



Centro Stampa

ATTENZIONE QUESTI APPUNTI SONO OPERA DI STUDENTI , NON SONO STATI VISIONATI DAL DOCENTE. IL NOME DEL PROFESSORE, SERVE SOLO PER IDENTIFICARE IL CORSO.

N° 3489

**CHIMICA FARMACEUTICA E TOSSICOLOGICA 2
2013-2014**

DI FABIANA

***CHIMICA
FARMACEUTICA E
TOSSICOLOGICA II***

Sbobine complete di slides

Prove esame

Anno scolastico 2013-2014

Prof. Cena, Di Stilo

PROGRAMMA DI CHIMICA FARMACEUTICA E TOSSICOLOGICA I

Descrizione sistematica dei farmaci per le patologie del sistema nervoso, cardiovascolare, endocrino e immunitario.

Introduzione: Componenti cellulari; composti chimici endogeni ed esogeni; biomacromolecole; neurotrasmettitori, ormoni e vitamine; recettori.

Farmaci attivi su neurotrasmettitori ed enzimi: colinergici; adrenergici; serotoninergici; aminoacidergici. Inibitori della conduzione nervosa. Inibitori delle fosfodiesterasi.

Agenti farmacodinamici attivi sul SNC: anestetici generali; sedativo-ipnotici; anticonvulsivanti; antidepressivi; antipsicotici e ansiolitici; allucinogeni e stimolanti, farmaci oppioidi; antiparkinsoniani and spasmolitici.

Agenti farmacodinamici attivi sul sistema cardiovascolare: farmaci cardiaci; diuretici; ACE-inibitori; calcio bloccanti. Simpaticolitici e vasodilatatori; antiiperlipoproteinemici; farmaci per il sangue.

Farmaci attivi sul sistema endocrino: antidiabetici; ormoni steroidei; farmaci per la tiroide e l'omeostasi del calcio.

Farmaci attivi sul sistema immunitario: anti-infiammatori; antiistaminici, antiallergici e antiulcera.

Agenti di contrasto e radiofarmaci.

Classificazione dei farmaci secondo il sistema ATC

Riposizionamento dei composti studiati nella parte sistematica. Databases.

Metodologie di sintesi organica di molecole farmacologicamente attive

Esempi di procedimenti sintetici classici. Metodologie di *drug discovery*. Biotecnologie farmaceutiche. Farmaci peptidici e proteici.

Farmacocinetica e analisi dei farmaci nei fluidi biologici

Studio della determinazione di farmaci nei compartimenti biologici in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche. Parametri farmacocinetici. Solubilità, estrazione, analisi di farmaci.

CHIMICA FARMACEUTICA E TOSSICOLOGICA II

CHIMICA FARMACEUTICA TOSSICOLOGICA II

Testi consigliati:

Materiale didattico del docente
W.O. Foye, Principi di Chimica Farmaceutica, Piccin.
G. L. Patrick, Chimica Farmaceutica, EdiSES.

Modalità di Esame: Prova scritta e prova orale

what? Di che cosa parliamo?

DEFINIZIONE DI CHIMICA FARMACEUTICA (IUPAC):

La Chimica Farmaceutica si occupa della scoperta, dello sviluppo, dell'identificazione ed interpretazione del meccanismo d'azione a livello molecolare di **composti biologicamente attivi**.

Il **farmaco** costituisce il suo oggetto di studio più importante, anche se l'interesse della Chimica Farmaceutica non è limitato ad esso ma comprende le sostanze bioattive in generale.

La Chimica Farmaceutica si occupa anche dello studio, dell'identificazione e della sintesi dei **prodotti del metabolismo** e dei composti ad essi correlati.

La chimica farmaceutica si occupa della scoperta, dello sviluppo, dell'identificazione ed interpretazione del meccanismo a livello molecolare di composti biologicamente attivi. Parleremo soprattutto di farmaci del SNC. Nella seconda parte del corso parleremo dei farmaci che hanno a che fare con il sistema colinergico, adrenergico.

Poi passeremo ai farmaci del SNC e parleremo alla fine della patologia, la seconda parte del corso analizzerà i farmaci attivi sulle diverse patologie.

