetiltadalafil, 269 mg (1,18 mmoli) di ADTOH e DMAP catalitico (13 mg) in 10 ml di CHCl_3 , vengono aggiunti 232 mg (1,21 mmoli) di EDAC. La miscela di reagenti viene agitata a temperatura ambiente per 4 h in atmosfera d'azoto. La soluzione viene diluita con CH_2Cl_2 e lavata in successione con H_2O , bicarbonato di sodio, NaOH e ancora H_2O . La fase organica viene seccata su Na_2SO_4 anidro ed evaporata a secchezza. Il residuo grezzo viene cromatografato su colonna di SiO_2 usando cicloesano/etile acetato (1:1) come miscela eluente. Il prodotto recuperato, dopo lavaggio su filtro con etere etilico (400 mg), si presenta come solido rosso-arancione (resa 57%) con p.f.(166)-182°C con decomposizione.

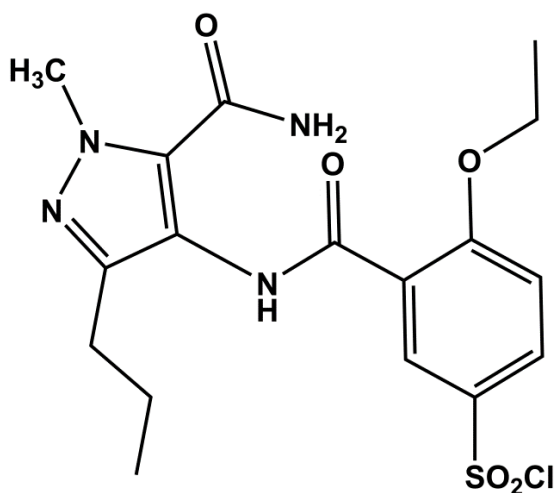
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ = 11.02 (s, 1H); 7.84 (d, 2H, J = 8.50 Hz); 7.74 (s, 1H); 7.52 (d, J=7.3 Hz, 1H); 7.28 (d, J=7.9 Hz, 1H); 7.12 (d, 2H, J=8.20 Hz); 7.06-6.98 (2H, m); 6.85 (s, 1H); 6.76 (s, 2H); 6.11 (s, 1H); 5.91 (s, 2H); 4.40-4.35 (dd, J=4.27, 11.60 Hz, 1H); 4.20-3.90 (m, 4H); 3.57-3.49 (dd, J=4.60, 11.30, 1H); 3.00-2.91 (dd, J=4.60, 11.30, 1H).

4-(2-Etossibenzamido)-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-carbossamide



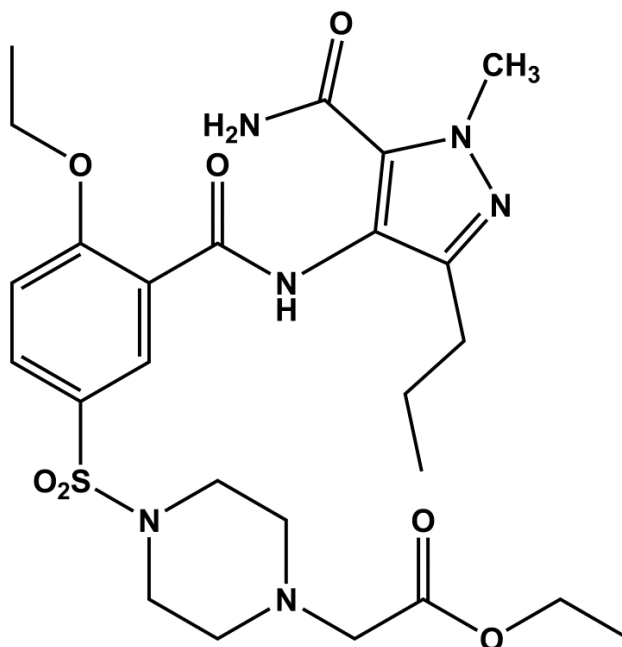
Ad una soluzione di 1,5 g (8,2 mmoli) di 4-ammino-1-metil-3-n-propil-pirazolo-5-carbossammide, 0,01 g (0,082 mmoli) di DMAP e 1,67 g (16,5 mmoli) di trietilammina in 25 ml di CH_2Cl_2 , in atmosfera di azoto, a 0°C e sotto agitazione e.m., viene fatta gocciolare una soluzione di 3,05 g (16,5 mmoli) di 2-etossibenzoil cloruro in 25 ml di CH_2Cl_2 (passato su allumina basica). La miscela risultante viene lasciata tornare a temperatura ambiente e agitata ulteriormente per 2 ore. Durante il gocciolamento si osserva un cambiamento di colore della soluzione che da incolore diviene rosa pallido. Al termine delle due ore si nota la formazione di un precipitato rosa pallido. L'andamento della reazione viene seguito tramite TLC su SiO_2 (miscela eluente CH_2Cl_2 e metanolo in rapporto 10:0,3). Dopo evaporazione del solvente a pressione ridotta, il residuo grezzo viene disciolto in 125 ml di una miscela di CH_2Cl_2 e metanolo (19:1) e la soluzione ottenuta viene dibattuta prima con HCl 1 N (50 ml) e poi con H_2O (25 ml). Dalla fase organica, seccata su Na_2SO_4 anidro ed evaporata a secchezza, si ottengono 4,2 g di prodotto che viene cromatografato su SiO_2 , utilizzando come eluente CH_2Cl_2 contenente concentrazioni crescenti di metanolo (fino ad un rapporto 97:3). Dalla cromatografia si ottengono 1,5 g di cristalli di 4-(2-etossibenzamido)-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-carbossamide (p.f. $154\text{-}155^\circ\text{C}$) con una resa del 55,4 %.

**4-(5-Clorosolfonil-2-etossibenzamido)-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-
carbossamide**



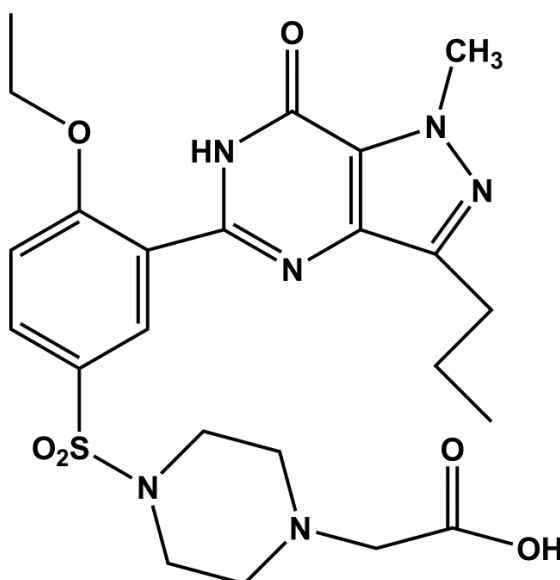
A 1,7 ml (25 mmoli) di acido clorosolfonico, raffreddato in un bagno di ghiaccio e sotto atmosfera di azoto, vengono aggiunti a porzioni 0,850 g (2,57 mmoli) di 4-(2-etossibenzamido)-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-carbossamide. Al termine delle aggiunte la miscela di reazione viene portata a temperatura ambiente e mantenuta in agitazione per 2 ore. La soluzione viene quindi fatta gocciolare in una miscela di CHCl_3 (30 ml) e acqua (6,1 ml) raffreddata a 0°C e in continua agitazione. La fase organica viene separata, mentre quella acquosa viene estratta con CHCl_3 (3 x 10 ml). Gli estratti organici vengono riuniti, seccati su Na_2SO_4 anidro ed evaporati a secchezza. Si ottiene un solido bianco che, dopo lavaggio con abbondante etere di petrolio, pesa 0,893 g (resa 80,8%) ed ha p.f. $162-163^\circ\text{C}$.

4-{2-Etossi-5-[(4-etossicarbonilmetilpiperazin-1-il)sulfonil]benzamido}-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-carbossamide



Una soluzione costituita da 0,890 g (2,07 mmoli) di 4-(5-clorosulfonil-2-etossibenzamido)-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-carbossamide, 0,455 g (2,49 mmoli) di 1-(etossicarbonilmetil)-piperazina e 0,87 ml (6,24 mmoli) di trietilammina in 30 ml di etanolo anidro viene agitata sotto atmosfera di azoto per 2 ore, al termine delle quali il solvente viene evaporato a pressione ridotta. Il residuo solido risultante viene cromatografato su SiO₂, utilizzando come eluente CH₂Cl₂, la cui polarità viene aumentata progressivamente con metanolo fino ad un rapporto di 98:2. Dopo lavaggio con etere etilico del prodotto cromatografato, si ottengono 980 mg di cristalli di 4-{2-etossi-5-[(4-etossicarbonilmetilpiperazin-1-il)sulfonil]benzamido}-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-carbossamide con p.f. 175,5-176,5°C (resa: 83,7%).

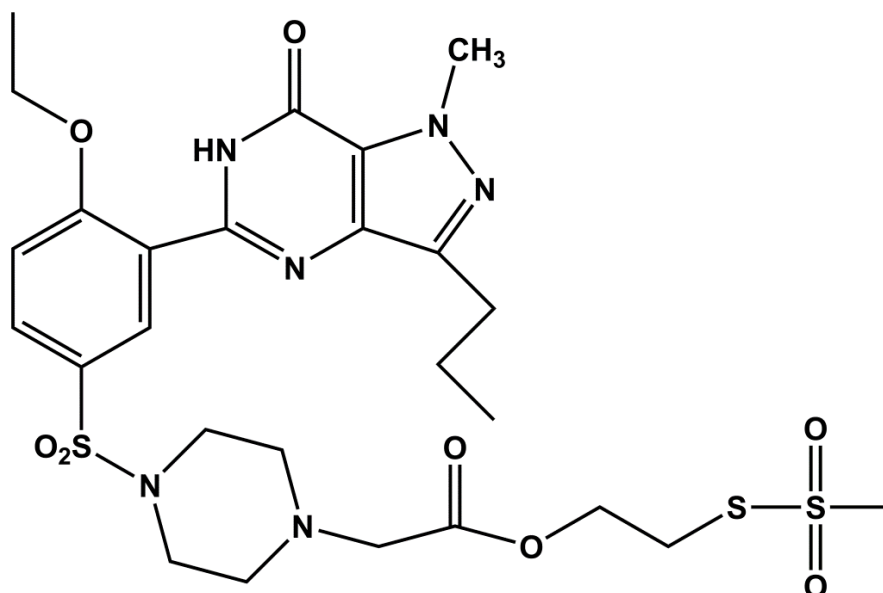
5-{[2-Etossi-5-[(4-idrossicarbonilmetil)piperazin-1-il]sulfonil]fenil}-1-metil-3-n-propil-1,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one
(N-demetil-N-idrossicarbonilmetil-sildenafil; DIMS)



Una sospensione di 860 mg (1,52 mmoli) di 4-{2-etossi-5-[(4-etossicarbonilmetilpiperazin-1-il)sulfonil]benzamido}-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-carbossamide in 11 ml di NaOH 1 N e 5,5 ml di etanolo viene scaldata, a 90°C, in atmosfera di azoto e sotto agitazione e.m., per 17 ore. L'andamento della reazione viene controllato mediante TLC su SiO₂, utilizzando CH₂Cl₂ e metanolo in rapporto 80:20 come miscela eluente. Al termine delle 17 ore si lascia raffreddare e si evapora l'etanolo sotto pressione ridotta. La soluzione acquosa risultante viene acidificata con HCl 2 N fino a raggiungere pH 2-3. In queste condizioni si forma abbondante precipitato bianco, che viene recuperato su filtro e lavato con acqua ed etere etilico in successione. Si ottengono così 617 mg di cristalli di N-demetil-N-idrossicarbonilmetil-sildenafil (**DIMS**) con p.f. 208-212°C (resa 78 %). Dopo ricristallizzazione da una miscela di CHCl₃-etere il prodotto fonde a 211-213°C.

¹H-NMR (DMSO d₆): δ= 12.20 (s, 1H, scambia con D₂O); 7.80 (m, 2H); 7.39 (d, J=7.50 Hz, 1H); 4.15-4.20 (q, J=8.00 Hz, 2H); 4.15 (s, 3H); 3.10 (s, 2H); 2.82 (s, 4H); 2.70-2.80 (t, J=7.10 Hz, 2H); 2.55 (s, 4H); 1.70-1.80 (m, 2H); 1.25-1.30 (t, J=8.00 Hz, 3H); 0.90-0.95 (t, J=7.10 Hz, 3H).

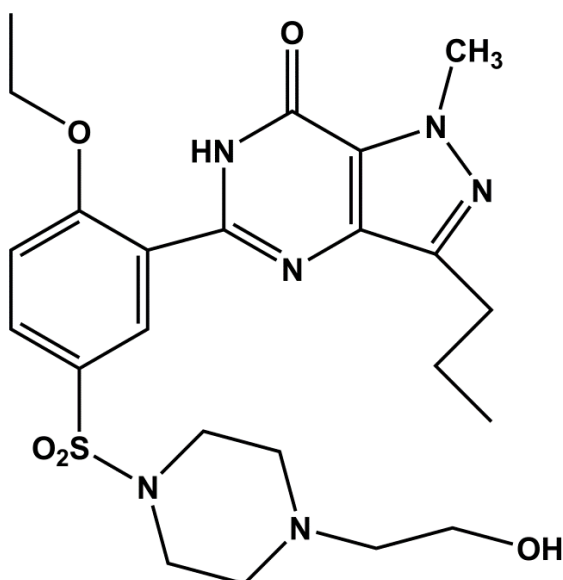
2-[(Metilsulfonyl)tio]etil 4-[[3-(6,7-diidro-1-metil-7-osso-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-4-etossifenil]sulfonil]-1-piperazinoacetato
(ACS29)



Ad una sospensione di N-demetil-N-idrossicarbonilmetil-sildenafil (340 mg; 0,655 mmol), ACS 26 (102,4 mg; 0,655 mmol), 5 mg di DMAP in CH₂Cl₂ (30 ml passati su allumina basica) viene aggiunta una soluzione diclorometanica 1N di DCC (0,72 ml; 0,72 mmol). La miscela di reazione viene mantenuta a temperatura ambiente, in atmosfera d'azoto e sotto agitazione e.m. per 2,5 h controllando l'andamento della reazione tramite TLC su SiO₂, (etile acetato/metanolo 97:3 come eluente). Successivamente si elimina per filtrazione la DCU formatasi, mentre il filtrato viene lavato con una soluzione satura di NaHCO₃ e acqua (entrambe ben fredde). La fase organica viene seccata su sodio solfato anidro ed evaporata a secchezza. Il residuo grezzo (490 mg) viene cromatografato su SiO₂, utilizzando etile acetato come eluente la cui polarità viene aumentata progressivamente con metanolo fino a raggiungere il 2%. Il prodotto recuperato viene lavato su filtro con abbondante etere ed etanolo. Si ottengono 284 mg di sostanza dall'aspetto bianco polveroso con p.f. 118-120°C (resa 66,8%).

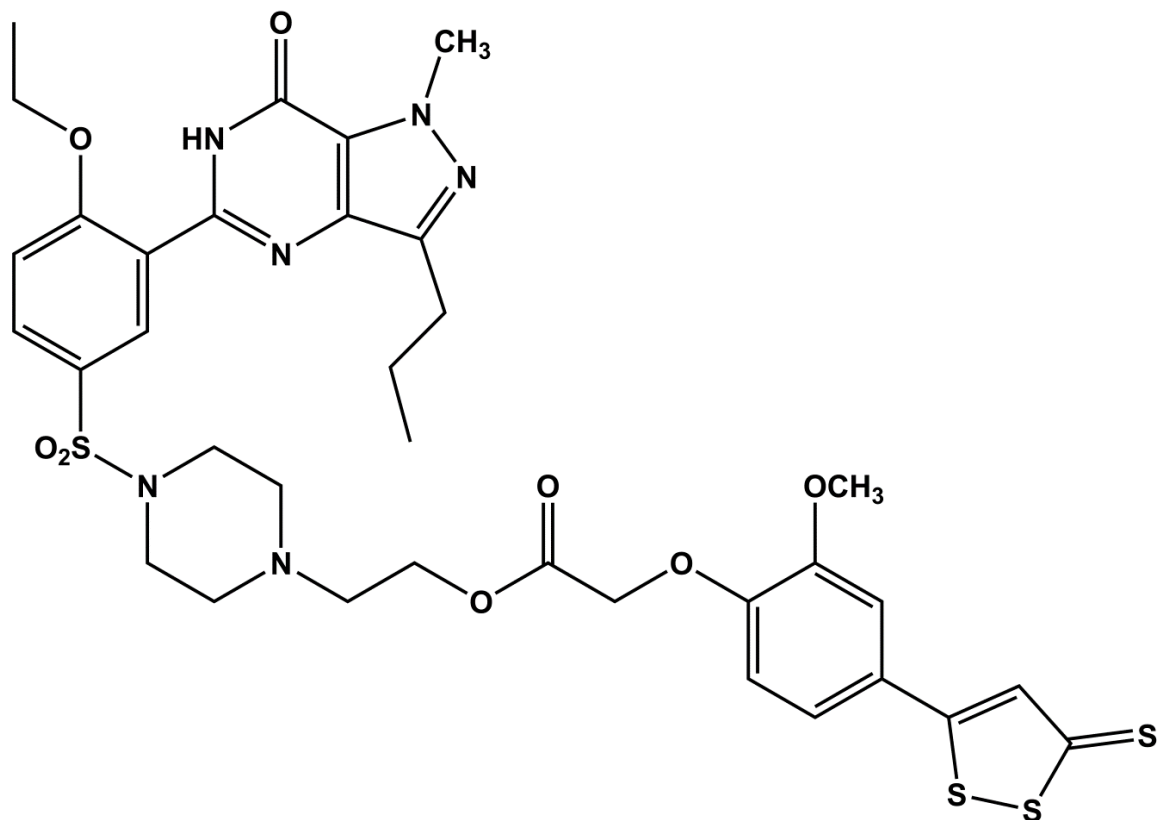
¹H-N.M.R. (DMSO d₆): δ= 12.20 (s, 1 H, scambia con D₂O); 7.80 (m, 2H); 7.39 (d, J=7.50 Hz, 1H); 4.60 (t, J=7.10 Hz, 2H); 4.15-4.20 (q, J=8.00 Hz, 2H); 4.15 (s, 3 H); 3.50 (t, J=7.10 Hz, 2H); 3.40 (s, 3H); 3.10 (s, 2 H); 2.82 (s, 4 H); 2.70-2.80 (t, J=7.10 Hz, 2H); 2.55 (s, 4H); 1.70-1.80 (m, 2H); 1.25-1.30 (t, J=8.00 Hz, 3H); 0.90-0.95 (t, J=7.10 Hz, 3H).

**5-[2-Etossi-5-[4-idrossietil]piperazin-1-il]sulfonil]fenil}-1-metil-3-n-propil-
1,6-diidro-7H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-one**
(N-Demetil-N-idrossietil-Sildenafil; DIES)



Una soluzione costituita da 0,890 g (2,07 mmoli) di 4-(5-clorosulfonil-2-etossibenzamido)-1-metil-3-n-propilpirazolo-5-carbossamide, 0,325 g (2,50 mmoli) di 1-(idrossietil)-piperazina e 0,87 ml (6,24 mmoli) di trietilammina in 30 ml di etanolo anidro viene agitata, sotto atmosfera di azoto, per 2 ore, al termine delle quali il solvente viene evaporato a pressione ridotta. Il residuo solido risultante viene cromatografato su SiO₂, utilizzando come eluente CH₂Cl₂, la cui polarità viene aumentata progressivamente con metanolo fino ad un rapporto di 97:3. Il prodotto recuperato (900 mg) viene sospeso in etanolo (5 ml) e una soluzione 1N di NaOH (10 ml). La sospensione viene agitata a 90°C per 17 h. L'andamento della reazione viene controllato mediante TLC su SiO₂, utilizzando CH₂Cl₂ e metanolo in rapporto 9:1 come miscela eluente. Al termine delle 17 ore si lascia raffreddare e si evapora l'etanolo sotto pressione ridotta. La soluzione acquosa risultante viene acidificata con HCl 2 N fino a raggiungere pH 2-3 ed estratta con diclorometano; la fase organica viene seccata su Na₂SO₄ anidro ed evaporata a secchezza. Si ottengono 730 mg di prodotto desiderato come solido bianco (resa: 70%).