Il farmaco è l'oggetto di studio più importante, anche i suoi metaboliti possono avere un'azione biologica importante, oppure possiamo avere non solo prodotti di sintesi ma anche prodotti di origine naturale tutti i composti attivi nel trattamento di patologie.

Per identificare un farmaco possiamo dare un nome chimico secondo la nomenclatura IUPAC, possiamo dare la nomenclatura DCI, nome brevettato. Abbiamo visto nella sistematica che l'aspirina, ancora oggi studiata per i suoi meccanismi, è l'esempio di farmaco con diversi nomi, nome brevettato aspirina, nome generico aspirina o acido acetilsalicilico, nome chimico acido 2-acetilossibenzoico, sigla ATC 50-78-2.

La sigla ATC è una sigla, il farmaco può essere catalogato in maniera diversa, la prima lettera fa riferimento all'organo bersaglio (ad esempio A sta per tratto alimentare, B sta per blood quindi sangue), seguita dai due numeri che identificano il gruppo terapeutico, una lettera identifica il sottogruppo terapeutico, seguita da una lettera che ci dice la classe chimica e da due cifre che ci dicono il principio attivo. L'insieme di tutte lettere e numeri, la sequenza identifica il farmaco.

Se il farmaco ha diverse patologie target, diversi organi bersaglio, può avere più codici come nel caso dell'aspirina.

Chim
Farm Toss I

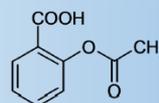
Chim
Farm Toss I

NOMI DEI FARMACI

1. Nome brevettato o depositato; simbolo soprascritto ® (registered trade mark); nome di fantasia
2. Nomenclatura DCI (denominazione comune internazionale) o nome generico; coniato dalla W.H.O. (world health organization)
3. Nome chimico
4. Sigla ATC

Esempio:

NOME BREVETTATO: ASPIRINA®
NOME GENERICO: ASPIRINA,
ACIDO ACETILSALICILICO



NOME CHIMICO: acido 2-(acetilossi)benzoico
SIGLA: 50-78-2 (numero di CAS); A01AD05, B01AC06, N02BA01 (ATC code = classificazione Anatomica Terapeutica Chimica una lettera: organo bersaglio; due cifre: gruppo terapeutico; una lettera: sottogruppo terapeutico-farmacologico; una lettera: classe chimica; due cifre: principio attivo)
B: sangue ed organi emopoietici; **01:** agenti antitrombotici; **A:** antitrombotici; **C:** antiaggreganti piastrinici, eccetto eparina; **06:** aspirina

METODI DI CLASSIFICAZIONE DEI FARMACI (I)

- **Provenienza:** a) dal regno minerale, composti inorganici b) dai regni animale e, soprattutto, vegetale, composti organici c) dalla sintesi chimica d) dalla fermentazione (vitamine, antibiotici, amminoacidi) e) dalla biotecnologia (es. insulina ricombinante).
- **Modalità d'Azione:** a) farmaci eziologici (agiscono direttamente sulla causa della malattia, es. chemioterapici) b) farmaci sostitutivi (es. insulina, estrogeni) c) farmaci impiegati per trattamenti sintomatici (febbre, dolore, insonnia..., ma anche affezioni neuropsichiatriche, cardiovascolari, respiratorie...).
- **Natura della Patologia:** classificazione di tipo fisiologico adottata da OMS, sulla base del "luogo" organico d'azione dei farmaci (SNC, apparato genito-urinario, apparato muscolo-scheletrico...). La suddivisione si riconduce al manuale della classificazione statistica internazionale delle malattie (17 categorie generali complessive).
- **Struttura Chimica:** essenziale in chimica farmaceutica (RSA, progettazione e valutazione biofarmacologica di analoghi strutturali modellati su un lead compound).

Metodi di classificazione dei farmaci

Ci sono diversi modi per classificare i farmaci della sistematica che vedremo insieme.

Tante proposte e tanti punti di partenza possono esserci, fino ad arrivare a quello oggi utilizzato.

Un modo di classificare generale, non utile per noi, è la provenienza, anche se un farmaco si porta dietro ovviamente la sua provenienza. Pochissimi hanno provenienza dal regno minerale, pochi dal regno animale, molti dal regno vegetale, moltissimi provengono dalla sintesi

chimica, molti dalla fermentazione ed alcuni oggi anche dalla biotecnologia.

Un'altra classificazione è la modalità d'azione, ovvero ci sono dei farmaci eziologici, come per esempio i chemioterapici, che vanno ad agire sulla causa della malattia, i farmaci sostitutivi, come ad esempio alcuni ormoni (insulina) oppure farmaci sintomatici (che si utilizzano per esempio per trattare il dolore piuttosto che l'insonnia oppure affezioni cardiovascolari, respiratorie).

Un'altra via di classificazione è quella sulla natura della patologia e, quindi, dove è localizzata la patologia (a livello del SNC, apparato muscolo scheletrico, apparato genito-urinario), sono 17 le categorie individuate.

Oppure si possono classificare sulla base della struttura chimica, questa è una classificazione che useremo, ad esempio del capitolo per esempio degli agenti antipertensivi andremo a classifica sulla base della struttura chimica. Quindi vedremo che alcune classi nascono perché derivati da certi composti e quindi sono modellati sulla struttura, spesso sono analoghi di quella struttura.

Giungiamo alla classificazione che usiamo in campo farmaceutico, che troveremo anche nei testi, in altre parole la classificazione semplificata usata in ambito chimico-farmaceutico.

Cominceremo con i **farmaci attivi sul sistema nervoso periferico**.

Quali sono i due sistemi di neurotrasmissione fondamentali nell'innervazione dei diversi organi del nostro corpo?

- 1) Il sistema colinergico
- 2) Il sistema adrenergico

Nella sistematica avremo moltissimi farmaci che agiscono sui recettori, alla classificazione generale dei recettori

avremo i recettori canale, i recettori accoppiati alla proteina G.

Sui recettori dovremo riprendere tutti questi concetti, abbiamo visto cosa è un recettore, un agonista, un antagonista.

METODI DI CLASSIFICAZIONE DEI FARMACI (II)

- **Sistema Anatomico-Terapeutico-Chimico:** inquadramento sulla base del sistema organico sul quale esercitano la loro azione.
- I farmaci vengono attribuiti a 14 gruppi anatomici (A: sistema alimentare; B: sangue e organi emopoietici...).
- A questa prima attribuzione fa quindi seguito l'indicazione della malattia e della classe chimica d'appartenenza.

METODI DI CLASSIFICAZIONE DEI FARMACI (III)

Classificazione semplificata usata in ambito chimico-farmaceutico

➔ **A. Farmaci attivi sul sistema nervoso periferico:**
Si trattano tutti gli agenti agonisti ed antagonisti dei sistemi 1)colinergico e 2)adrenergico. 1)Colinergico: agonisti muscarinici e nicotinici, inibitori dell'acetilcolinesterasi, antagonisti muscarinici e nicotinici. 2)Adrenergico: agonisti α -adrenergici, antagonisti α -adrenergici, agonisti β -adrenergici, antagonisti β -adrenergici.

All'interno del sistema colinergico, quindi, per esempio, dovremo riconoscere due grandi sottoclassificazioni che fanno parte di due diversi tipi di recettori che l'acetilcolina ha.

Da qui vedremo delle molecole che hanno diversi tipi di azione a seconda che agiscono sul recettore muscarinico o nicotinico.

Faremo lo stesso discorso sul recettore adrenergico, dove avremo una classificazione in α , in β ; anche qui avremo agonisti e antagonisti, entreranno nel merito più avanti.

D. Farmaci delle malattie metaboliche o endocrine:

In questa categoria sono stati introdotti farmaci di difficile collocazione.