2-(4-(4-Etossi-3-(1-metil-7-osso-3-propil-6,7-diidro-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)fenilsulfonil)piperazin-1-il)etil 2-(2-metossi-4-(3-tiosso-3H-1,2-ditio-5-il)fenossi)acetato (ACS93)

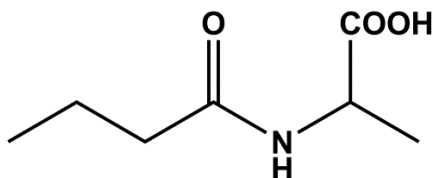


Ad una sospensione di N-demetil-N-idrossetil-sildenafil (340 mg; 0,673 mmoli), ACS 50 (211 mg; 0,673 mmoli), 5 mg di DMAP in CH₂Cl₂ (30 ml passati su allumina basica) viene aggiunta una soluzione diclorometanica 1N di DCC (148,5 mg; 0,72 mmol). La miscela di reazione viene mantenuta a temperatura ambiente, in atmosfera d'azoto e sotto agitazione e.m. (TLC di controllo su SiO₂, diclorometano/metanolo 95:5 come eluente) per 2,5 h. Successivamente si elimina per filtrazione la DCU formatasi mentre il filtrato viene lavato con una soluzione satura di NaHCO₃ e acqua (entrambe ben fredde). La fase organica viene seccata su sodio solfato anidro ed evaporata a secchezza. Il residuo grezzo (500 mg) viene cromatografato su SiO₂ utilizzando come eluente diclorometano la cui polarità viene aumentata progressivamente con metanolo fino a raggiungere il 5%.

Il prodotto recuperato viene lavato su filtro con abbondante etere ed etanolo. Si ottengono 253 mg di sostanza dall'aspetto giallo-arancio con p.f. 172-175°C (resa: 47%).

¹H-N.M.R. (DMSO d₆): δ = 12.20 (s, 1H, scambia con D₂O); 7.86 (s, 1H); 7.80 (m, 2H); 7.45-7.37 (m, 3H); 6.77 (d, *J* = 8.21 Hz, 1H); 4.78 (s, 2H); 4.60 (t, *J*=7.10 Hz, 2H); 4.15-4.20 (q, *J*=8.00 Hz, 2H); 4.15 (s, 3 H); 3.86 (s, 3H); 3.50 (t, *J*=7.10 Hz, 2H); 2.82 (s, 4 H); 2.70-2.80 (t, *J*=7.10 Hz, 2H); 2.55 (s, 4H); 1.70-1.80 (m, 2H); 1.25-1.30 (t, *J*=8.00 Hz, 3 H); 0.90-0.95 (t, *J*=7.10 Hz, 3H).

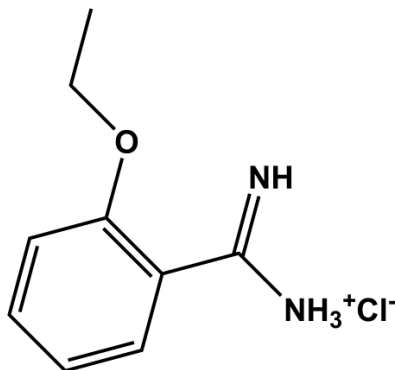
Acido 2-butirilaminopropionico



Si sciolgono 4,06 g di DL-alanina in 3 eq. di NaOH 4N (34,2 ml). Si aggiungono lentamente e mantenendo in agitazione e a freddo, 1,1 eq. di butirrilcloruro. Al termine del gocciolamento si toglie il bagno di ghiaccio e si porta a pH 1,5 con HCl conc. Si estrae con etile acetato e le fasi organiche, essiccate su Na₂SO₄ anidro, sono evaporate a secchezza. Si ottiene un olio giallino che per trattamento con etere di petrolio cristallizza. Dopo lavaggio con etere e ricristallizzazione con acetato di etile ed etere di petrolio si ottengono 7 g di prodotto (resa: 48,5%).

¹H-NMR conforme a quello riportato in letteratura[136].

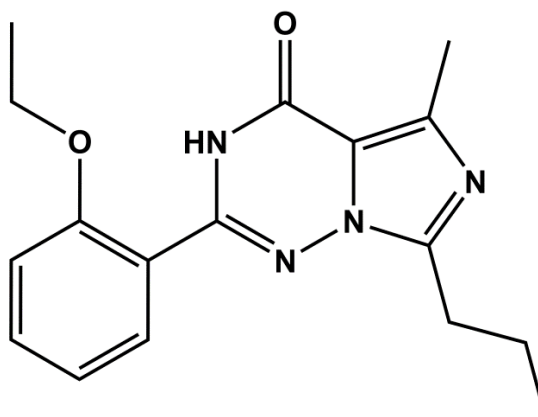
2-Etossibenzamidina cloridrato



In un pallone da 100 ml si introducono 1,26 g di NH_4Cl (23,52 mmoli) e si sospendono in 16 ml di toluene anidro sotto atmosfera di argon. La miscela viene raffreddata in bagno di ghiaccio e si aggiungono goccia a goccia 12 ml di $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$ 2N in toluene e si lascia sotto agitazione per 30' a temperatura ambiente. Si aggiungono poi 1g di 2-etossibenzonitrile e si lascia andare la reazione sotto agitazione e a riflusso per 9 ore. Si aggiungono al pallone di reazione 0,8g di silice e 8 ml di metanolo per eliminare l'eccesso di $\text{Al}(\text{CH}_3)_3$. Si diluisce la sospensione con 8 ml di diclorometano e si filtra il solido ottenuto, lavando ripetutamente con metanolo. La soluzione filtrata viene acidificata con HCl concentrato ed evaporata a secchezza. Il residuo solido ottenuto viene ripreso con 12 ml di una miscela diclorometano:metanolo (9:1) e dopo filtrazione, la soluzione viene evaporata a secchezza. Dopo lavaggio con etere del nuovo residuo si ottenengono 1,150 g del prodotto desiderato (resa: 84%).

$^1\text{H-NMR}$ conforme a quello riportato in letteratura[136].

2-(2-Etossifenil)-5-metil-7-propil-1,4-diidroimidazo
[1,5-f][1,2,4]triazinone

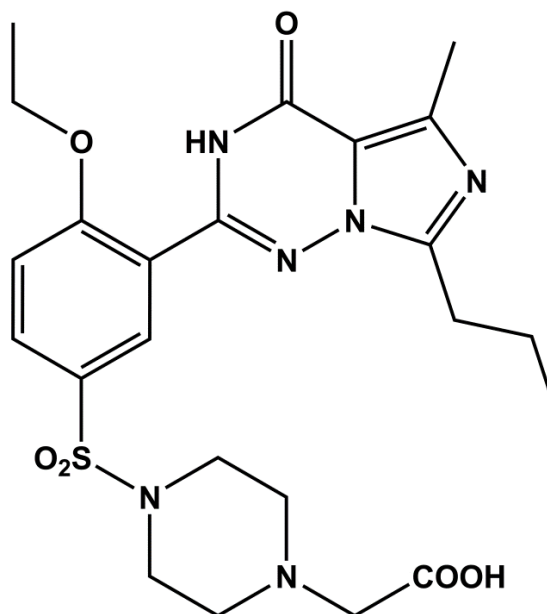


In un pallone da 25 ml si introducono acido 2-butirrilaminopropionico (633 mg, 3,98 mmoli), dimetilaminopiridina (DMAP, 16 mg) e piridina (1 ml) in 2,7 ml di THF. Si scalda a riflusso per 2h al termine delle quali si fanno gocciolare 0,88 ml (7,87 mmoli) di etil cloroossalato. Al termine del gocciolamento si raffredda, si aggiunge acqua ghiacciata e si estrae l'enolestere con acetato di etile.

A parte, in un pallone raffreddato in un bagno di ghiaccio si introducono 800 mg di 2-etossibenzamidina cloridrato (preparata precedentemente), 3,2 ml di metanolo e 0,19 ml di idrazina idrata. Si aggiunge l'enolestere, precedentemente preparato, in 0,5 ml di metanolo, e si lascia reagire a riflusso per 4 ore. Si ottiene, senza isolarlo, il 1,2,4-triazin-5(4H)one.

In un pallone da 50 ml si introducono 3,98 mmoli di 1,2,4-triazin-5(4H)one in 6 ml di acido acetico e poi 0,34 ml di POCl_3 e si riscalda a 110°C per 2 ore. Si rimuove a pressione ridotta l'acido acetico e si aggiungono cloruro di metilene e acqua, portando il pH a 7 con NaOH 2N. Si estrae con cloruro di metilene, si secca la fase organica su Na_2SO_4 , si filtra e si evapora a secchezza. Si ottiene un olio rosso arancio che per aggiunta di acetone cristallizza. Il prodotto, raccolto su filtro e lavato con acetone freddo, pesa 220 mg (resa: 18%). $^1\text{H-NMR}$ conforme a quello riportato in letteratura [136].

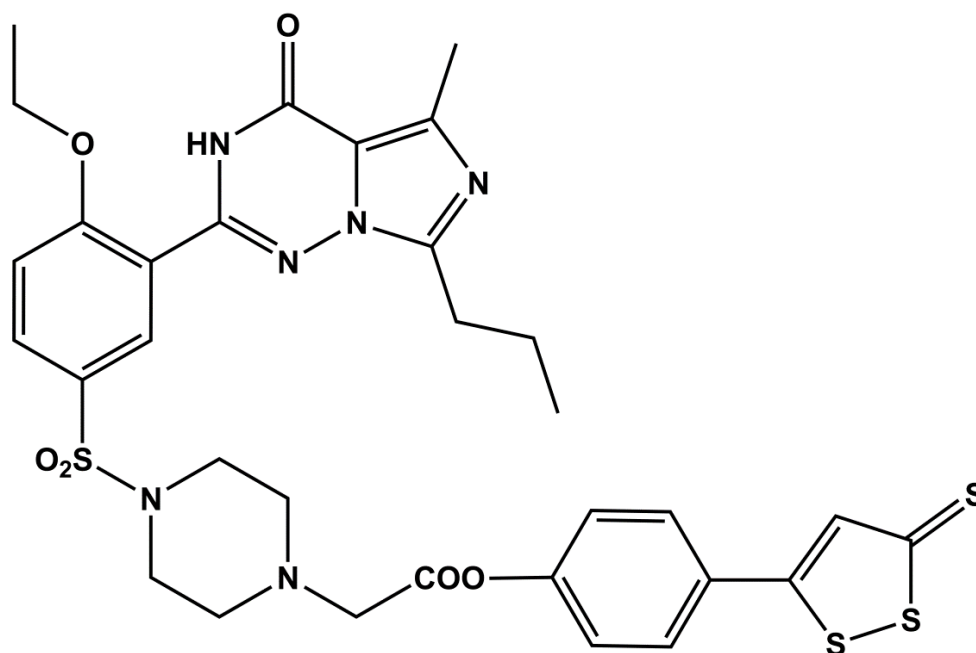
Acido 2-(4-(4-etossi-3-(5-metil-4-osso-7-propil-1,4-diidroimidazo[1,5-f][1,2,4]triazin-2-il)fenilsulfonil)piperazin-1-il)acetico (ACS65)



Ad una soluzione fredda di 2-(2-etossifenil)-5-metil-7-propil-1,4-diidroimidazo[1,5f][1,2,4]triazinone (210 mg, 0,67 mmoli) in 2 ml di diclorometano si aggiungono 0,5 ml (2,4 mmoli) di acido clorosolfonico. La miscela di reazione viene portata a temperatura ambiente e lasciata sotto agitazione, in atmosfera d'azoto, per 3 ore. Dopo aggiunta di acqua fredda, la fase organica viene separata, seccata su Na_2SO_4 anidro ed evaporata a secchezza. Si ottengono 200 mg di derivato clorosolfonico (resa: 83%). A 195 mg (0,54 mmoli) di tale prodotto sciolti in 4 ml di diclorometano si aggiungono 0,08 ml di trietilammina (1 eq) e successivamente 0,09 ml di 1-etossicarbonilmetilpiperazina (1 eq.) La miscela di reazione viene agitata per 3 ore a temperatura ambiente, in atmosfera d'azoto. Al termine della reazione, si lava la fase organica con acqua fredda, si essicca su Na_2SO_4 anidro e si evapora a secchezza. Il prodotto grezzo viene purificato su colonna (gel di silice) eluendo con diclorometano:metanolo (0,5-1%).

Si recuperano 210 mg (0,48 mmoli) di prodotto (resa: 90%) che vengono idrolizzati per riscaldamento a 90°C, per 2 ore, in 2,9 ml di NaOH 1N e 1,5 ml di etanolo riscaldando. Al termine della reazione, si evapora l'etanolo, si acidifica la fase acquosa con HCl 2N fino a pH 2-3 e si estrae con una miscela di cloroformio/metanolo (9:1), ottenendo 150 mg di prodotto solido bianco (resa: 60%) che, dopo lavaggio con etere, fonde a 222-224°C.

4-(3-Tiosso-3H-1,2-ditiol-5-il)fenil 4-[[3-(1,4-diidro-5-metil-4-osso-7-propilimidazo[5,1-f][1,2,4]triazin-2-il)-4-etossifenil]sulfonil]-1-piperazineacetato (ACS64)



Ad una soluzione di 142 mg (0,274 mmoli) di acido 2-(4-(4-etossi-3-(5-metil-4-osso-7-propil-1,4-diidroimidazo[1,5-f][1,2,4]triazin-2-il)fenilsulfonil)piperazin-1-il)acetico, 62 mg (1 eq) di 5-(4-idrossifenil)-1,2-ditiol-3-tione e 7 mg di DMAP in 15 ml di CH₂Cl₂ (passato su allumina basica), vengono aggiunti 1,5 ml di una soluzione diclorometanica (71,8 mg; 1,2 eq) di dicicloesilcarbodiimmide. La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione e.m., a temperatura ambiente, per 3 ore. L'andamento della reazione è seguito tramite TLC su SiO₂, utilizzando CH₂Cl₂ e metanolo in rapporto 10:0,3 come eluente. Al termine, la dicicloesilurea formatasi viene eliminata per filtrazione, mentre la soluzione organica viene trasferita in un imbuto separatore e dibattuta prima con 5 ml di NaOH 0,1 N (a 0°C) e poi con H₂O ghiacciata (2 x 5 ml).

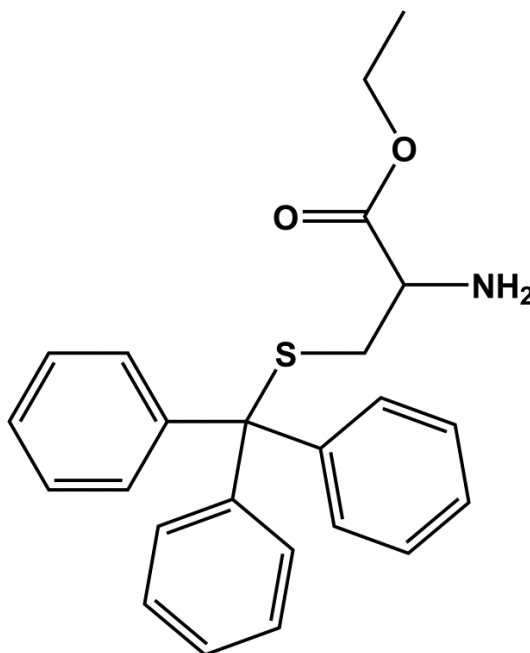
Dalla soluzione, seccata su Na₂SO₄ anidro ed evaporata a secchezza, si ottiene un residuo solido arancione che viene cromatografato su SiO₂, utilizzando come

eluente prima CH₂Cl₂ e poi CH₂Cl₂-metanolo (99 : 1). Il prodotto recuperato viene quindi lavato su filtro in successione con etere etilico (3 volte), etanolo (3 volte) ed ancora etere etilico (2 volte). Si ottengono 90 mg di ACS64 (resa 45%) con p.f. 165-168°C.

¹H-N.M.R. (CDCl₃): δ= 10.81 (s, 1H, scambia con D₂O); 8.81 (s, 1H); 7.81 (d, J=7.50 Hz, 1H); 7.68 (d, J=8.20 Hz, 2H); 7.40 (s, 1H); 7.15-7.25 (m, 3H); 4.35-4.45 (q, J=7.90 Hz, 2H); 3.51 (s, 2H); 3,2 (s, 4H); 2.90-3.00 (t, J=7.10 Hz, 2H); 2.80 (s, 4H); 2.54 (s, 3H) 1.81-1.92 (m, 2H); 1.63 (t, J=7.90 Hz, 3H); 0.95-1.05 (t, J=7.10 Hz, 3H).

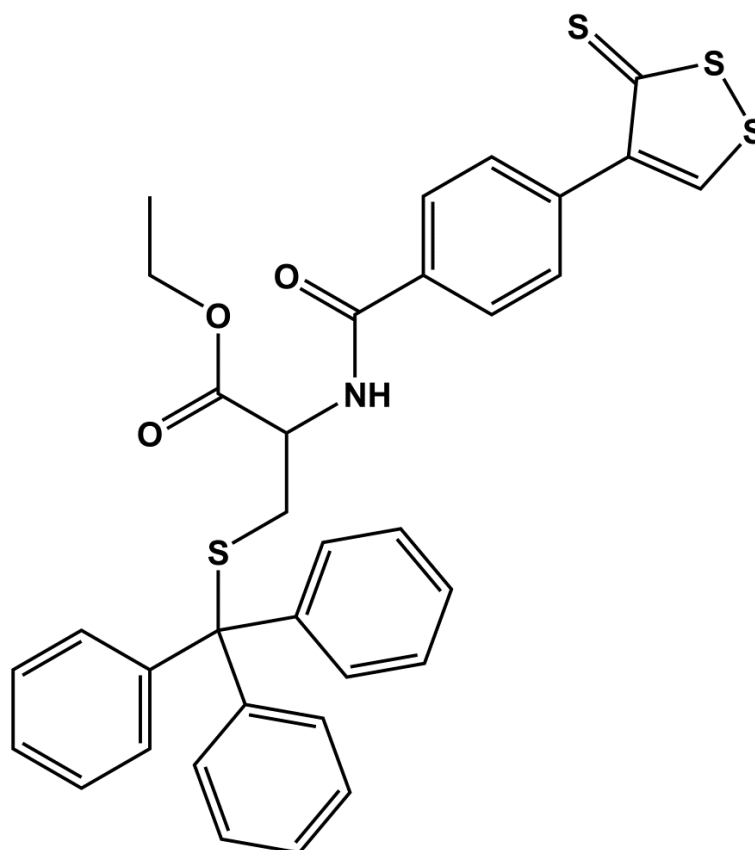
IBRIDI DI DERIVATI DELLA CISTEINA

(S)-Tritil-L-cisteina etil estere



Una sospensione di (S)-tritol-L-cisteina (1g; 2,75 mmoli) e di p-toluensolfonato di etile (1,101 g; 5,5 mmoli) in 50 ml di etanolo viene scaldata a riflusso in atmosfera di azoto. La solubilizzazione della sospensione avviene molto lentamente (24h circa). Dopo 48h l'etanolo viene evaporato, il residuo viene ripreso con 100 ml di diclorometano e lavato con una soluzione satura di NaHCO₃ (2x30 ml). La fase organica viene seccata su Na₂SO₄ anidro e portata a secchezza. Il residuo grezzo viene poi cromatografato su SiO₂, eluendo con una miscela CH₂Cl₂/MeOH (98:2). Dalla cromatografia si recuperano 625 mg di estere (resa: 58%) [12].