Ad esempio gli antinfiammatori, gli antiartrici, gli antidiabetici, gli ipolipemici, gli anoressizzanti e la maggioranza degli ormoni peptidici e steroidei

E. Farmaci chemioterapici

Originariamente per chemioterapia si intendeva il trattamento, con farmaci selettivi, di malattie causate da agenti infestanti quali protozoi, funghi, batteri, virus e, in genere, parassiti che provocano malattie infettive. Il concetto di "tossicità selettiva" è associato anche alla terapia anticancro, di fatto inclusa nella chemioterapia.

PARTI DEL PROGRAMMA

B. Farmaci attivi sul sistema nervoso centrale: psicotropici e neurologici

Il SNC (cervello e midollo spinale) è deputato al controllo dei pensieri, delle emozioni, delle sensazioni e delle funzioni motorie.

I farmaci psicotropici (antidepressivi, antipsicotici, ansiolitici e psicomimetici) agiscono sulle funzioni mentali e sull'umore.

I farmaci neurologici si possono suddividere in anticonvulsivanti (cura dell'epilessia), sedativi e ipnotici (disturbi del sonno), analgesici (soppressione del dolore) e anti-parkinson.

C. Agenti farmacodinamici

Influenzano le funzioni dinamiche dell'organismo, ad es. l'apparato cardiovascolare. Tra questi gli antiaritmici, gli antianginosi, i vasodilatatori, gli antipertensivi, i diuretici, gli antitrombotici, che intervengono con vari meccanismi sul cuore o sulla circolazione sanguigna.

Farmaci antiallergici e farmaci che agiscono sul tratto gastrointestinale, sulla respirazione e sul sistema genito-urinario vengono solitamente inseriti in questa categoria.

Abbiamo poi i farmaci che sono attivi sul SNC. Anche qui vedremo poi le sottoclassificazioni.

Infine arriviamo alla terza del programma ovvero gli agenti farmacodinamici, sostanze che influenzano le funzioni dinamiche dell'organismo, quindi parleremo di farmaci che agiscono sull'apparato cardiovascolare, i farmaci antiallergici, farmaci che agiscono sul tratto gastrointestinale, sulla respirazione e sul sistema genito-urinario.

Abbiamo inserito alcune slide per introdurre bene alcuni argomenti che sono fondamentali.

Classificare un farmaco sulla base della sua struttura ci fornisce sicuramente degli strumenti in più, bisognerà sapere perché due farmaci appartenenti alla stessa categoria, vanno ad adattarsi allo stesso recettore, ma hanno effetti desiderati diversi con una farmacocinetica diversa.

Bisognerà sapere perché un farmaco non può essere assunto da quel determinato paziente.

Non bisogna sapere solo perché, ma bisogna ragionare molto sulla struttura chimica. Perché magari è stata fatta una modifica chimica. Non deve essere qualcosa in più, ma deve essere uno strumento che ci rimarrà in futuro per la lettura di una scheda tecnica.

Ci sono tanti target recettoriali, quindi dobbiamo avere dimestichezza nella descrizione, non descrivere con i domini transmembranalici ecc., ma descrivere i siti di legame, le tasche, come si lega, cosa è necessario alla molecola perché possa legarsi come agonista o come antagonista.

how?

Quali informazioni bisogna sapere?



1. Si identificano i possibili bersagli/macromolecole (enzimi/recettori/trasportatori) coinvolti nell'azione di un neurotrasmettitore o nella patologia
2. Si descrivono le macromolecole biologiche coinvolte (enzimi/recettori/trasportatori), il sito attivo/catalitico e le interazioni che il mediatore/substrato naturale instaura con esso
3. Si descrivono le molecole biologicamente attive come agonisti/antagonisti/inibitori di enzimi/recettori/trasportatori mettendo in evidenza:
 - relazione struttura attività, proprietà chimico-fisiche (logP, pKa), profilo ADME, principali metaboliti
 - confronto tra farmaci della stessa classe per correlare alla struttura chimica: differenze di potenza, di profilo farmacocinetico, di interazione con altri farmaci, effetti indesiderati, di tossicità.

remember!!! *Che cosa è bene tenere a mente?*

SAR:

1. che ruolo hanno i diversi gruppi funzionali di un farmaco nell'interazione con il bersaglio?
2. Come vengono modificati i gruppi funzionali tra farmaci analoghi derivati da uno stesso lead compound?

esempio:
in questa molecola i diversi gruppi funzionali potrebbero dare con il sito di legame queste interazioni

quali gruppi sono realmente essenziali per l'interazione con il sito di legame del bersaglio? le modifiche portano ad analoghi meno attivi?