2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditioil-4-il)benzamido)-3-(trilitio)propanoato d'etile

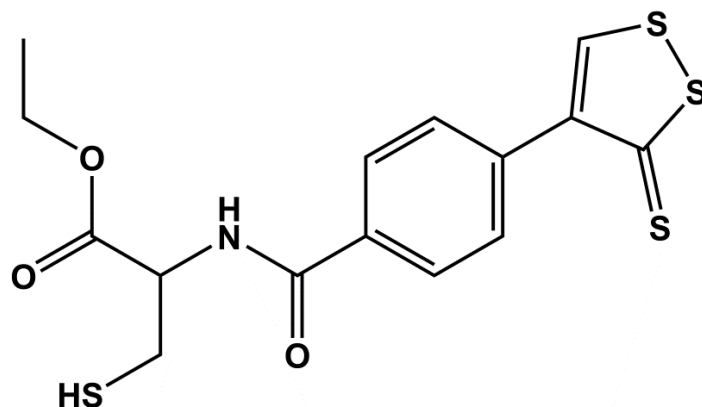


Ad una soluzione di ACS 48 (407 mg; 1,60 mmoli), HOBt (294 mg; 1,92 mmoli) ed EDAC (368 mg; 1,92 mmoli) in 3 ml di DMF anidra viene aggiunta lentamente una soluzione di (S)-tritol-L-cisteina etilestere (625 mg; 1,60 mmoli) e 0,2 ml di TEA in 7 ml di DMF anidra. La reazione viene agitata per 4h a t. ambiente e in atmosfera d'azoto. Si controlla l'andamento della reazione mediante TLC su SiO₂, utilizzando CH₂Cl₂/MeOH (98:2) come eluente. Dopo 4h si evapora completamente a pressione ridotta la DMF e il grezzo viene ripreso con CH₂Cl₂. La fase organica viene lavata con acqua, seccata su Na₂SO₄ anidro e portata a secchezza. Il residuo grezzo viene infine cromatografato su SiO₂, eluendo solo con CH₂Cl₂. Si recuperano 659 mg di prodotto (resa: 66%; P.f.= 86-93°C) che verranno utilizzati nella reazione successiva senza ulteriore purificazione.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ= 9.22 (s,1H); 8.96 (d, J=7.91Hz, 1H); 7.90 (d, J=8.50Hz, 2H); 7.68 (d, J=8.50Hz, 2H); 7.35-7.22 (m, 15H); 4.25-4.17 (m, 1H); 4.02-3.95 (q, J=6.45Hz, 2H); 3.31 (s, 1H); 2.83-2.71 (q, J=12.90Hz, 1H); 1.09-1.04 (t, J=7.04Hz, 3H).

3-Mercapto-2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzamido)propanoato d'etile

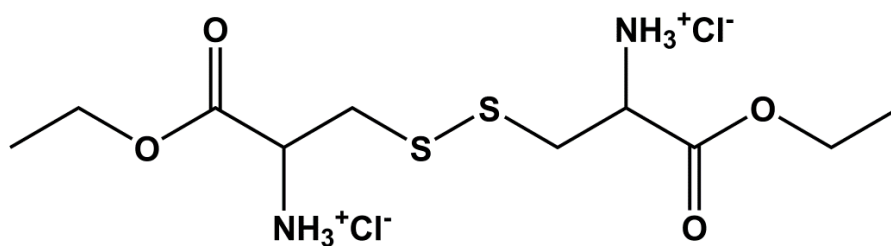
(ACS 94)



Ad una soluzione raffreddata a 0°C di 2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzamido)-3-(trilitio)propanoato di etile (240mg; 0,38 mmoli) in 10 ml di HCl 4N in diossano si aggiunge 1ml di H₂O (con funzione di scavenger). La miscela di reazione viene tenuta a 0°C controllando l'andamento della reazione mediante TLC su SiO₂ utilizzando una miscela di CH₂Cl₂/MeOH (98:2) come eluente. Dopo 30 minuti si evapora a secchezza il solvente. Il residuo grezzo, dopo essere stato ripreso più volte con etere, che viene successivamente fatto evaporare a pressione ridotta per favorire la completa eliminazione di HCl e diossano, viene portato su filtro e lavato con CH₂Cl₂ (2 volte) ed etere etilico (2 volte). Si ottengono 117 mg di prodotto deproteetto, ACS94 (resa: 80%), con p.f.=109-111° C.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ= 9.22 (s, 1H); 8.84 (d, *J* = 7.63 Hz, 1H); 7.93 (d, *J* = 8.21 Hz, 2H); 7.68 (d, *J* = 8.21 Hz, 2H) 4.56-4.50 (m,1H); 4.11 (q, *J* = 7.03 Hz, 2H); 2.99-2.83 (m,1H); 2.68 (t, *J* = 7.92 Hz, 1H); 1.18 (t, *J* = 7.03 Hz, 3H).

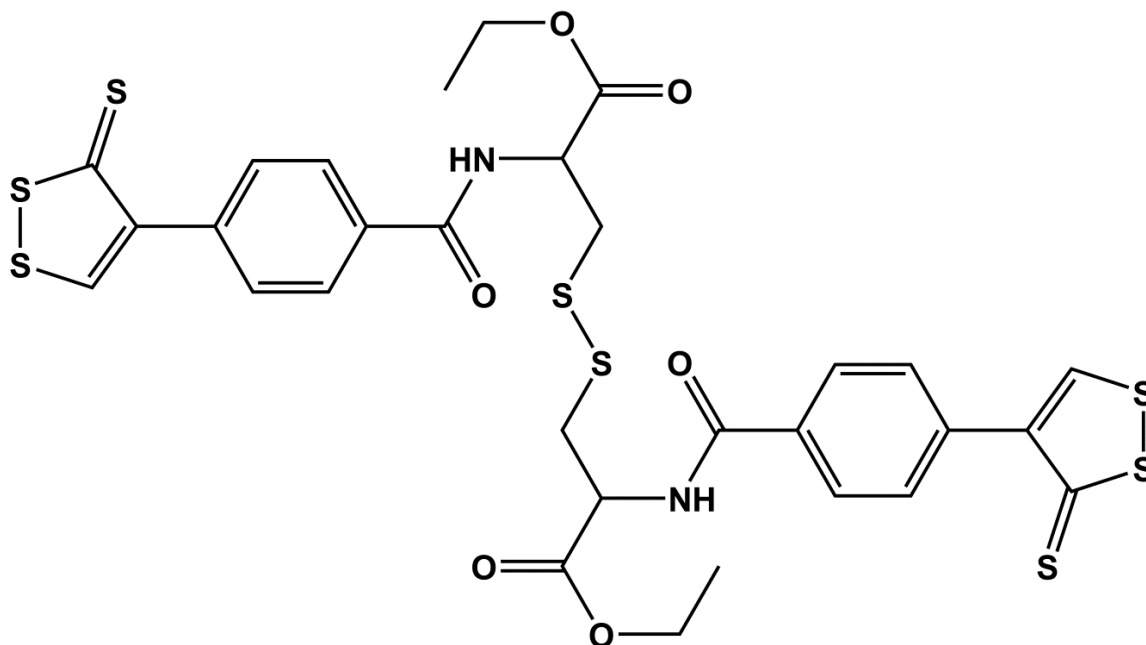
L-Cistina dietilestere dicloridrato



Ad una sospensione etanolica (40 ml) di cistina (0,914 g; 3,8 mmoli) vengono fatti gocciolare a freddo 5,2 ml (7,6 mmoli) di cloruro di tionile. Al termine del gocciolamento si porta la temperatura di reazione a 75°C. Dopo 4 h si evapora a secchezza il solvente ed il residuo solido viene portato su filtro per essere lavato con etere. Si ottengono 1,41g di dicloridrato di cistina dietilestere. (resa: 88%).[13]

3,3'-Disulfan-diilbis(2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzamido)

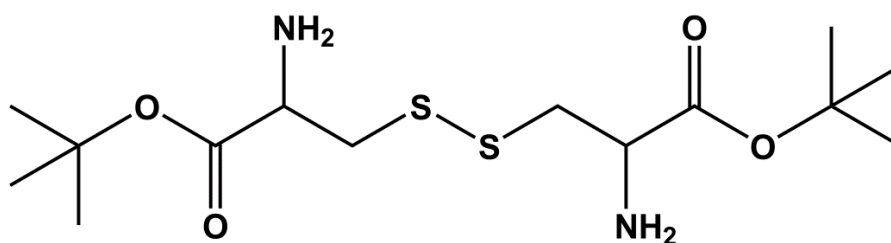
propanoato di etile (ACS 96)



Ad una soluzione di ACS 48 (413 mg; 1,9 mmoli), HOBt (338 mg; 2,28 mmoli) ed EDAC (416,5 mg; 2,28 mmoli) in 4 ml di DMF anidra viene aggiunta lentamente una soluzione di cistina etil estere dicloridrato (300 mg; 0,81 mmoli) e di DIPEA (0,68 ml; 3,9 mmoli) in 3 ml di DMF anidra. La reazione viene agitata per 24h a t. ambiente in atmosfera d'azoto. Si controlla l'andamento della reazione mediante TLC su SiO₂, usando CH₂Cl₂/MeOH (98:2) come eluente. Dopo 24h si evapora completamente la DMF e il grezzo viene ripreso con CH₂Cl₂. La fase organica viene dibattuta con acqua, seccata su Na₂SO₄ anidro ed evaporata a secchezza. Il residuo grezzo viene infine cromatografato su SiO₂, eluendo con CH₂Cl₂ e MeOH (99:1). Si recupera un prodotto che, dopo lavaggio con etere, pesa 222 mg (resa: 36%) ed ha punto di fusione 98-102°C.

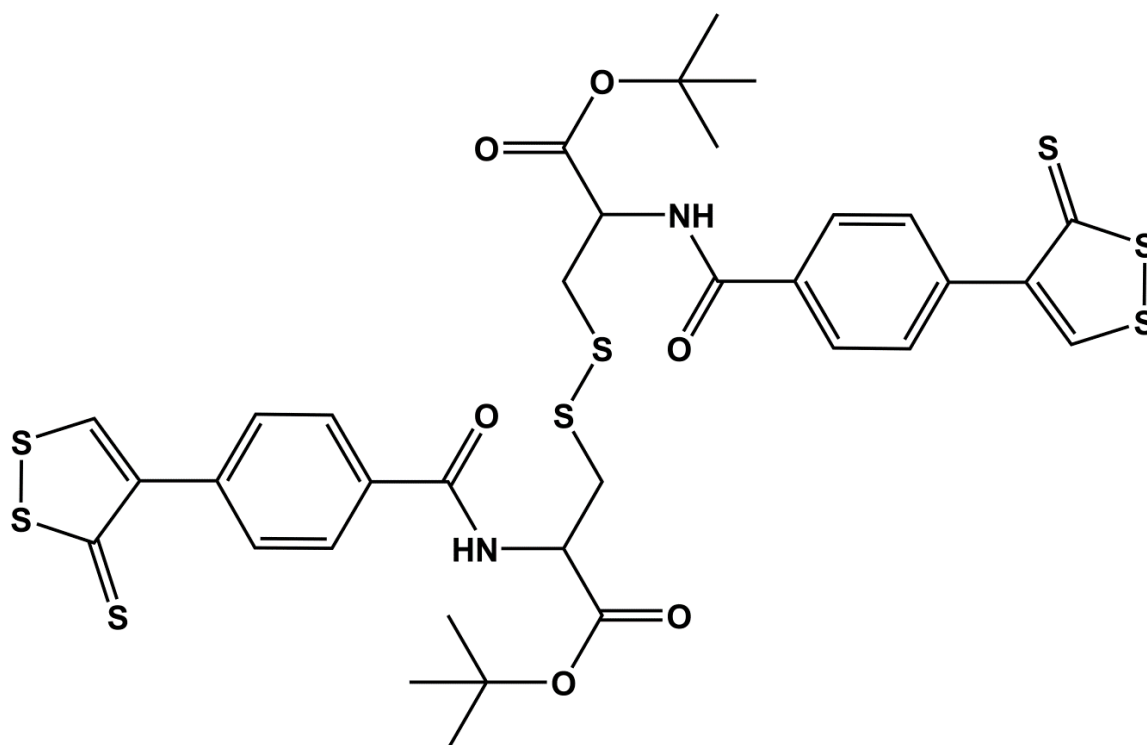
¹H-NMR: (DMSO-*d*₆) δ = 9.18 (s, 2H); 8.97 (d, *J*=7.43Hz, 2H); 7.87 (d, *J*=8.26Hz, 4H); 7.65 (d, *J*=7.98Hz, 4H); 4.77-4.70 (m, 2H); 4.16-4.09 (q, *J*=7.15Hz, 4H); 3.31-3.09 (m, 4H); 1.20-1.16 (t, *J*=7.17Hz, 6H).

L-Cistina tertbutilestere



Ad una soluzione di cistina (5g; 20,8 mmoli) in acido perclorico al 70% (8,3 ml) vengono fatti gocciolare 50 ml di *tert*butilacetato in bagno di ghiaccio (0°C). Al termine del gocciolamento la temperatura viene portata a 25°C. Si eseguono TLC di controllo su SiO₂ usando CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ (9:1:0.1) come eluente. Dopo 72h si raffredda il pallone di reazione in un bagno di ghiaccio, si introducono 50 ml di H₂O e 50 ml di etil acetato e si alcalinizza la soluzione fino a pH 11 con NaOH 2N. Le due fasi vengono separate e quella acquosa viene estratta 3 volte con 50 ml di etilacetato. Le fasi organiche vengono riunite e seccate su Na₂SO₄ anidro. La rimozione del solvente *in vacuo* fornisce il prodotto come un olio giallastro (3,3g; resa: 45%).[140]

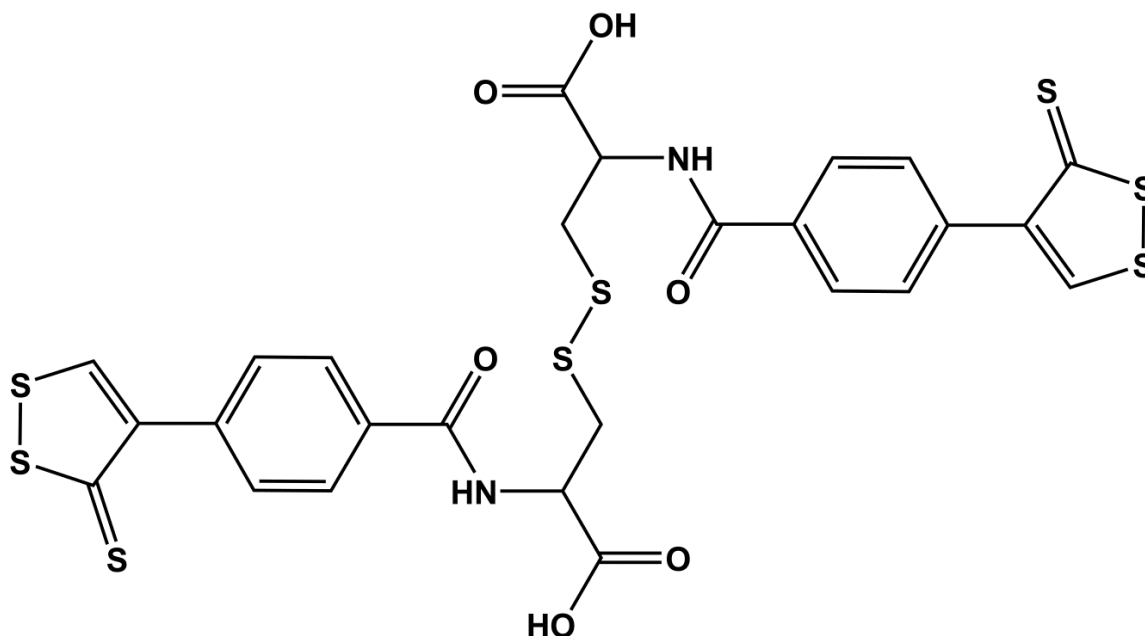
tertButil 3,3'-disulfan-diilbis(2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzamido)propanoato)



Ad una soluzione di ACS 48 (1 g; 3,9 mmoli), HOBt (716,5 mg; 4,68 mmoli) ed EDAC (896,2 mg; 4,68 mmoli) in 4 ml di DMF anidra viene aggiunta lentamente una soluzione di cistina *tert*butilestere (700 mg; 1,95 mmoli) e di TEA (0,659 ml; 4,68 mmoli) in 3 ml di DMF anidra. La miscela di reazione viene agitata per 24 h a t. ambiente in atmosfera d'azoto. L'andamento della reazione viene seguito mediante TLC su SiO₂, utilizzando CH₂Cl₂/MeOH (98:2) come eluente. Dopo 24h si evapora completamente la DMF e il residuo grezzo viene ripreso con CH₂Cl₂. Dopo aver dibattuto con acqua la fase organica, questa viene seccata su Na₂SO₄ anidro e portata a secchezza. Il residuo grezzo viene infine cromatografato su SiO₂, eluendo con CH₂Cl₂ e MeOH (99:1). Il prodotto recuperato, dopo lavaggio con etere, pesa 910 mg (resa: 57%) ed ha p.f. 88-90°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 9.18 (s, 2H); 8.97 (d, *J*=7.43Hz, 2H); 7.87 (d, *J*=8.26Hz, 4H); 7.65 (d, *J*=7.98, 4H); 4.77-4.70 (m, 2H); 3.31-3.09 (m, 4H); 1.48 (s, 18H).

Acido 3,3'-disulfan-diilbis(2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzamido)propanoico) (ACS 97)



Ad una soluzione raffreddata a 0°C di *tert*butil 3,3'-disulfan-diilbis(2-(4-(3-tiosso-3H-1,2-ditiol-4-il)benzamido)propanoato) (910 mg; 1,1 mmoli) in 30 ml di HCl 4N in diossano si aggiungono 5 ml di H₂O (con funzione di scavenger). La reazione, controllata mediante TLC su SiO₂, utilizzando CH₂Cl₂/MeOH (98:2) come eluente, procede a temperatura ambiente per 3 ore al termine delle quali si evapora a secchezza il solvente. Il residuo grezzo, ripreso più volte con etere, che viene successivamente evaporato a secchezza per favorire l'eliminazione di HCl e diossano, viene portato su filtro e lavato successivamente con CH₂Cl₂ (2 volte), metanolo ed infine etere etilico (2 volte). Si ottengono senza ulteriori purificazioni 686 mg di prodotto finale (resa: 87%). P.f.= 254-255°C.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 9.19 (s, 2H); 8.85 (d, *J* = 7.98 Hz, 2H); 7.87 (d, *J* = 8.25 Hz, 4H); 7.64 (d, *J* = 8.25 Hz, 4H); 4.73-4.67 (m, 2H); 3.55-3.07 (m, 4H).

4. ATTIVITA' FARMACOLOGICA

Per quanto riguarda i composti ibridi di L-DOPA, gli studi *in vitro* sono stati eseguiti presso il Kinsmen Laboratory of Neurological Research, (University of British Columbia, Vancouver, Canada) diretto dal Prof. Patrick L. McGeer, mentre gli studi *in vivo* sono stati condotti presso il laboratorio di Farmacologia e Tossicologia diretto dal Dott. R. Rossi, del Dipartimento Biologia Evolutiva dell'Università di Siena. In quest'ultimo laboratorio sono stati anche condotti tutti gli studi farmacologici sui derivati cisteinici donatori di H₂S

Purtroppo, al momento non si dispone ancora di alcun dato sull'attività biologica relativa agli ibridi inibitori di PDE5 rilascianti H₂S sintetizzati nell'ambito della presente tesi.