Questo ci permetterà ciò che è fondamentale per la chimica farmaceutica, la relazione struttura attività, la cosiddetta SAR, perché non è tanto la conoscenza della struttura chimica, ma quanto la conoscenza a cosa serve per l'interazione.

Se pensiamo a quali interazioni possano avere i farmaci, dobbiamo considerare tutti gli aspetti, perché se una volta progettato il farmaco non supera nessuna membrana (perché magari troppo grosso) non andrà

bene, quindi dovrò considerare la SAR, la pka, il profilo ADME.

Quali possibili interazioni possono dare? Parliamo di molecole organiche, queste molecole hanno una serie di gruppi funzionali nella struttura. Cambiare gruppo funzionale, se parliamo di un gruppo di farmaci, significa cambiare anche se la molecola è attiva o non attiva.

Bisogna capire bene, nell'interazione con un certo bersaglio quale sia il ruolo di quel gruppo funzionale, cioè devo valutare i siti di attacco con il target.

Dovremmo essere in grado di leggere quali siano le potenziali interazioni con il sito bersaglio. Bisogna valutare i possibili punti di attacco.

Quando parliamo d'interazione, di formazione di legame, tra una molecola e il suo target, parliamo ovviamente di energia.

Prendiamo le successive slides come avere un 'glossario' della chimica. Leggeremo i gruppi funzionali correttamente e sapremo quali potrebbero essere le interazioni. Ad esempio nel caso del gruppo alcolico, l'ossigeno ha due doppietti elettronici che sono fonte d'interazione. Immaginiamoci di avere un residuo di lisina nella tasca recettoriale, quei due idrogeni terminali della lisina possono dare un'interazione con l'ossigeno.

Mi aspetta, quindi, che questa molecola possa dare interazioni. È importante

questo legame? Fondamentale per il recettore? Il chimico farmaceutico, per rispondere a questa domanda, derivatizza (?) l'ossidrilica, facendone un estere e vede cosa succede.

Es.: ruolo del gruppo alcolico nell'interazione con il sito di legame del bersaglio:

- formazione di legami a H

la presenza del legame etereo può ostacolare la formazione del legame a H

la presenza del legame estereo può ostacolare la formazione del legame a H

ruolo dell'anello aromatico e dell' alchene nell'interazione con il sito di legame del bersaglio:

- interazioni di van der Waals e idrofobiche con regioni piatte e lipofile, strette fessure

idrogenazione porta a interazione più debole, H assiali fungono da respingente

ruolo del gruppo chetonico ed aldeidico nell'interazione con il sito di legame del bersaglio:

- legami a H con i due doppietti liberi dell'O
- interazioni dipolo-dipolo

ruolo del gruppo carbossilico nell'interazione con il sito di legame del bersaglio:

- interazione ionica nella sua forma dissociata
- legami a H con i due doppietti liberi dell'O
- interazioni dipolo-dipolo
- chelazione di ioni metallici

analoghi utili per verificare le interazioni di un gruppo carbossilico con il sito di legame

Acido carbossilico, Estere, Alcol primario, Chetone, Ammide primaria

ruolo del gruppo amminico nell'interazione con il sito di legame del bersaglio:

- legami a H con il doppietto libero dell'N (HBA) e con gli H (HBD)
- interazione di tipo ionico con siti anionici sul bersaglio

per il gruppo ammidico:

- interazione a ponte di H come accettore o donatore di H

per i gruppi estereo ed etero:

- interazione a ponte di H come accettore di H

per gli eterocicli:

- interazione a ponte di H come accettore di H
- attenzione alla direzionalità del legame a H e alla possibile esistenza di forme tautomere
- interazioni ioniche con N protonati

per il gruppo amminico oltre all'interazione di tipo ionico è possibile instaurare:

- interazione a dipolo indotto con anelli aromatici presenti nel sito di legame (distorsione degli elettroni π e formazione di un dipolo)

«isosteria»:

atomi o gruppi di atomi che hanno la stessa valenza (o stesso numero di elettroni nel guscio esterno e presentano analogie dal punto di vista chimico o fisico;

... queste ed altre modifiche strutturali incidono sulle proprietà chimico fisiche (pKa, logP) e profilo «ADME» della molecola...

isosteri monovalenti CH₃, NH₂, OH, F, Cl, SH, Br, i-Pr, I, t-Bu

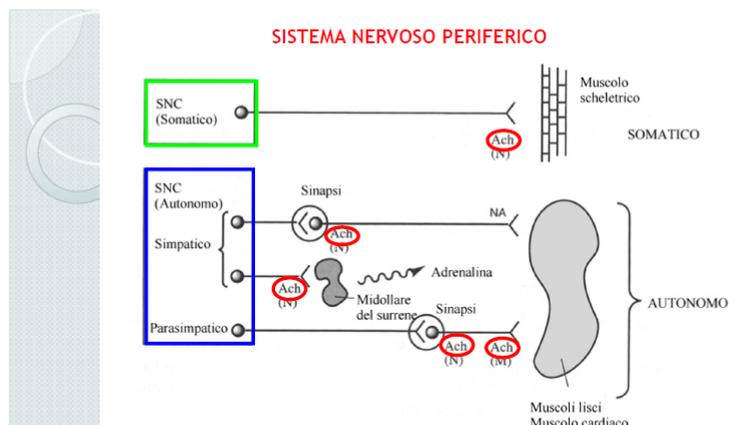
isosteri bivalenti CH₂, NH, O, S

isosteri trivalenti

Equivalenti anulari

Anche l'amina possiamo averla nella forma neutra o nella forma protonata. Anche l'eterocicli può comportarsi nelle interazioni come accettore.

Il punto di partenza in questa scaletta di argomenti era quello di incentrare l'attenzione sul sistema nervoso, in particolare cominciando dal sistema nervoso periferico. Queste parti introduttive sono viste velocemente, perché date per scontate. Nello schema che seguiremo, l'idea è quella di andare a collocare le classi di composti che studiamo in quella che è la loro azione



- I neuroni che li compongono sono definiti sulla base del neurotrasmettitore rilasciato come adrenergici o colinergici
- l'acetilcolina è il neurotrasmettitore più "diffuso" in quanto è rilasciato da tutti i neuroni pregangliari del SNA, simpatico e parasimpatico, dai neuroni postgangliari del parasimpatico e anche da alcuni neuroni postgangliari del simpatico (delle ghiandole sudoripare e salivari)
- è rilasciata anche da alcuni neuroni del SNC

sull'organismo e in quello che è il meccanismo fisiologico in cui rientrano. L'interazione fisiologica con un certo target macromolecolare per essere compresa a fondo nei suoi risultati, nei suoi effetti richiede che noi dobbiamo sapere le funzioni del target.

Questa è una classificazione che conosciamo già, sappiamo com'è fatto il sistema nervoso. In questa prima fase ci interessiamo al **sistema nervoso autonomo o vegetativo** e in particolare entriamo in queste due porzioni, andiamo cioè a considerare quelle molecole che interagiscono con dei target e con delle funzioni che sono svolte dal sistema nervoso cosiddetto parasimpatico o simpatico.

Prima di tutto partiamo dal parasimpatico: giusto per ricordare ciò di cui stiamo parlando, abbiamo qui lo schema delle fibre nervose che sono presenti all'interno, il modo in cui sono suddivise le fibre nervose del parasimpatico e del simpatico.

In particolare, nel nostro caso, stiamo cominciando a considerare quelle fibre nervose che fanno parte di questo schema, quindi già questa rappresentazione serve per farci vedere dove si collocano i recettori, dove agisce il neurotrasmettitore acetilcolina, dove andremo a vedere le azioni farmacologiche delle molecole che oggi vedremo, dove saranno esplesate le azioni.