4.1 Ibridi di L-DOPA donatori di H₂S.

Per tutte le molecole sintetizzate sono state condotte prove *in vitro* rivolte a verificare la proprietà neuroprotettive e antiinfiammatorie di questa nuova classe di composti, oltre che la loro capacità di rilasciare H₂S. ACS84 è stato anche testato *in vivo* per valutare, in seguito a somministrazione iv nei ratti, la sua capacità di attraversare la barriera ematoencefalica (BEE) e dosare i livelli di dopamina cerebrale e plasmatica e i livelli di GSH nel cervello.

I risultati ottenuti sono stati oggetto di una pubblicazione [126].

Di seguito vengono riportati i dati più rilevanti.

TEST IN VITRO

Protocollo sperimentale

Astroцитi umani, cellule di astrocitoma U373, cellule THP-1 e cellule microgliali umane, trattate con idrossilammina (CBS inibitore) per inibire la produzione endogena di H₂S da parte di CBS, sono state incubate in presenza di L-DOPA, (-)-deprenyl, NaHS, ADTOH (ACS1), delle H₂S-moieties (ACS5, ACS48, ACS50, ACS81) e dei relativi composti ibridi (ACS83, ACS84, ACS85, ACS86) a concentrazioni di 10 μM per 2-4-6-8-12h. Successivamente sono state lavate con tampone fosfato (PBS) e reincubate in un nuovo medium di coltura (DMEM/F12 contenente il 5% di siero fetale bovino) a 37°C per 48 h, sia in presenza sia in assenza di stimolanti infiammatori. Per le cellule microgliali e le cellule THP1 lo stimolante utilizzato è LPS (lipopolisaccaride) e IFN-γ (gamma-interferone). Per gli astroцитi e le cellule U373 lo stimolante utilizzato è solo IFN-γ.

Dopo incubazione, il surnatante è stato trasferito su cellule di neuroblastoma indifferenziate SH-SY5Y, le quali sono state a loro volta incubate per 72h prima di eseguire i test sulla sopravvivenza cellulare e sul rilascio della lattato deidrogenasi (LDH).

Determinazione dei livelli di H₂S

Tutti gli esperimenti sono stati condotti usando idrossilammina (1mM) come inibitore specifico di CBS, allo scopo di inibire la produzione endogena di H₂S. Sono stati eseguiti due set di esperimenti, uno in cui cellule THP-1 e U373 non sono state stimolate e un secondo in cui sono state stimolate con un mediatore infiammatorio per 48 h. In entrambi i casi le cellule sono state trattate con NaHS, ADTOH, ACS83, ACS84, ACS85 e ACS86 alla concentrazione di 10 µM per 2-4-6-8-12h. Dopo il trattamento le cellule sono state omogeneizzate in 250 µl di una soluzione costituita da tampone fosfato 100 mM (pH 7.4) contenente acido tricloroacetico (10% w/v). Infine, è stata iniettata una soluzione di zinco acetato (1% w/v, 250 µl), per intrappolare l'idrogeno solforato generato il quale viene convertito in blu di metilene mediante rapida aggiunta di 133 µl di una soluzione 20 µM di N,N-dimetil-p-fenilendiammina solfato in HCl 7.2 M e 133 µl di una soluzione 30 µM di FeCl₃ in HCl 1.2 M. Dopo 10 minuti di riposo a temperatura ambiente si misura l'assorbanza a $\lambda=670$ nm. La concentrazione di idrogeno solforato è calcolata utilizzando una curva di calibrazione costruita misurando l'assorbanza di una serie di soluzioni standard di H₂S, ottenute sciogliendo in tampone basico il solfuro di sodio (1-250 uM) e i risultati espressi in µmol/g di proteina o nmol/ml.

Risultati

I test sulla sopravvivenza cellulare e sul rilascio della LDH (figura 18) mostrano come gli "H₂S-releasing compounds", l'ADTOH e il NaHS, ma non L-DOPA, sono in grado di ridurre la neurotossicità indotta. I quattro derivati dell' L-Dopa ACS83, ACS84, ACS85, ACS86 hanno un effetto protettivo paragonabile a quello del NaHS e dell'ADTOH.

Alla luce di questi risultati si è poi voluto verificare se questi composti siano in grado di rilasciare H₂S nelle cellule neuronali e la loro potenziale attività antiinfiammatoria.

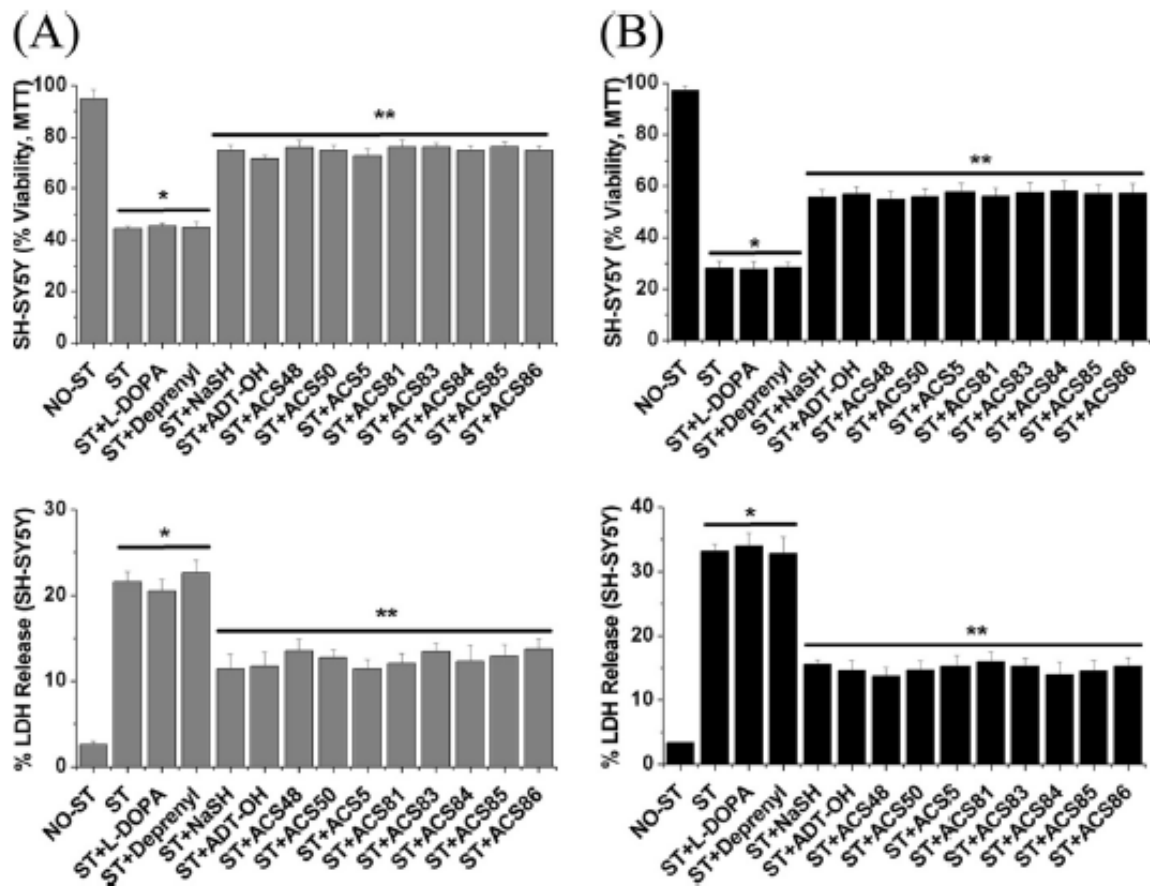


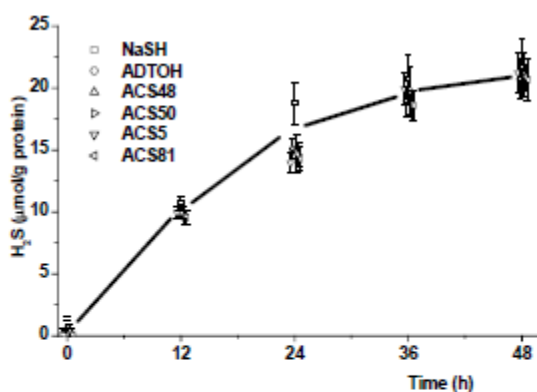
Figura 16. Effetti del trattamento con NaSH, ADT-OH, L-DOPA, (-)-deprenyl, ACS48, ACS50, ACS5, ACS81, ACS83, ACS84, ACS85 e ACS86 (10 μ M, 8 h di preincubazione) sulla sopravvivenza cellulare e sul rilascio di LDH su cellule SH-SY5Y esposte al surnatante di cellule microgliali umane attivate (A) e di astrociti umani attivati (B). Valori medi \pm S.E., n=4

Il significato delle differenze tra gruppi di dati è stato analizzato mediante test di Student e ANOVA. Comparazioni multiple sono state condotte mediante test di Bonferroni. *, $p < 0.01$ confrontando il gruppo stimolato (ST) con il gruppo non stimolato (NO-ST) e **, $p < 0.01$ confrontando il gruppo stimolato (ST) con il gruppo stimolato e trattato con iderivati solforati.

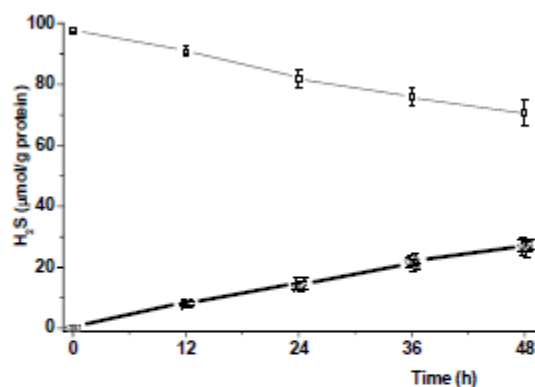
Infatti si è visto (figura 19) che dopo 48h di esposizione al NaHS e alle “moieties” solforate, nel citoplasma si può notare, per tutti i composti, un graduale incremento di H_2S . Nell’ambiente extracellulare invece l’ H_2S derivante da NaHS, come ci si aspetta, raggiunge subito dei livelli massimi per poi decrescere lentamente dopo le 48h. L’ H_2S derivante da tutte le “moieties” solforate invece aumenta lentamente nel tempo, indicando una graduale secrezione dalle cellule di H_2S .

Questi dati stabiliscono che tutte le moieties solforate in ciascuna linea cellulare vengono metabolizzate generando H_2S .

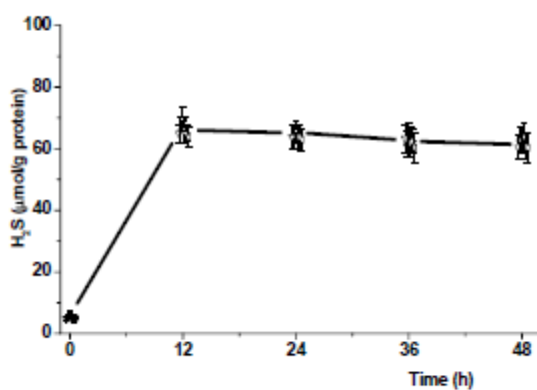
(A) THP-1 cells (Intracellular)



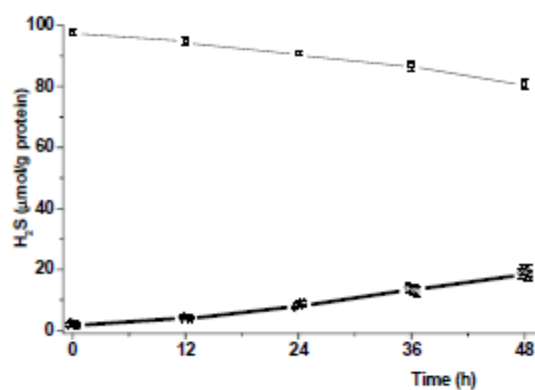
(B) THP-1 cells (Extracellular milieu)



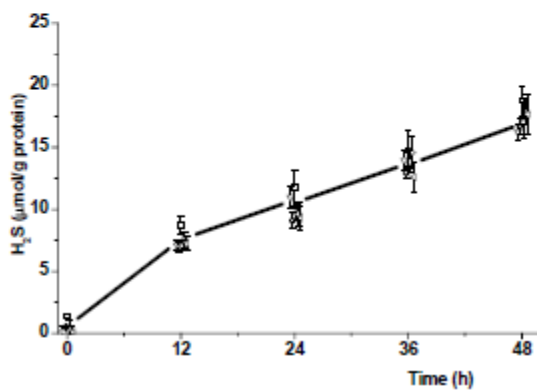
(C) U373 cells (Intracellular)



(D) U373 cells (Extracellular milieu)



(E) SH-SY5Y (Intracellular)



(F) SH-SY5Y (Extracellular milieu)

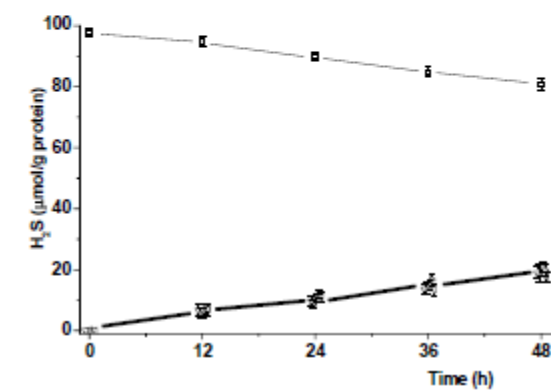


Figura 17. Livelli intracellulari ed extracellulari di H₂S (μmol/g di proteine) dopo trattamento con NaHS, ACS5, ACS48, ACS50, ACS81 e ADTOH (10μM) in presenza di idrossilammina (1mM) in cellule THP-1 (A,B), U373 (C,D) e SH-SY5Y (E,F). Valori medi ± S.E., n=4

Nella figura 20 è messo a confronto l'accumulo intracellulare di H₂S dopo trattamento di cellule THP-1 (A) e U373 (B), stimulate (st) e non stimulate, con NaHS, ACS5, ACS48, ACS50, ACS81 e ADTOH (10µM) in presenza di idrossilammina (1mM). In entrambe le linee cellulari si può osservare un graduale accumulo di H₂S. E' interessante notare una marcata riduzione dei livelli di H₂S intracellulare in seguito a stimolazione infiammatoria. Questi dati suggeriscono che l'H₂S generato viene prontamente consumato nelle cellule stimulate presumibilmente attraverso reazioni ossidative.

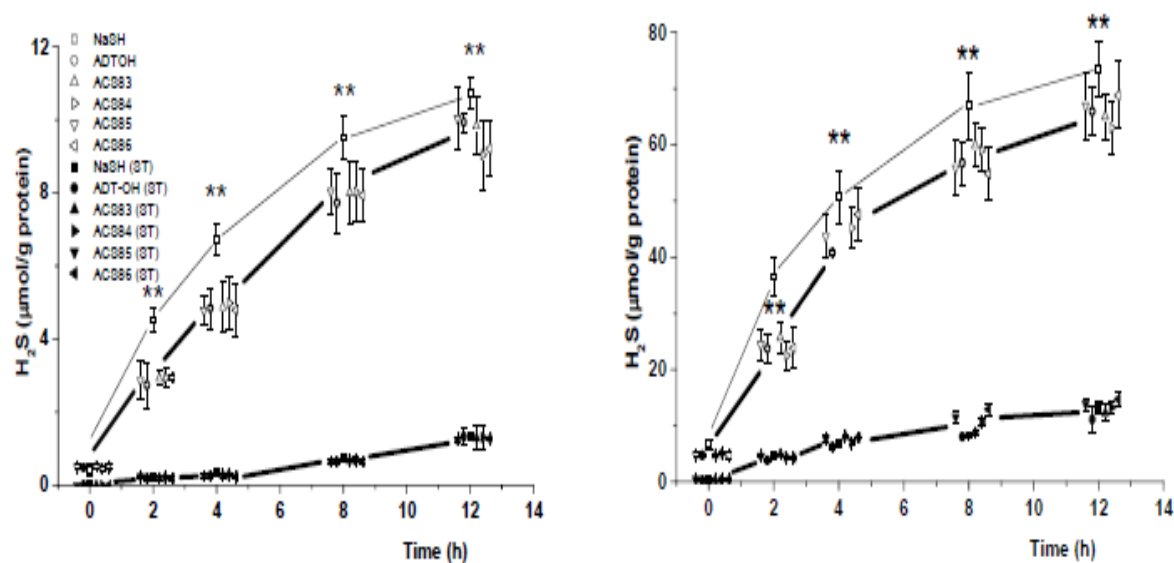


Figura 18. Livelli intracellulari di H₂S (µmol/g di proteine) dopo trattamento con NaHS, ACS5, ACS48, ACS50, ACS81 e ADTOH (10µM) in presenza di idrossilammina (1mM) in cellule THP-1 (A) e U373 (B), stimulate (st) e non stimulate. Valori medi ± S.E., n=4. Il significato delle differenze tra gruppi di dati è stato analizzato mediante test di Student e ANOVA. Comparazioni multiple sono state condotte mediante test di Bonferroni. **, *p* < 0.01 confrontando il gruppo stimolato (ST) con lo stesso gruppo non stimolato.

Il più importante agente riducente all'interno delle cellule è il glutatione (GSH). Per determinare se gli "H₂S donors" hanno effetti sui livelli di GSH intracellulare, sono stati misurate le concentrazioni intracellulari di GSH in cellule indifferenziate di neuroblastoma SH-SY5Y esposte per 8 ore ai quattro derivati ibridi di L-DOPA (ciascuno alla concentrazione di 10 µM). Uguali concentrazioni di L-DOPA e NaHS sono stati usati come controllo negativo e positivo, rispettivamente. Il trattamento con NaHS e i derivati ibridi di L-DOPA hanno indotto, in cellule SH-SY5Y, un

aumento delle concentrazioni di GSH di circa 1,5 volte. Dopo che le stesse cellule sono state esposte per 1 giorno al surnatante di THP-1 e U373 stimulate, è stato riscontrato un drastico calo della concentrazione intracellulare di GSH, ma NaHS e i quattro derivati solforati hanno attenuato significativamente questa riduzione (figura 21). Questi dati stabiliscono che l'idrogeno solforato generato da questi composti donatori viene convertito in GSH, il quale viene significativamente consumato per esposizione al surnatante proveniente dalle cellule gliali che hanno ricevuto stimolazione infiammatoria.

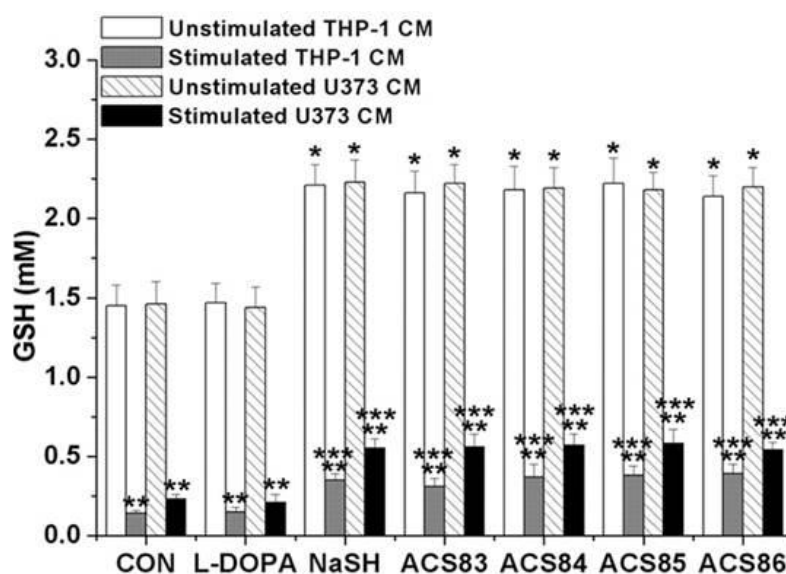


Figura 19. Effetto del trattamento con NaSH, L-DOPA, ACS83, ACS84, ACS85 e ACS86 sui livelli di GSH in cellule SH-SY5Y. Valori medi \pm S.E., n=4.

Il significato delle differenze tra gruppi di dati è stato analizzato mediante test di Student e ANOVA. Comparazioni multiple sono state condotte mediante test di Bonferroni. *, $p < 0.01$ per i gruppi trattati con NaHS o con "S-DOPA" confrontati con i gruppi non trattati; **, $p < 0.01$ per i gruppi esposti al surnatante proveniente da cellule stimulate confrontati con gruppi esposti al surnatante di cellule non stimulate; ***, $p < 0.01$ per i gruppi esposti al surnatante proveniente da cellule stimulate e trattate con NaHS o con tutti i composti solforati, confrontati con gruppi esposti a surnatante di cellule stimulate ma non trattate.

I 4 derivati ibridi di L-DOPA, come pure NaHS e ADTOH, hanno inoltre mostrato avere attività inibitoria selettiva per le monoammino ossidasi B (MAO B), senza avere alcun effetto sull'attività di MAO A.(figura 22). L-DOPA non ha invece alcun effetto inibitorio su questi enzimi.

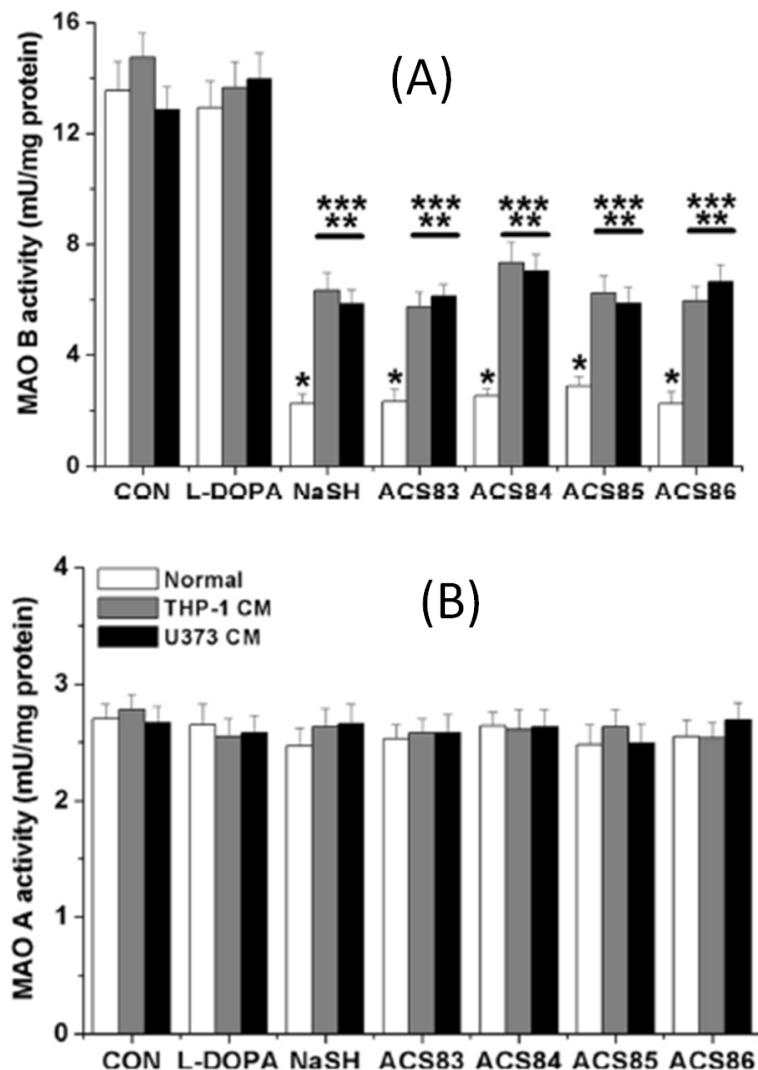


Figura 20. Effetto del trattamento con NaHS, ADTOH, L-DOPA, ACS83, ACS84, ACS85 e ACS86 sull'attività di MAO A (B) e MAO B (A) in cellule SH-SY5Y esposte al surnatante proveniente da cellule stimulate THP-1 e U373. Valori medi \pm S.E., n=4.

Il significato delle differenze tra gruppi di dati è stato analizzato mediante test di Student e ANOVA. Comparazioni multiple sono state condotte mediante test di Bonferroni. *, $p < 0.01$ per i gruppi trattati con NaHS o con "S-DOPA" confrontati con i gruppi non trattati; **, $p < 0.01$ per i gruppi esposti al surnatante proveniente da cellule stimulate confrontati con gruppi esposti al surnatante di cellule non stimulate; ***, $p < 0.01$ per i gruppi esposti al surnatante proveniente da cellule stimulate e trattate con NaHS o con tutti i composti solforati, confrontati con gruppi esposti a surnatante di cellule stimulate ma non trattate.

La stimolazione infiammatoria delle cellule determina il rilascio di citochine infiammatorie come TNF α (tumor necrosis factor) e IL-6 (interleuchina 6), oltre a generare ioni nitrito neurotossici. La figura 23 mostra gli effetti del trattamento con NaSH, ADT-OH, e i quattro derivati solforati di L-DOPA (10 μ M ciascuno, 8 h di preincubazione) sul rilascio di TNF α , IL-6 e ioni nitrito da parte di cellule THP-1 (fig. A, C, E) e di cellule microgliali umane (Fig B, D, F).

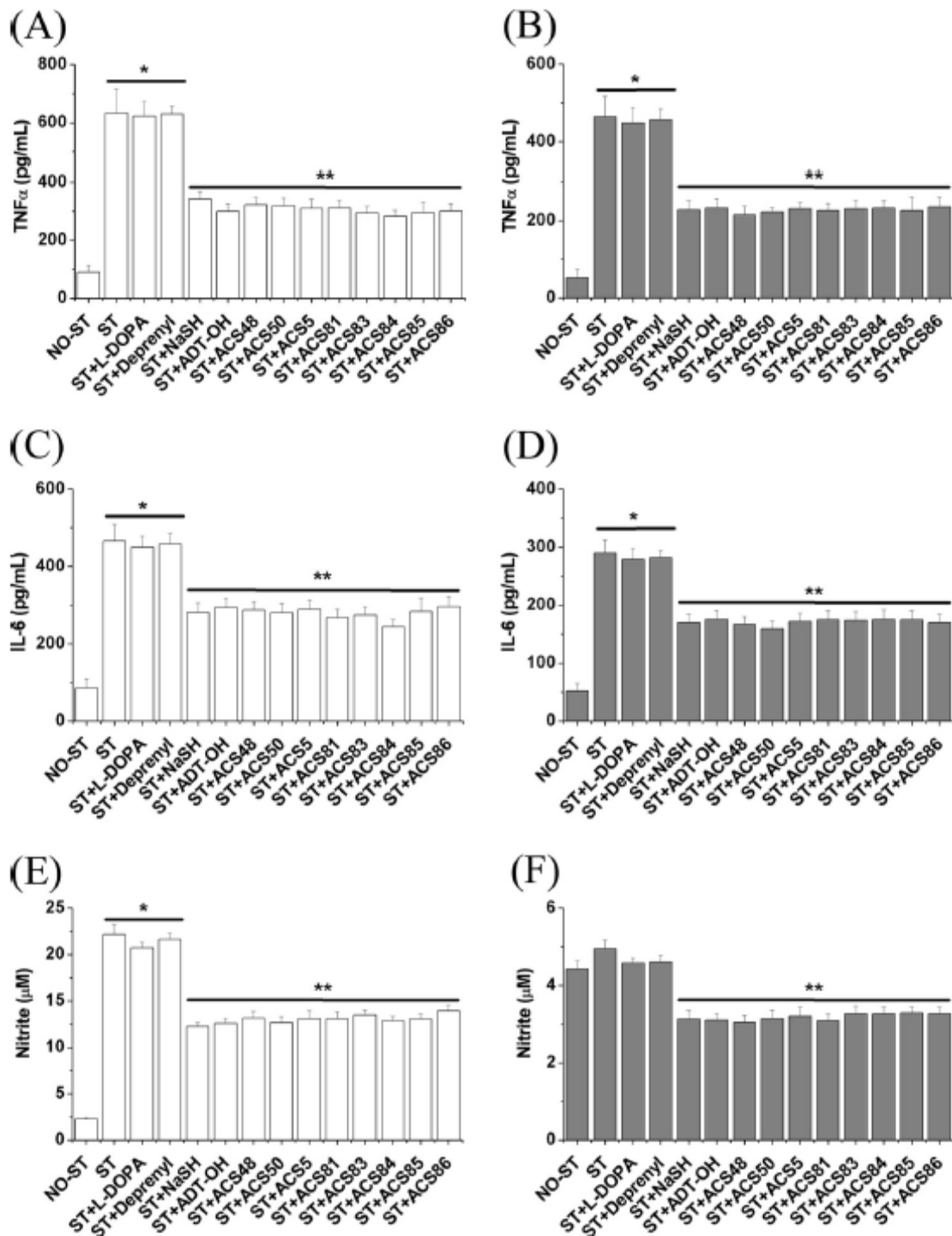


Figura 21. Effetti del trattamento con NaSH, ADT-OH, L-DOPA, (-)-deprenyl, ACS48, ACS50, ACS5, ACS81, ACS83, ACS84, ACS85 e ACS86 (10 μ M, 8 h di preincubazione) sui livelli di TNF α (A, B), IL-6 (C, D) e ioni nitrito (E, F) prodotti da cellule THP-1 (A, C, E) e cellule microgliali umane (B, D, F). Valori medi \pm S.E., n=4.

Il significato delle differenze tra gruppi di dati è stato analizzato mediante test di Student e ANOVA. Comparazioni multiple sono state condotte mediante test di Bonferroni. *, $p < 0.01$ confrontando il gruppo stimolato (ST) con il gruppo non stimolato (NO-ST) e **, $p < 0.01$ confrontando il gruppo stimolato (ST) con il gruppo stimolato e trattato con i derivati solforati.

I dati riportati in figura 23 mostrano significative differenze tra cellule non stimulate (NO-ST) e stimulate (ST) e tra cellule stimulate che non sono state trattate e quelle invece trattate con i composti solforati. Ciò dimostra come questi nuovi composti ibridi siano stati in grado di inibire il rilascio di questi mediatori pro-infiammatori, mentre L-Dopa non ha alcun effetto.

TEST IN VIVO

I test *in vivo* sono stati condotti solo su ACS84, che è stato somministrato a ratti (Charles River) per *iv* alla concentrazione di 40 mg /kg. Sono stati valutati i livelli di L-Dopa e dopamina nel plasma e nel cervello ed i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dopo trattamento dei ratti con dosi equimolari di L-Dopa o con il veicolo (figura 24). Il protocollo sperimentale e i metodi analitici utilizzati sono descritti estesamente in [126].

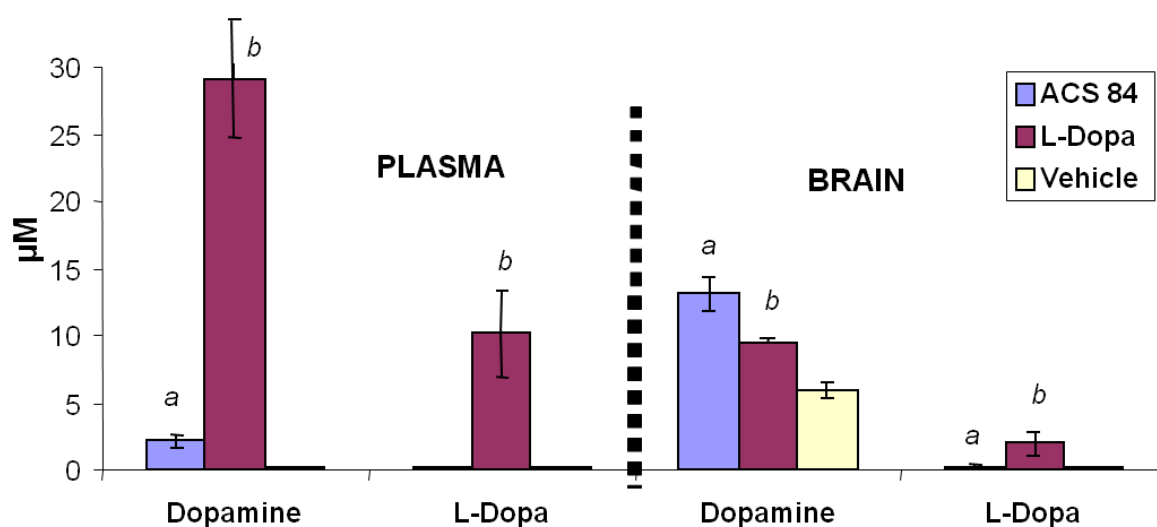


Figura 22. Livelli di Dopamina e di L-Dopa nel plasma e nel cervello 1h dopo somministrazione *iv* nel ratto di 40 mg/Kg di ACS84 o di una dose equimolare di L-DOPA. Valori medi \pm S.E., n=4. Il significato delle differenze tra gruppi di dati è stato analizzato mediante test di ANOVA. ^a, $p < 0.01$ per il gruppo ACS84 confrontato con il gruppo veicolo e ^b, $p < 0.01$ per il gruppo L-Dopa confrontato con il gruppo ACS84.

I dati mostrano come, dopo somministrazione di ACS84, a livello plasmatico siano state trovate minime quantità di dopamina, mentre a livello cerebrale i livelli sono 6 volte più alti.

Al contrario, in seguito a somministrazione di L-DOPA, questa viene convertita a dopamina principalmente a livello plasmatico.

I livelli di dopamina che si ritrova a livello cerebrale sono più elevati dopo somministrazione di ACS84 rispetto a quelli riscontrati dopo trattamento con L-DOPA, con un rapporto delle concentrazioni dopamina cerebrale/dopamina plasmatica nettamente a favore del trattamento con ACS84 (figura 25).

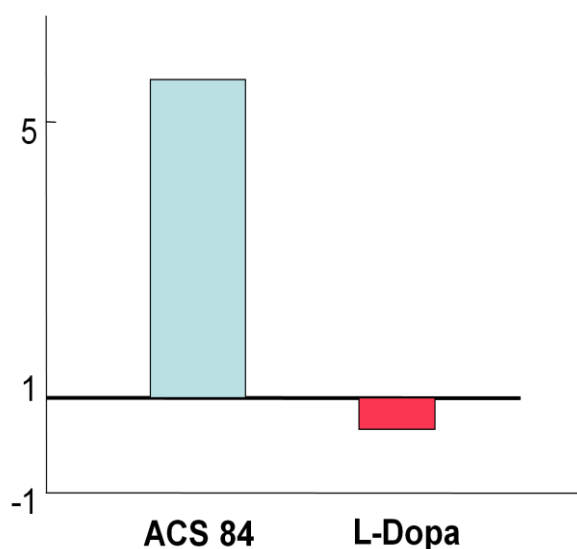


Figura 23. Rapporto dei livelli di dopamina nel cervello/plasma dopo trattamento con L-DOPA e ACS84

Dai dati sin qui rappresentati appare chiaro che ACS 84 è in grado di passare la barriera ematoencefalica e di svolgere la sua azione principalmente a livello cerebrale.

E' plausibile pensare che ACS83, ACS85 e ACS86, avendo valori di logP calcolati molto simili, mantengano un comportamento analogo.

Inoltre, come illustrato in figura 26, mentre L-DOPA non ha alcun effetto, ACS84 induce un importante aumento (1,4 volte rispetto a L-DOPA e al controllo) di GSH

nel cervello, che spiegherebbe le proprietà neuroprotettive di questa classe di composti.

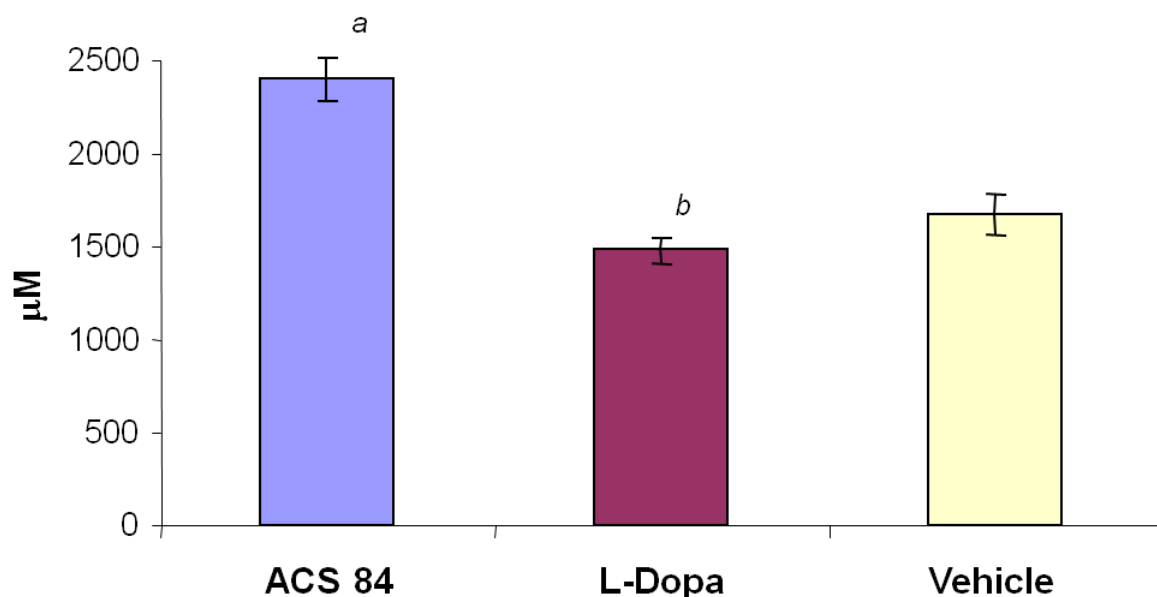


Figura 24. Livelli di glutatione nel cervello 1 ora dopo somministrazione *iv* nel ratto di 40mg/Kg di ACS84 o di una dose equimolare di L-DOPA. Il significato delle differenze tra gruppi di dati è stato analizzato mediante test di ANOVA. ^a, $p < 0.01$ per il gruppo ACS84 confrontato con il gruppo veicolo e ^b, $p < 0.01$ per il gruppo L-Dopa confrontato con il gruppo ACS84.

Gli ibridi di L-DOPA donatori di idrogeno solforato sintetizzati hanno quindi mostrato la capacità di passare la barriera ematoencefalica e di svolgere la loro azione principalmente a livello cerebrale, dove sono in grado di rilasciare L-DOPA, i cui livelli sono sostenuti anche dall'azione inibitoria delle MAO B da parte della porzione solforata, e di rilasciare H₂S con un conseguente rilevante aumento di GSH intracellulare responsabile dell'attività antiossidante, antiinfiammatoria e neuroprotettiva.

Per queste caratteristiche i composti qui descritti possono trovare potenziale impiego nel trattamento di patologie neurodegenerative come il morbo di Parkinson aventi l'infiammazione come importante processo patogenetico.

4.2 Nuovi derivati cisteinici donatori di H₂S come potenziale trattamento dell'iperomocisteinemia

Studio preliminare di farmacocinetica di ACS 94.

Prima di tutto è stato fatto uno studio preliminare della farmacocinetica di ACS 94, dopo somministrazione *iv* di 20 mg/kg di ACS 94 (da soluzione 40 mg/mL in PEG 400) nel ratto, andando ad identificare i principali metaboliti. I risultati sono riportati nelle figure 27 e 28.

Come si evince chiaramente dalla figura 27, ACS 94 forma immediatamente il corrispondente disolfuro (ACS 96) e subisce rapidamente l'idrolisi del gruppo estereo (ACS 97), passando per il metabolita intermedio monoesterificato (ACS 94-ACS 94 deest), mentre, come previsto, l'idrolisi del gruppo ammidico, con liberazione di ACS 48, avviene più lentamente.

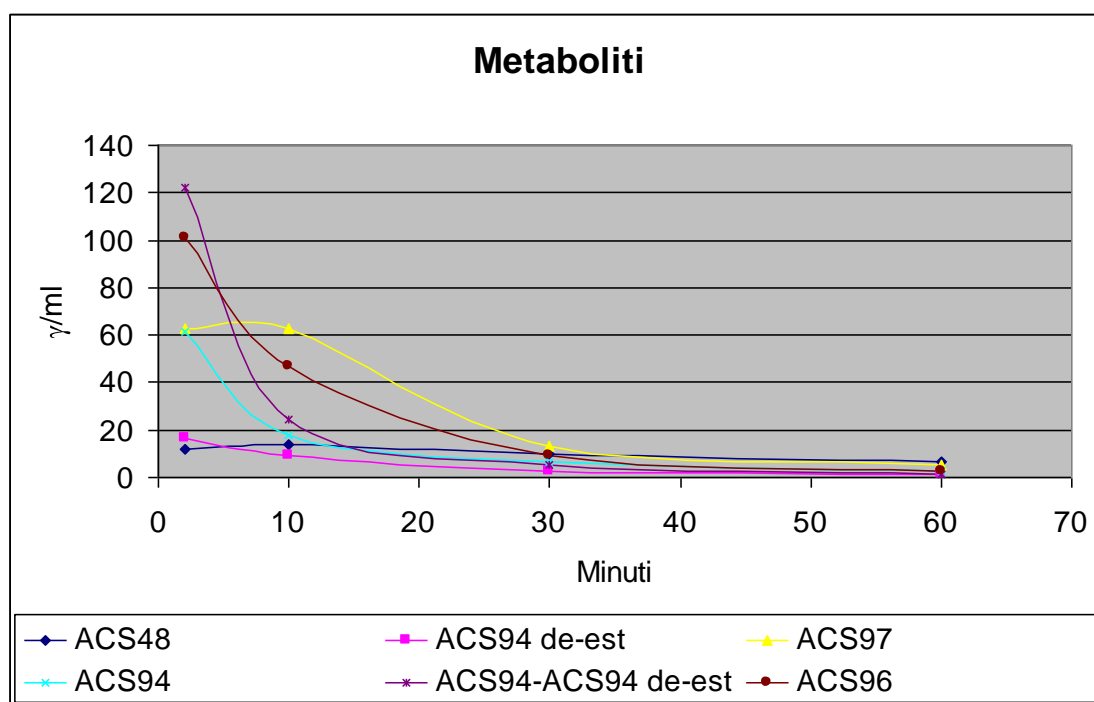


Figura 25. "Time course" di ACS 94 e suoi metaboliti dopo somministrazione *iv* nel ratto.

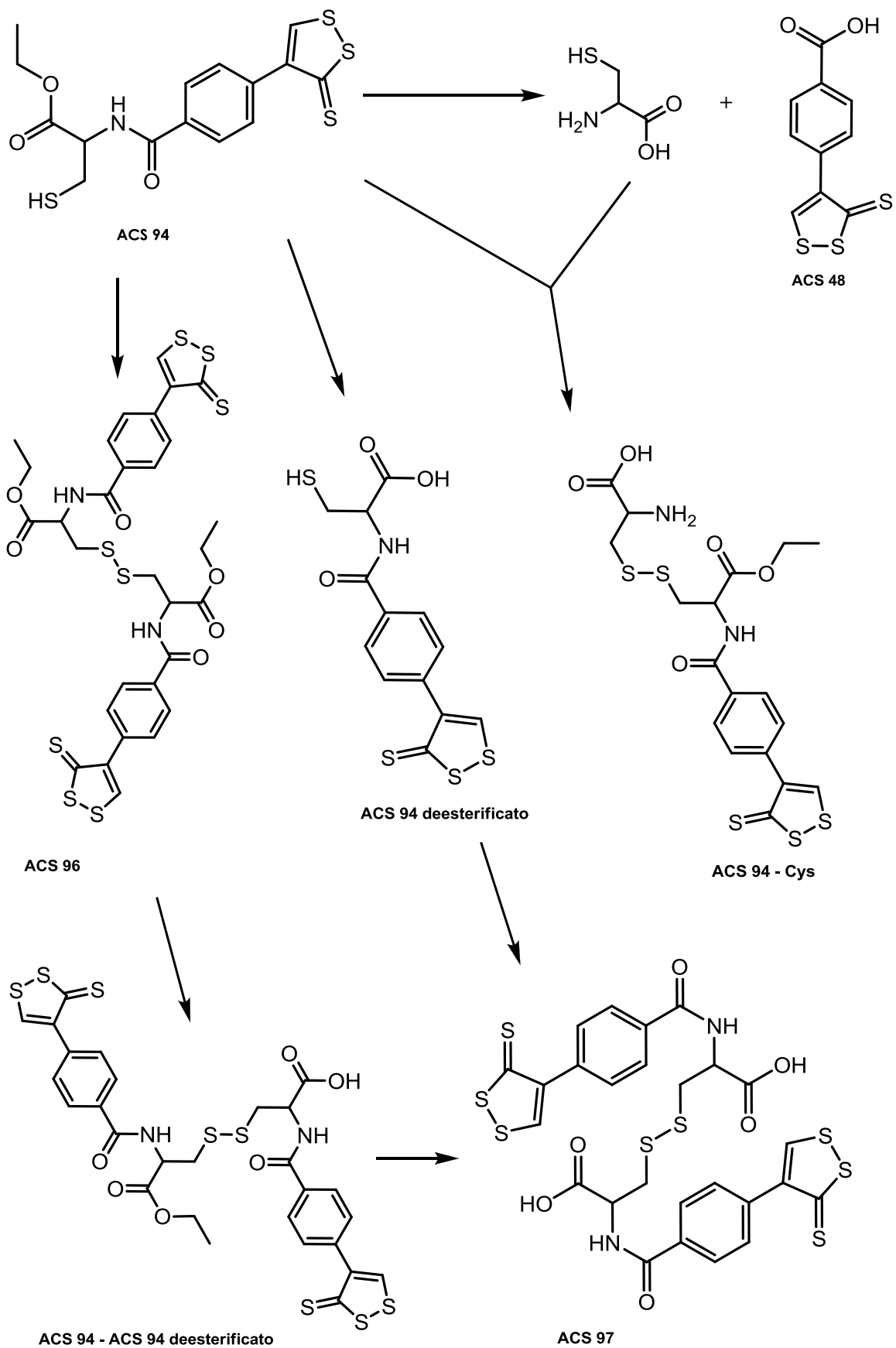


Figura 26. Strutture dei principali metaboliti di ACS94.

Trattamento con ACS 94 o NAC per os in dose ripetuta.

Per verificare gli eventuali effetti di ACS 94 sulla concentrazione ematica di H₂S, sui livelli e la distribuzione del “pool dei tioli” nei vari organi e confrontarli poi con gli effetti di N-acetilcisteina (NAC), tre ratti sono stati trattati per 4 giorni con due dosi/dì per os di NAC (20 mg/kg per dosaggio di H₂S o 10 mg/kg per dosaggio tioli) o dosi equimolari di ACS 94 o con il solo veicolo (DMSO 10%, CMC 0,5%). La concentrazione plasmatica di H₂S è stata determinata al variare del tempo, utilizzando il metodo cromatografico descritto in [114], mentre per la determinazione dei vari tioli si sono usati i metodi descritti da Giustarini et al. in [116]

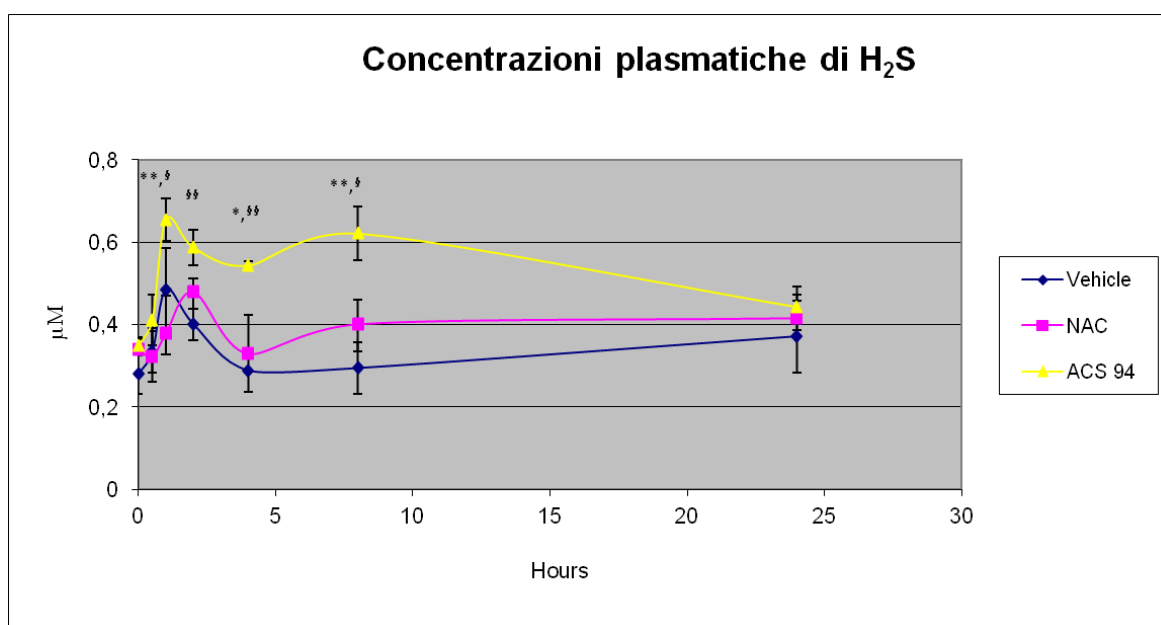


Figura 27. Concentrazioni plasmatiche di H₂S dopo trattamento di ratti per os con NAC (20 mg/kg; n=3), ACS 94 (equimolare; n=3) o veicolo (n=4), 2 volte al giorno per 4 giorni. Valori medi ± S.E. ** p<0.01 vs NAC; * p<0.05 vs NAC; §§ p<0.01 vs controllo; § p<0.05 vs controllo.

Come ipotizzato, i ratti trattati con ACS 94 mostrano concentrazioni plasmatiche di H₂S più elevate sia rispetto ai controlli sia rispetto ai ratti trattati con NAC (fig. 29), confermando la capacità dei ditiolioni, in condizioni fisiologiche, a rilasciare lentamente basse concentrazioni di idrogeno solforato. Tali concentrazioni sono sufficientemente basse da non creare problemi di tossicità, ma sono

sufficientemente alte da poter contribuire alla correzione di eventuali squilibri ossido-riduttivi cellulari.

Dall'esame della distribuzione delle concentrazioni dei vari tioli nei diversi organi, i dati più interessanti riguardano i livelli di glutatione (GSH), che risultano notevolmente aumentati non solo rispetto ai controlli, ma anche rispetto al trattamento con NAC, in modo particolare nel fegato, nel rene, polmoni, cuore e cervello (fig.30). Questo aspetto potrebbe essere indicativo di una potenziale proprietà protettiva da parte di ACS 94 nei confronti di agenti epatotossici e nefrotossici.

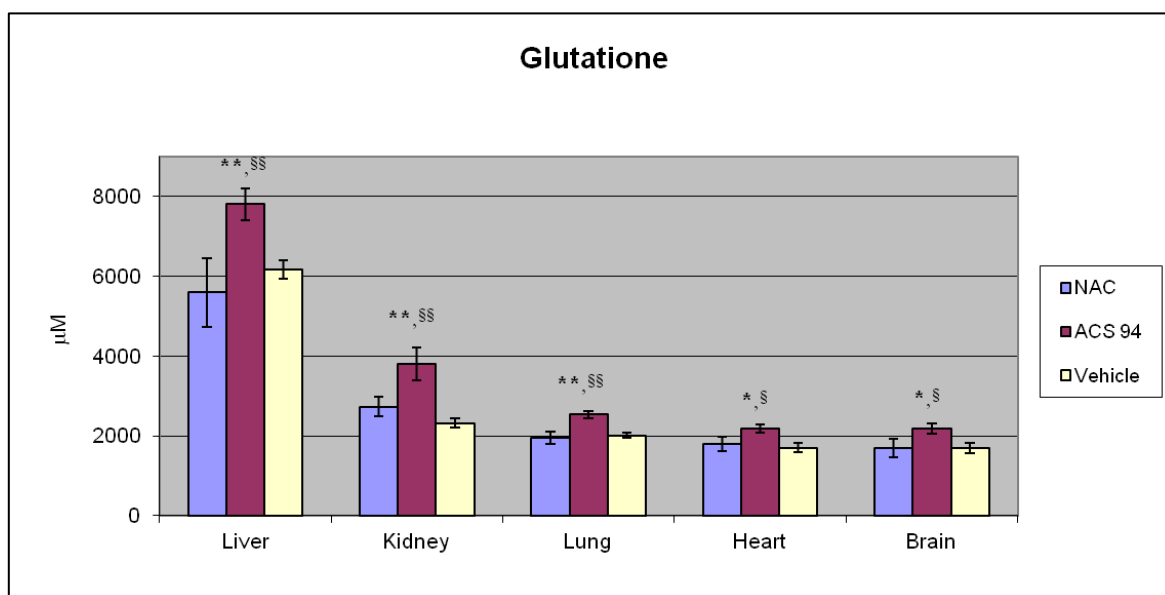


Figura 28. Concentrazioni di GSH dopo trattamento di ratti per os con NAC (10 mg/kg; n=3), ACS94 (equimolare; n=3) o veicolo (n=4), 2 volte al giorno per 4 giorni. Valori medi \pm S.E.
** p<0.01 vs NAC; * p<0.05 vs NAC; §§ p<0.01 vs controllo; § p<0.05 vs controllo

Per quel che riguarda le concentrazioni di omocisteina (Hcy), si nota una riduzione dei livelli nel plasma, nel fegato, nel rene e nei polmoni dei ratti trattati con ACS 94, sia rispetto agli animali trattati con il solo veicolo che rispetto a quelli trattati con NAC (fig. 31). Questo dato conferma l'ipotesi iniziale ed indica in ACS 94 un composto potenzialmente utile per ridurre i livelli di iperomocisteinemia.

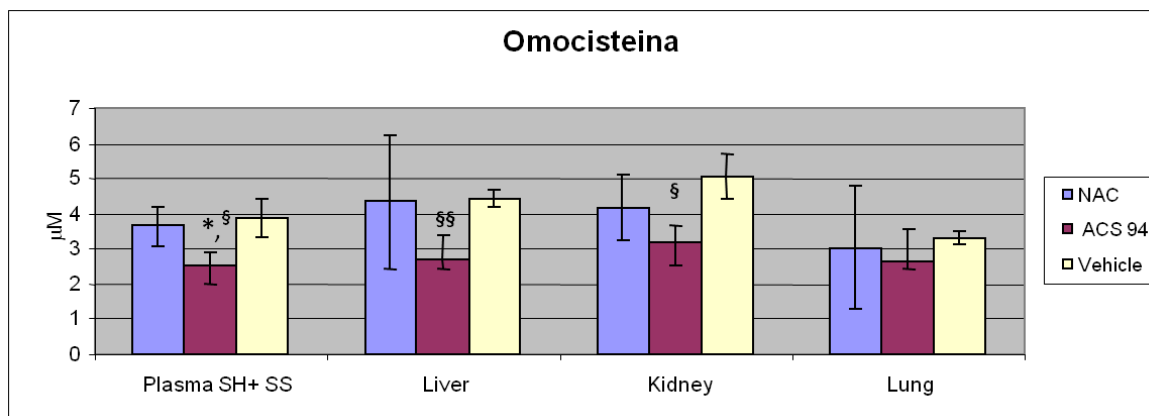


Figura 29. Concentrazioni di omocisteina dopo trattamento di ratti per os con con NAC (10 mg/kg; n=3), ACS94 (equimolare; n=3) o veicolo (n=4), 2 volte al giorno per 4 giorni. Valori medi \pm S.E. ** p<0.01 vs NAC; * p<0.05 vs NAC; §§ p<0.01 vs controllo; § p<0.05 vs controllo.

Protezione da epatotossicità indotta da paracetamolo.

È stato valutato il potenziale epatoprotettivo di ACS 94 rispetto a NAC in un modello murino di epatotossicità indotta da paracetamolo. Il paracetamolo, viene infatti convertito nel fegato e nel rene ad un intermedio reattivo il N-acetilbenzochinoneimina (NBQI), che si lega ai gruppi sulfidrilici del glutatone e delle proteine.

Tre ratti sono stati trattati ip con 1g/kg di paracetamolo sciolto in DMSO. La NAC (50 mg/kg) o ACS 94 (equimolare) o il veicolo (DMSO 10% CMC 0.5%) sono stati somministrati per os 15 minuti prima del paracetamolo e 2h e 4 h dopo. Dopo 6 ore i ratti sono stati sacrificati e sono stati dosati i livelli dei tioli nei vari organi e i parametri ematici indicativi di eventuale danno epatico.

I risultati più significativi ottenuti (livelli di GSH, Hcys, tioli proteici nei vari organi e parametri ematici indicativi di epatotossicità) sono riassunti nei grafici seguenti (fig. 32, 33 e 34) e in Tabella 2.

I dati evidenziano livelli maggiori di GSH e dei tioli proteici soprattutto nel fegato e nel rene degli animali trattati con ACS 94 rispetto a quelli trattati con NAC o con il solo paracetamolo. Questo indica chiaramente che ACS 94 protegge dalla tossicità epatica indotta da paracetamolo meglio della NAC, prevenendo più efficacemente la deplezione dei tioli nel rene e nel fegato.

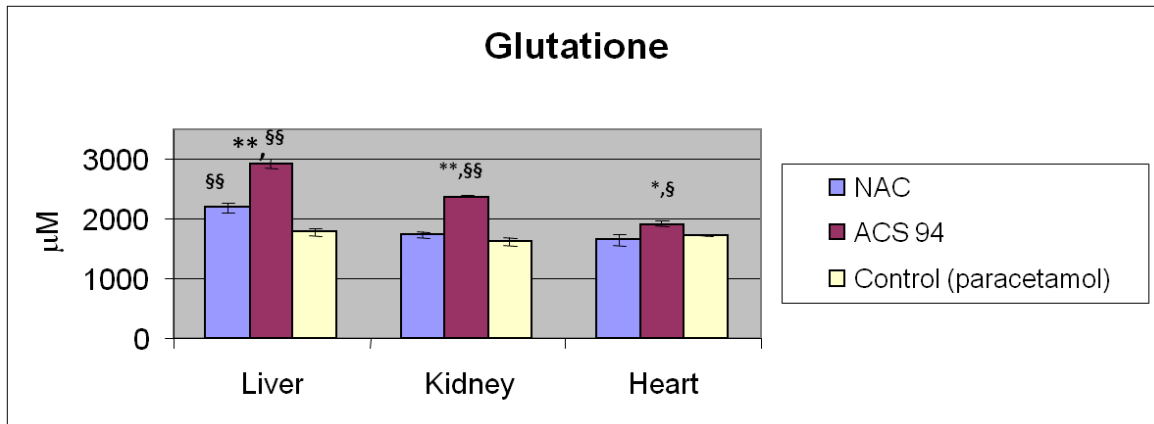


Figura 30. Concentrazioni di GSH dopo 6h dal trattamento di ratti per os con NAC (50 mg/kg; n=3), ACS 94 (equimolare; n=3) o veicolo (n=4), 15 min prima e 2h e 4h dopo trattamento ip con paracetamolo (1g/kg). Valori medi \pm S.E.
 ** p<0.01 vs NAC; * p<0.05 vs NAC; §§ p<0.01 vs controllo; § p<0.05 vs controllo.

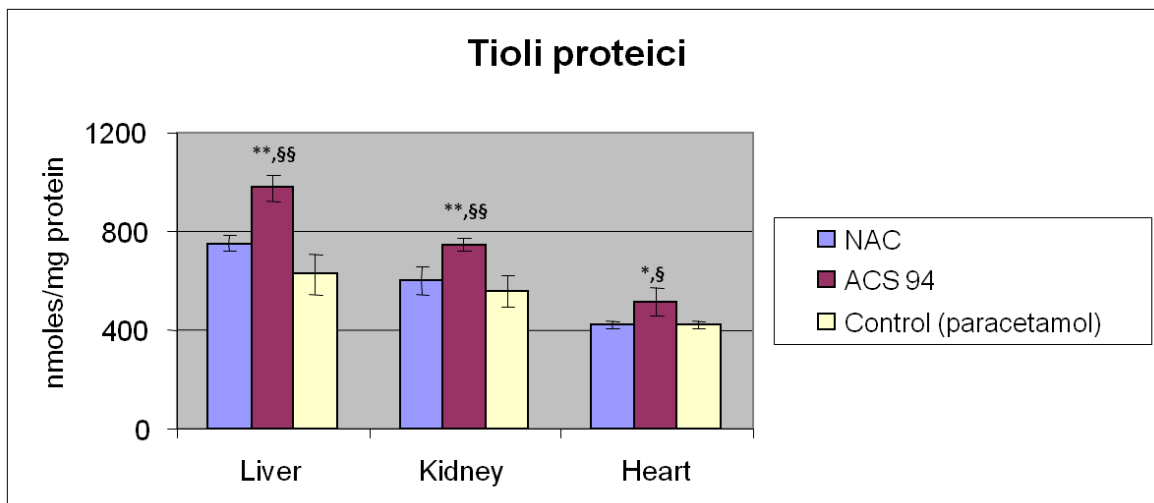
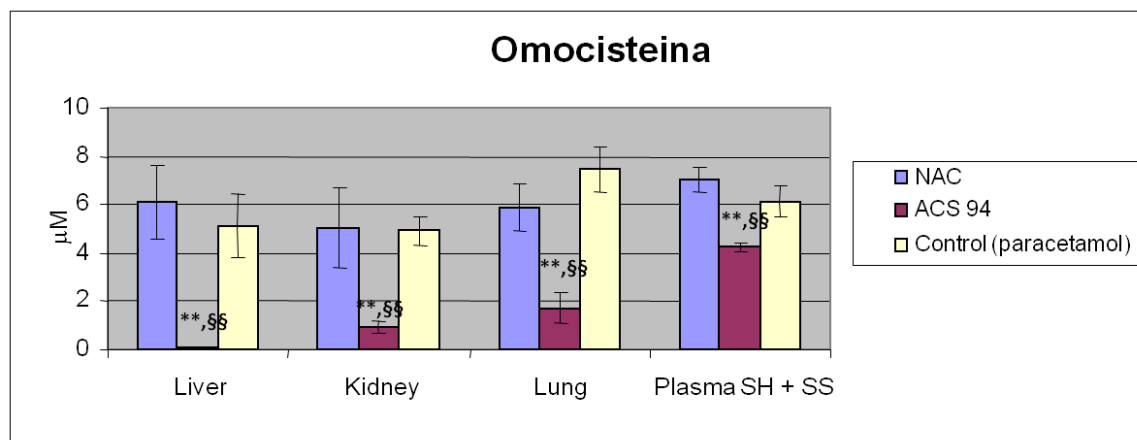


Figura 31. Concentrazioni dei tioli proteici dopo trattamento di ratti per os con NAC (50 mg/kg; n=3), ACS 94 (equimolare; n=3) o veicolo (n=4), 15 min prima e 2h e 4h dopo trattamento ip con paracetamolo (1g/kg). Valori medi \pm S.E.
 ** p<0.01 vs NAC; * p<0.05 vs NAC; §§ p<0.01 vs controllo; § p<0.05 vs controllo.

Inoltre, il trattamento con ACS 94 provoca una diminuzione di Hcy più significativa in alcuni organi target e nel plasma, rispetto a quelli trattati con NAC o con il solo veicolo (fig. 34).

Figura 32. Concentrazioni di Hcy dopo trattamento di ratti per os con NAC (50 mg/kg; n=3), ACS 94 (equimolare; n=3) o veicolo (n=4), 15 min prima e 2h e 4h dopo trattamento ip con paracetamolo (1g/kg). Valori medi \pm S.E.

** p<0.01 vs NAC; * p<0.05 vs NAC; §§ p<0.01 vs controllo; § p<0.05 vs controllo.



Anche i parametri ematici riportati in Tabella 2 indicano una maggiore capacità, da parte di ACS 94 rispetto a NAC, nel contrastare gli effetti tossici indotti dal trattamento con paracetamolo.

	Urea mg/dl	Creatinine mg/dl	GOT/AST U/L	GPT/ALT U/L	LDH U/L	Uric acid mg/dl
Control	41\pm2	0.37\pm0.01	70\pm3.04	60\pm9.23	743\pm68.6	0.30\pm0.01
Paracetamol	43\pm2.1	0.53\pm0.02	756\pm8	82\pm3.35	4801\pm371	0.66\pm0.08
Paracetamol +NAC	32\pm3.25	0.43\pm0.58	642\pm36.3	78\pm14.2	4102\pm217	0.51\pm0.02
Paracetamol + ACS 94	34\pm4.7	0.32\pm0.02	457\pm19.4	68\pm6.64	3459\pm108	0.43\pm0.03

Tabella 2. Parametri ematici dopo trattamento di ratti per os con NAC (50 mg/kg; n=3), ACS 94 (equimolare; n=3) o veicolo (n=4), 15 min prima e 2h e 4h dopo trattamento ip con paracetamolo (1g/kg). Valori medi \pm S.E.

Tutti questi risultati, ancorchè necessitino di ulteriori approfondimenti, sembrano confermare l'ipotesi iniziale di questo lavoro e cioè l'esistenza di un effetto sinergico tra la componente tiolica e la componente ditioltionica di questo ibrido, che si dimostra quindi più efficace della NAC nel prevenire l'epatotossicità indotta da paracetamolo. Si ricorda che proprio la NAC è considerata il farmaco di elezione, utilizzato in caso di sovradosaggio da paracetamolo.

Sarà inoltre interessante vedere come le piccole differenze strutturali presenti in ACS 96 e ACS 97, che abbiamo ritrovato essere metaboliti di ACS 94 e che dovrebbero andare ad incidere soprattutto sulle proprietà farmacocinetiche, potranno influire sulla biodisponibilità e sui livelli e sulla distribuzione dei vari tioli. ACS 94 o i suoi derivati ACS 96 e ACS97 potrebbero quindi rappresentare un utile strumento per il controllo dell'iperomocisteinemia, e per la protezione epatica e renale da agenti tossici.

5. CONCLUSIONI

La recente scoperta del ruolo biologico dell'idrogeno solforato ha portato ad ipotizzare un potenziale uso terapeutico di questo gas in patologie caratterizzate da una componente infiammatoria e/o da aumentato stress ossidativo. A questo scopo, particolarmente utili sembrano essere molecole in grado di rilasciare in vivo H_2S in modo controllato e risultati particolarmente interessanti sono stati riportati nell'utilizzo di ibridi di farmaci noti con molecole donatrici di questo gas.

Il lavoro di ricerca oggetto della presente tesi si è quindi focalizzato principalmente sulla sintesi di nuovi " H_2S -releasing drugs", potenzialmente utili per il trattamento di malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson e la malattia di Alzheimer, ma anche in patologie polmonari e del sistema cardiovascolare, caratterizzate da un alterato metabolismo dell'omocisteina e/o da un aumentato stress ossidativo.

Sono stati quindi sintetizzati alcuni ibridi di L-DOPA donatori di H_2S che, a differenza del "parent compound", hanno dimostrato significativi effetti neuroprotettivi in modelli in vitro. Studi in vivo, eseguiti su uno di questi composti, ACS84, hanno evidenziato la capacità di quest'ultimo di aumentare i livelli cerebrali di dopamina in maniera nettamente superiore a quanto accade con dosi

equimolari di L-DOPA, inducendo al contempo un importante aumento del GSH intracellulare, responsabile delle proprietà neuroprotettive.

I risultati ottenuti delineano quindi un profilo farmacologico nettamente favorevole per questa nuova classe di composti rispetto a quello di L-DOPA, indicandoli come potenziali candidati per il trattamento del morbo di Parkinson. Naturalmente ulteriori studi sono necessari per chiarire gli effetti di questi composti in un trattamento a lungo termine.

Sono state inoltre sintetizzate alcune molecole contenenti cisteina legata ad un residuo ditiolionico allo scopo di verificare l'esistenza di un effetto sinergico da parte delle due porzioni solforate, presenti contemporaneamente nella nuova molecola, sull'aumento della concentrazione ematica di H₂S e della concentrazione di GSH in organi chiave come il fegato, i polmoni e il rene, inducendo contemporaneamente la riduzione dei livelli di omocisteina nel plasma ed in alcuni organi target.

I dati farmacologici al momento disponibili confermano la validità dell'ipotesi ed indicano che ACS 94 ha un potenziale protettivo nei confronti dell'epatotossicità indotta da paracetamolo superiore a quella della N-acetilcisteina, considerata attualmente il farmaco di riferimento.

Questi derivati potrebbero quindi rappresentare un utile strumento per il controllo dell'iperomocisteinemia e per la protezione epatica e renale da agenti tossici.

In conclusione, gli "H₂S-releasing drugs", sintetizzati nell'ambito della presente tesi, hanno mostrato, attraverso il rilascio e la modulazione di H₂S *in vivo*, importanti proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie e citoprotettive, pur mantenendo le proprietà farmacologiche del farmaco di partenza. Tali dati confermano l'efficacia di questo approccio e la potenziale utilità dei nuovi composti nel trattamento delle numerose e diverse patologie in cui sia presente una componente infiammatoria e/o uno squilibrio ossido-riduttivo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Winyard P. G.; Willoughby D. "5 Key Stages in the Acute Inflammatory Response and Their Relevance as Therapeutic Targets". (Eds). *Humana Press, NJ, USA, 2003*.
2. Li L.; Hsu A.; Moore P. K. "Actions and interactions of nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulphide in the cardiovascular system and in inflammation— a tale of three gases!" *Pharmacol. Ther.*, **2009**, 123, 386–400.
3. Li L.; Bhatia M.; Moore P. K. "Hydrogen sulphide – a novel mediator of inflammation?" *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2006**, 6, 125–129.
4. Pryor W. A.; Houk K. N.; Foote C. S.; Fukuto J. M.; Ignarro L. J.; Squadrito G. L.; Davies K. J. "Free radical biology and medicine: it's a gas, man!" *Am J Physiol*, **2006**, 291, R491-R511.
5. Goodwin L. R.; Francom D.; Dieken F. P.; Taylor J. D.; Warencia M. W.; Reiffenstein R. J.; Dowling G. "Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports". *J. Anal. Toxicol.*, **1989**, 13, 105-109.
6. Savage J. C.; Gould D. H. "Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, **1990**, 526, 540-545.
7. Warencia M. W.; Goodwin L. R.; Benishin C. G.; Reiffenstein R. J.; Francom D. M.; Taylor J. D.; Dieken F. P. "Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels". *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, 38, 973-981.
8. Doeller J. E.; Isbell T. S.; Benavides G.; Koenitzer J.; Patel H.; Patel R. P.; Lancaster J. R. Jr.; Darley-Usmar V. M.; Kraus D. W. "Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues". *Anal. Biochem.*, **2005**, 341, 40-51.
9. Fiorucci S.; Distrutti E.; Cirino G. & Wallace J. L. "The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver." *Gastroenterology*, **2006**, 131, 259-271
10. Ubuka T. "Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues". *J. Chromatogr.*, **2002**, B 781, 227-249.
11. Furne J.; Saeed A.; Levitt M. D. "Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values". *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2008**, 295, R1479-1485.
12. Abe K.; Kimura H.; "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator" *J Neurosci.*, **1996**, 16, 1066-1071

13. Hosoki R.; Matsuki N.; Kimura H. "The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 237, 527-531.
14. Shibuya N.; Tanaka M.; Yoshida M.; Ogasawara Y.; Togawa T.; Ishii K.; Kimura H. "3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain". *Antioxid. Redox. Signal.*, **2009**, 11, 703-714.
15. Wang R. "Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?" *FASEB J.*, **2002**, 16, 1792-1798
16. Ishii I.; Akahoshi N.; Yu X.; Kobayashi Y. Namekata K.; Komaki G.; Kimura H. "Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression." *Biochem. J.*, **2004**, 381, 113-123
17. Kamoun P. "Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals." *Amino Acids*, **2004**, 26, 243-254
18. Puranik M.; Weeks C. L.; Lahaye D.; Kabil O.; Taoka S.; Nielsen S. B.; Groves J. T.; Banerjee R.; Spiro T. G. "Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine B-synthase." *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281, 13433-13438
19. Miles E. W. & Kraus J. P. "Cystathionine β-synthase: structure, function, regulation, and location of homocystinuria-causing mutations." *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 29871-29874
20. Furne J.; Springfield J.; Koenig T.; DeMaster E. & Levitt M. D. "Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa." *Biochem. Pharmacol.*, **2001**, 62, 255-259
21. Searcy D. G. & Lee S. H. "Sulfur reduction by human erythrocytes." *J. Exp. Zool.*, **1998**, 282, 310-322
22. Li L.; Moore P. K. "Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air?" *Trends Pharmacol. Sci.*, **2008**, 29, 84-90
23. Zhao W.; Ndisang J. F.; Wang R. "Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues". *Can J Physiol Pharmacol.*, **2003**, 81, 848-53.
24. Xiao L.; Wu Y. M.; Zhang H.; Liu Y. X.; He R. R. "Hydrogen sulfide facilitates carotid sinus baroreflex in anesthetized rats". *Acta. Pharmacol. Sin.*, **2006**, 27, 294-298.
25. Bhatia M.; Zhi L.; Zhang H.; Ng S. W.; Moore P. K. "Role of substance P in hydrogen sulfide-induced pulmonary inflammation in mice". *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **2006**, 291, L896-904.
26. Yang G.; Wu L.; Jiang B.; Yang W.; Qi J.; Cao K.; Meng Q.; Mustafa A. K.; Mu W.; Zhang S.; Snyder S. H.; Wang R. "H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase". *Science.*, **2008**, 322, 587-590.

27. Kimura Y.; Kimura H. "Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress." *FASEB J*, **2004**, 18, 1165–1167.
28. Whiteman M.; Armstrong J. S.; Chu S. H.; Jia-Ling S.; Wong B. S.; Cheung N. S.; Halliwell B.; Moore P. K. "The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite "scavenger"?" *J. Neurochem.*, **2004**, 90, 765-768.
29. Esechie A.; Kiss L.; Olah G.; Horváth E. M.; Hawkins H.; Szabo C.; Traber D. L. "Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation". *Clin. Sci. (Lond.)*, **2008**, 115, 91-97.
30. Kimura Y.; Dargusch R.; Schubert D.; Kimura H. "Hydrogen sulfide protects HT₂₂ neuronal cells from oxidative stress." *Antioxid Redox Signal*, **2006**, 8, 661–670.
31. Muzaffar S.; Jeremy J. Y.; Sparatore A.; Del Soldato P.; Angelini G. D.; Shukla N. Br. "H₂S-donating sildenafil (ACS6) inhibits superoxide formation and gp91phox expression in arterial endothelial cells: role of protein kinases A and G". *J. Pharmacol.*, **2008**, 155, 984.
32. Wei H. L.; Zhang C. Y.; Jin H. F.; Tang C. S.; Du J. B. "Hydrogen sulfide regulates lung tissue-oxidized glutathione and total antioxidant capacity in hypoxic pulmonary hypertensive rats". *Acta. Pharmacol. Sin.*, **2008**, 29, 670-679.
33. Yang G.; Sun X. "Wang R. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3". *FASEB J.*, **2004**, 18, 1782-1784.
34. Lu M.; Hu L. F.; Hu G.; Bian J. S. "Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake". *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, 45, 1705-1713.
35. Lee S.W.; Hu Y. S.; Hu L. F.; Lu, Q.; Dawe G. S.; Moore P. K.; Wong P. T.; Bian J. S. "Hydrogen sulphide regulates calcium homeostasis in microglial cells." *Glia*. **2006**, 54, 116.
36. Qingyou Z.; Junbao D.; Weijin Z.; Hui Y.; Chaoshu T.; Chunyu Z. "Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension". *Biochem. Res. Commun.*, **2004**, 317, 30-37
37. Oh G. S.; Pae H. O.; Lee B. S.; Kim B. N.; Kim J. M.; Kim H. R.; Jeon S. B.; Jeon W. K.; Chae H. J.; Chung H. T. "Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-κB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide." *Free Radic. Biol. Med.*, **2006**, 41, 106-119
38. Ryter S. W.; Alam J. & Choi A. M. "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications." *Physiol. Rev.*, **2006**, 86, 583-650

39. Dawe G. S.; Han S. P.; Bian J. S.; Moore P. K. "Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats". *Neuroscience*, **2008**, 152, 169-177.
40. Perrino E.; Cappelletti G.; Tazzari V.; Giovini E.; Del Soldato, P.; Sparatore A. "New sulfurated derivatives of valproic acid with enhanced histone deacetylase inhibitory activity". *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 1893-1897.
41. Yang G.; Wu L.; Wang R. "Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells." *FASEB J.*, **2006**, 20, 553-555
42. Rinaldi L.; Gobbi G.; Pambianco M.; Micheloni C.; Mirandola P.; Vitale M. "Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase 3." *Lab. Invest.*, **2006**, 86, 391-397
43. Elrod J. W.; Calvert J. W.; Morrison J.; Doeller J. E.; Kraus D. W.; Tao L.; Jiao X.; Scalia R.; Kiss L.; Szabo C.; Kimura H.; Chow C. W.; Lefer D. J. "Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function." *Proc Natl Acad Sci USA*, **2007**, 104, 15560-15565
44. Nicholls P. "Inhibition of cytochrome c oxidase by sulphide." *Biochem Soc Trans*, **1975**, 3, 316-319
45. Eto K.; Kimura H. "A novel enhancing mechanism for hydrogen sulfide-producing activity of cystathionine γ -synthase." *J Biol Chem*, **2002**, 277, 42680–42685.
46. Kimura H. "Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor." *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**, 267, 129–133.
47. Lowicka E.; Beltowski J. "Hydrogen sulphide(H₂S)-The third gas of interest for pharmacologists." *Pharmacological reports*, **2007**, 59, 4-24.
48. Nagai Y.; Tsugane M.; Oka J.; Kimura H. "Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes." *FASEB J*, **2004**, 18, 557–559.
49. Marcotte P. & Walsh C. "Active site-directed inactivation of cystathionine γ -synthetase and glutamic pyruvic transaminase by propargylglycine." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, 62, 677-682.
50. Teague B.; Asiedu S. & Moore P. K. "The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility." *Br. J. Pharmacol*, **2002**, 137, 139-145.
51. Belardinelli M. C.; Chabli A.; Chadeaux-Vekemans B.; Kamoun P. "Urinary sulfur compounds in Down syndrome." *Clin Chem*, **2001**, 47, 1500–1501.
52. Chadeaux B.; Ceballos I.; Hamet M.; Coude M.; Poissonnier M.; Kamoun P.; Allard D. "Is absence of atheroma in Down syndrome due to decreased homocysteine levels?" *Lancet*, **1988**, 2, 741.
53. Kamoun P. "Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis." *Med Hypotheses*, **2001**, 57, 389–392.

54. Qu K.; Chen C. P.; Halliwell B.; Moore P. K.; Wong P. T. "Hydrogen sulfide is a mediator of cerebral ischemic damage." *Stroke*, **2006**, 37, 889–893.
55. Wong P. T.; Qu K.; Chimon G. N.; Seah A. B.; Chang H. M.; Wong M. C. Ng Y. K. "High plasma cysteine level may indicate poor clinical outcome in patients with acute stroke: possible involvement of hydrogen sulfide." *J Neuropathol Exp Neurol*, **2006**, 65, 109–115.
56. Whiteman M.; Armstrong J. S.; Chu S. H.; Jia-Ling S.; Wong B. S.; Cheung N. S.; Halliwell B. "The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?" *J Neurochem*, **2004**, 90, 765–768.
57. Whiteman M.; Cheung N. S.; Zhu Y. Z.; Chu S. H.; Siau J. L.; Wong B. S.; Armstrong J. S. "Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain?" *Biochem Biophys Res Commun*, **2005**, 326, 794–798.
58. Eto K.; Asada T.; Arima K.; Makifuchi T.; Kimura H. "Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease." *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**, 293, 1485–1488.
59. McGeer P. L.; McGeer E. G. "Glial reactions in Parkinson's disease." *Mov Disord*, **2008**, 23, 474–483.
60. Tansey M. G.; McCoy M. K.; Frank-Cannon T. C. "Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention." *Exp Neurol*, **2007**, 208, 1–25.
61. Hu L. F.; Lu M.; Tiong C. X.; Dawe G. S.; Hu, G.; Bian, J. S. "Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models." *Aging Cell*, **2010**, 9, 135-146.
62. Zhao W.; Wang R. "H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms." *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2002**, 283, H474–H480.
63. Kubo S.; Doe I.; Kurokawa Y.; Kawabata A. "Hydrogen sulfide causes relaxation in mouse bronchial smooth muscle." *J. Pharmacol Sci.*, **2007**, 104, 392-396.
64. Zhao W.; Zhang J.; Lu Y & Wang R. "The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener." *EMBO J.*, **2001**, 20, 6008-6016.
65. Koenitzer J. R.; Isbell T. S.; Patel H. D.; Benavides G. A.; Dickinson D. A.; Patel R. P.; Darley-Usmar V. M.; Lancaster J. R. Jr.; Doeller J. E.; Kraus D. W. "Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an oxygen dependent manner." *Am J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **2007**, 292, H1953-H1960.
66. Geng B.; Yang J.; Qi Y.; Zhao J.; Pang Y.; Du J.; Tang C. "H₂S generated by heart in rat and his effects on cardiac function. Biochem." *Biophys. Res. Commun.*, **2004**, 313, 362-368.

67. Cai W. J.; Wang M. J.; Moore P. K.; Jin H. M.; Yao T.; Zhu Y. C. "The novel proangiogenic effect of hydrogen sulfide is dependent on Akt Phosphorylation." *Cardiovasc Res*, **2007**, *76*, 29-40.
68. Lefer D. J. "A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide." *PNAS*, **2007**, *104*, 17907-17908.
69. Pan T. T.; Feng Z. N.; Lee S. W.; Moore P. K. & Bian, J. S. "Endogenous hydrogen sulfide contributes to the cardioprotection by metabolic inhibition preconditioning in the rat ventricular myocytes." *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **2006**, *40*, 119-130.
70. Johansen D.; Ytrehus K. & Baxter G. F. "Exogenous hydrogen sulfide protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury-evidence for a role of K_{ATP} channels." *Basic. Res. Cardiol.*, **2006**, *101*, 53-60.
71. Sivarajah A.; McDonald M. C. & Thiemermann C. "The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat." *Shock*, **2006**, *26*, 154-161.
72. Bian J.S.; Yong Q. C.; Pan T. T.; Feng Z. N.; Ali M. Y.; Zhou S.; Moore P. K. "Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, *316*, 670-678.
73. Auchampach J. A.; Maruyama M.; Cavero I. & Gross, G. J. "Pharmacological evidence for a role of ATP-dependent potassium channels in myocardial stunning." *Circulation*, **1992**, *86*, 311-319.
74. Toombs C. F.; Moore T. L. & Shebuski R. J. "Limitation of infarct size in the rabbit by ischemic preconditioning is reversible with glibenclamide." *Cardiovasc. Res.*, **1993**, *27*, 617-622.
75. Zanardo R. C.; Brancaleone V.; Distrutti E.; Fiorucci S.; Cirino G.; Wallace J. L. "Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation" *FASEB J*, **2006**, *20*, 2118-2120.
76. Zagli G.; Patacchini R.; Trevisani M.; Abbate R.; Cinotti S.; Gensini G. F.; Masotti G.; Geppetti P. "Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation." *Eur. J. Pharmacol.*, **2007**, *559*, 65-68.
77. Bianchi C.; Wakiyama H.; Faro R.; Khan T.; McCully J. D.; Levitsky S.; Szabo C.; Selke F. W. "A novel peroxy nitrite decomposer catalyst (FP-15) reduces myocardial infarct size in an in vivo peroxy nitrite decomposer and acute ischemia-reperfusion in pigs." *Ann. Thorac. Surg.*, **2002**, *74*, 1201-1207.
78. Blom H. J.; Smulders Y. "Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects". *J. Inher. Metab. Dis.*, **2011**, *34*, 75-81.
79. McCully K. S. "Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis". *Am. J. Pathol.*, **1969**, *56*, 111-28.

80. Herrmann W.; Herrmann M.; Obeid R. "Hyperhomocysteinemia: a critical review of old and new aspects". *Curr. Drug. Metab.*, **2007**, 8, 17-31.
81. Lipton S. A.; Kim W. K.; Choi Y. B.; Kumar S.; D'Emilia D. M.; Rayudu P. V. et al. "Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 5923-8.
82. Parsons R. B.; Waring R. H.; Ramsden D. B.; Williams A. C. "In vitro effect of the cysteine metabolites homocysteic acid, homocysteine and cysteic acid upon human neuronal cell lines". *Neurotoxicology*. **1998**, 19, 599–603.
83. Kim J. P.; Koh J. Y.; Choi D. W. "L-homocysteate is a potent neurotoxin on cultured cortical neurons". *Brain Res.*, **1987**, 437, 103–10.
84. Kruman I. I.; Culmsee C.; Chan S. L.; Kruman Y.; Guo Z.; Penix L. et al. "Homocysteine elicits a DNA damage response in neurons that promotes apoptosis and hypersensitivity to excitotoxicity". *J Neurosci.*, **2000**, 20, 6920–6926.
85. Ho P. I.; Ortiz D.; Rogers E.; Shea T. B. "Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage". *J Neurosci Res.*, **2002**, 70, 694–702.
86. Baydas G.; Reiter R. J.; Akbulut M.; Tuzcu M.; Tamer S. "Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels". *Neuroscience*, **2005**, 135, 879–86.
87. Linnebank M.; Lutz H.; Jarre E.; Vielhaber S.; Noelker C.; Struys E. et al. "Binding of copper is a mechanism of homocysteine toxicity leading to COX deficiency and apoptosis in primary neurons, PC12 and SHSY-5Y cells". *Neurobiol Dis.*, **2006**, 23, 725–30.
88. White A. R.; Huang X.; Jobling M. F.; Barrow C. J.; Beyreuther K.; Masters C. L.; et al. "Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways". *J Neurochem.*, **2001**, 76, 1509–20.
89. Dwyer B. E.; Raina A. K.; Perry G.; Smith M. A. "Homocysteine and Alzheimer's disease: a modifiable risk?". *Free Radic Biol Med.*, **2004**, 36, 1471–5.
90. Loscalzo J. "Homocysteine trials-clear outcomes for complex reasons". *New Engl. J. Med.*, **2006**, 354, 1629-32.
91. Maron B. A.; Loscalzo J. "The treatment of hyperhomocysteinemia". *Annu. Rev. Med.*, **2009**, 60, 39-54.
92. Kruger W. D. "The transsulfuration pathway". In: Carmel R.; Jacobsen D. W.; eds. "Homocysteine in health and disease"; *Cambridge University Press, Cambridge.*, **2001**, 153-61.

93. Tang X. Q.; Shen X. T.; Huang Y. E.; Ren Y. K., Chen R. Q.; Hu B. et al. "Hydrogen sulfide antagonizes homocysteine-induced neurotoxicity in PC12 cells". *Neurosci Res.*, **2010**, 68, 241–9.
94. Ventura P.; Panini R.; Abbati G.; Marchetti G.; Savioli G. "Urinary and plasma homocysteine and cysteine levels during prolonged oral N-acetylcysteine therapy". *Pharmacology*, **2003**, 68, 105-14.
95. Urquhart B. L.; Freeman D. J.; Cutler M. J.; Mainra R.; Spence, J. D.; House A. A. "Mesna for treatment of hyperhomocysteinemia in hemodialysis patients: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial". *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **2008**, 3, 1041-7.
96. Hamelet J.; Demuth K.; Paul J. L.; Delabar J. M. & Janel N. "Hyperhomocysteinemia due to cystathionine β synthase deficiency induces dysregulation of genes involved in hepatic lipid homeostasis in mice." *J. Hepatol.*, **2007**, 46, 151-159.
97. Benavides G. A.; Squadrito G. L.; Mills R. W.; Patel H. D.; Isbell T. S.; Patel R. P.; Darley-Usmar V. M.; Doeller J. E.; Kraus D. W. "Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic". *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.*, **2007**, 104, 17977.
98. Chuah S. C.; Moore P. K.; Zhu Y. Z. "S-allylcysteine mediates cardioprotection in an acute myocardial infarction rat model via a hydrogen sulfide-mediated pathway". *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2007**, 93, H2693.
99. Shaik I. H.; George J. M.; Thekkumkara T. J.; Mehvar R. "Protective effects of diallyl sulfide, a garlic constituent, on the warm hepatic ischemia-reperfusion injury in a rat model". *Pharm. Res.*, **2008**, 25, 2231.
100. Jacob C.; Anwar A.; Burkholz T. "Perspective on recent developments on sulfur-containing agents and hydrogen sulfide signalling". *Planta Med.*, **2008**, 74, 1580-92.
101. Laudis P. S. "The chemistry of 1,2-dithiole-3-thiones." *Chem. Rev.*, **1995**, 65, 238-249.
102. Breslow D. S.; Skolnik H. "1,2-Dithiole-3-thione and related compounds, in "Multi-sulfur and sulphur and oxygen five and six-membered heterocycles." *Interscience Pub., New York*, **1966**, part1, 347-405.
103. Pedersen C. T. "1,2-Dithiole-3-thiones and 1,2-dithiole-3-ones." *Adv. Heterocycle Chem.*, **1982**, 31, 63-113.
104. Christen M. O. "Anethole dithiolethione: biochemical considerations." *Methods in Enzymology*, **1995**, 252, 316-323.
105. Warnet J. M.; Christen M. O.; Thevenin M.; Biard D.; Jacqueson A.; Claude J. R. "Protective effects of anethole dithiolethione against acetaminophen hepatotoxicity in mice." *Pharmacol. Toxicol.*, **1989**, 65, 63-64.

106. Batzinger R. P.; Bueding B. "Antimutagenic effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole and of antimicrobial agents." *Cancer Res.*, **1978**, 38, 4478-4485.
107. Benson A. M.; Cha Y. N.; Bueding E.; Heine H. S.; Talalay P. "Elevation of extrahepatic glutathione-S-transferase and epoxide hydratase activities by 2-(3)tert-butyl-4-hydroxyanisole." *Cancer Res.*, **1979**, 39, 2971-2977.
108. De Long M.; Dolan P.; Santamaria A.B; Bueding E. "1,2-Dithiol-3-thione analogs: effects on NAD(P)H-quinone reductase and glutathione levels in murine hepatoma cells." *Carcinogenesis*, **1986**, 7, 977-980.
109. Sen C. K.; Traber K. E.; Packer L. "Inhibition of NF-kB activation in human T-cell lines by anetholdithiolthione." *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **1996**, 218, 148-153.
110. Cho K. H.; Pezzuto J. M.; Bolton J. L.; Steele V. E.; Kelloff G. J.; Lee S. K.; Constantinou A. "Selection of cancer chemopreventive agents based on inhibition of topoisomerase II activity." *European Journal of Cancer*, **2000**, 36, 2146-2156.
111. Distrutti E.; Sediari L.; Mencarelli A.; Renga B.; Orlandi S.; Russo G.; Caliendo G.; Santagada V.; Cirino G.; Wallace J. L.; Fiorucci S. "5-amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-[1,2]dithiol-3yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalamine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity." *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, 319, 447-458.
112. Li L.; Rossoni G.; Sparatore A.; Lee L. C.; Del Soldato P.; Moore P. K. "Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative". *Free Radic. Biol. Med.*, **2007**, 42, 706-719.
113. Rossoni G.; Sparatore A.; Tazzari V.; Manfredi B.; Del Soldato P.; Berti, F. "The hydrogen sulphide-releasing derivative of diclofenac protects against ischaemia-reperfusion injury in the isolated rabbit heart". *Br. J. Pharmacol.*, **2008**, 153, 100-109.
114. Sparatore A.; Perrino E.; Tazzari V.; Giustarini D.; Rossi R.; Rossoni G.; Erdmann K.; Schröder H.; Del Soldato P. "Pharmacological profile of a novel H₂S-releasing aspirin". *Free Radic. Biol. Med.*, **2009**, 46, 586-592.
115. Lee M.; Sparatore A.; Del Soldato P.; McGeer E.; McGeer P. L. "Hydrogen Sulfide-releasing NSAIDs attenuate neuroinflammatory induced by microglial and astrocytic activation". *GLIA*, **2010**, 58, 103-113.
116. Giustarini D.; Del Soldato P.; Sparatore A.; Rossi R. "Modulation of thiol homeostasis induced by H₂S-releasing aspirin". *Free Radic. Biol. Med.*, **2010**, 48, 1263-1272.
117. Sparatore A.; Santus G.; Giustarini D.; Rossi R.; Del Soldato P. "Therapeutic potential of new hydrogen sulfide-releasing hybrids". *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, **2011**, 4, 109-121.

118. Sabayan B. et al. "Phosphodiesterase-5 inhibitors: novel weapons against Alzheimer's disease?". *International Journal of Neuroscience*, **2010**, 120, 746-751.
119. Fahn S. "An open trial of high-dosage antioxidants in early Parkinson's disease". *Am. J. Clin. Nutr.*, **1991**, 53, Suppl. 1, 380S–382S.
120. Rascol O.; Brooks D. J.; Korczyn A. D.; De Deyn P. P.; Clarke C. E.; Lang A. E. "A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group". *N. Engl. J. Med.*, **2000**, 342, 1484–1491.
121. Jenner P. "Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia". *Nat. Rev. Neurosci.* **2008**, 9, 665–677.
122. Lau D. H.; Kommu S.; Mumtaz F. H.; Morgan R. J.; Thompson C. S.; Mikhailidis D. P. "The management of phosphodiesterase-5 (PDE5) inhibitor failure". *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **2006**, 4, 89-93.
123. Vlachopoulos C.; Terentes-Printzios D.; Ioakeimidis N.; Rokkas K.; Stefanadis C. "PDE5 inhibitors in non-urolological conditions"; *Curr Pharm Des.*, **2009**, 15, 3521-39.
124. Tazzari V. "Modulazione dell'attività di farmaci noti mediante formazione di derivati arilditiolionici e cisteinici". *Tesi di laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche*, Milano, a.a. **2003/2004**.
125. Shukla N.; Rossoni G.; Hotston M.; Sparatore A.; Del Soldato P.; Tazzari V.; Persad R.; Angelini G. D.; Jeremy Y. "Effect of hydrogen sulphide-donating sildenafil (ACS6) on erectile function and oxidative stress in rabbit isolated corpus cavernosum and in hypertensive rats"; *BJU International*, **2009**, 103, 1522- 29.
126. Lee M.; Tazzari V.; Giustarini D.; Rossi R.; Sparatore A.; Del Soldato P.; McGeer E.; McGeer P. L. "Effects of hydrogen sulfide-releasing L-DOPA derivatives on glial activation: potential for treating Parkinson disease". *The Journal of Biological Chemistry*, **2010**, 285, 17318–17328.
127. Wegler R.; Kuhle E. "Reactions of sulphur with arylaliphatic as well as with aliphatic compounds". *Angew. Chem.*, **1958**, 70, 351-367.
128. Schmitt J.; Suquet M. "Preparations de quelques 1,2-dithioles-3-thiones nouvelles. Quelques reactions classiques s'appliquant à ces composés". *Bulletin de la Société Chimique de France*, **1955**, 84-87.
129. Russel Melby L.; Shippard W. A. "An improved Synthesis of tetrathiafulvalene". *J. Org. Chem.*, **1974**, 39, 2456-2458.
130. Klingsberg E. "The 1,3-dithiolium cation and some related dithioles". *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, 86, 5290-5292.
131. Adelaere B.; Guemas, J. P. "Nouvelles aryl-4 3H-dithiole-1,2 thiones-3 par reaction du soufre liquid sur les cumenes fonctionnalisées, sels de dithiolylium derives". *Sulphur Letters*, **1989**, 10, 31-36.

132. Lozac'h N.; Mollier Y. "Sulfuration of organic compounds". *Il Bulletin de la Societe Chimique de France*, **1950**, 1243-1244.
133. Hayashi S.; Ueki H.; Harano S.; Komiya J.; Iyama S.; Harano K.; Miyata K.; Niigata K.; Yonemura Y. "Studies on antitumor substance. Synthesis of Bis(Methanesulphonylthio)alkanes". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1964**, 12, 1271-1276.
134. Kim D. K. et al. "Synthesis and phosphodiesterase inhibitory activities of new sildenafil analogues containing a carboxylic acid group in the 5'-sulfonamide moiety of a phenyl ring". *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, 9, 3013-3021.
135. Bell A. S.; Brown D.; Terrett N. K. "PyrazoloPyrimidinone antianginal agents". *Patent US5346901*, **1994**.
136. Nowakowski M.; Gehrling R.; Heilmann W.; Wahl K. "Process for the preparation of sulphonamide-substituted imidazotriazinones". *Patent US2002137930*, **2002**.
137. Martinelli M. J.; Doecke C. W.; Pawlak J. M.; Chelius E. K. "Modified Pictet-Splengler reaction and products prepared therefrom". *Patent WO2004011463*, **2004**.
138. Bolzati C.; Mahmood A.; Malagò E.; Uccelli L.; Boschi A.; Jones A. G.; Refosco F.; Duatti A.; Tisato F. "The [99mTc(N)(PNP)]²⁺ Metal Fragment: A Technetium-Nitrido Synthron for Use with Biologically Active Molecules. The N-(2-Methoxyphenyl)piperazyl-cysteine Analogues as Examples". *Bioconjugate Chem.*, **2003**, 14, 1231-1242.
139. Walters M. A.; Chaparro J.; Siddiqui T.; Williams F.; Ulku C.; Rheingold A. L. "The formation of disulfides by the [Fe(eta)Cl₂]₂ catalyzed air oxidation of thiols and dithiols". *Inorganica Chimica Acta*, **2006**, 359, 3996-4000.
140. Pattabiraman V. R.; McKinnie S. M. K.; Vederas J.C. "Solid-Supported Synthesis and Biological Evaluation of the Lantibiotic Peptide Bis(desmethyl) Lacticin 3147 A^{2**}". *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 9472-9475.