Qui già vediamo che sono coinvolte tutta una serie di organi, dal cuore allo stomaco, a tutto il tratto gastrointestinale, quindi agli organi viscerali, alcune ghiandole come le salivari per esempio, le ciliari e alcuni muscoli che sono in questi distretti come i muscoli ciliari, lo sfintere pupillare... ci sono diversi target.

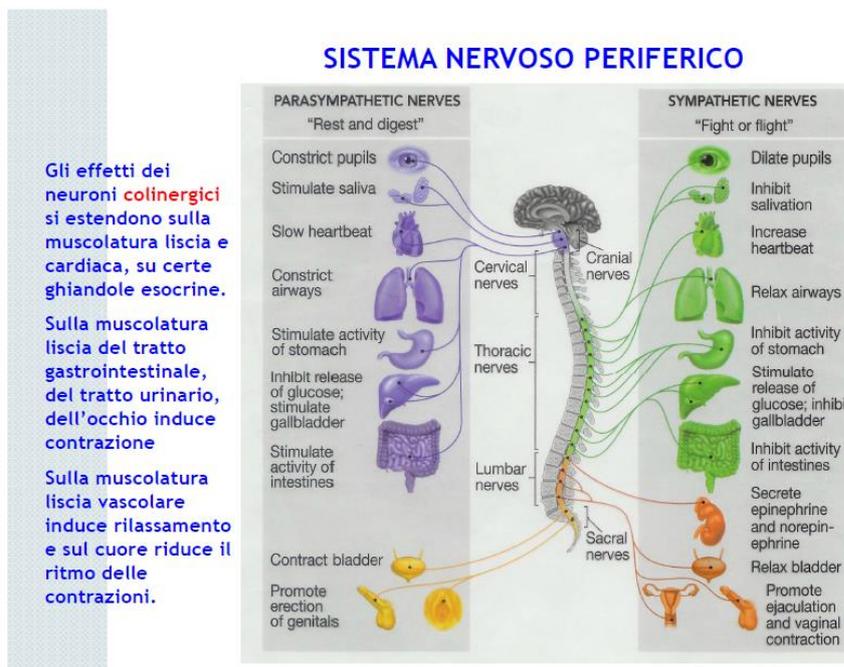
Lo stesso schema, con la stessa suddivisione, con alcune informazioni in più, informazioni che già abbiamo, riprendiamo quali sono i neurotrasmettitori coinvolti in queste terminazioni sinaptiche, a livello delle comunicazioni di queste sinapsi. Già dalle sigle capiamo che l'**acetilcolina** è presente, è coinvolta nella maggior parte di queste comunicazioni a livello sinaptico, mentre tutto il sistema adrenergico si concentra nelle terminazioni post-gangliari del sistema nervoso simpatico.

Qui abbiamo tutto il parasimpatico, poi abbiamo il sistema nervoso somatico, quindi l'acetilcolina è il mediatore anche nelle placche neuromuscolari.

Vediamo anche delle sigle tra parentesi, dove M sta per recettore muscarinico e N sta per recettore nicotinico; vedremo che il mediatore è lo stesso ma il target molecolare è diverso.

Da questa suddivisione, è chiaro che l'acetilcolina è il neurotrasmettitore più diffuso nel nostro sistema nervoso periferico, autonomo, si trova a livello delle terminazioni gangliari sia nel simpatico sia nel parasimpatico. È anche il neurotrasmettitore dei neuroni post-gangliari del parasimpatico e poi anche a livello di alcuni neuroni post-gangliari del simpatico (per esempio le ghiandole salivari, sudorifere).

Ci sono, anche a livello centrale, delle aree importanti che contengono anche recettori e quindi delle fibre che rilasciano acetilcolina.



Per ricordare bene gli organi, vediamo questa slide. Dove andranno le sostanze che interferiscono con questo sistema di neurotrasmissione e quindi ad espletare la loro azione? A livello delle pupille, delle ghiandole, del ritmo cardiaco, a livello delle vie aeree, a livello del tratto gastrointestinale, poi a livello della vescica per esempio, a livello

della contrazione della muscolatura liscia viscerale.

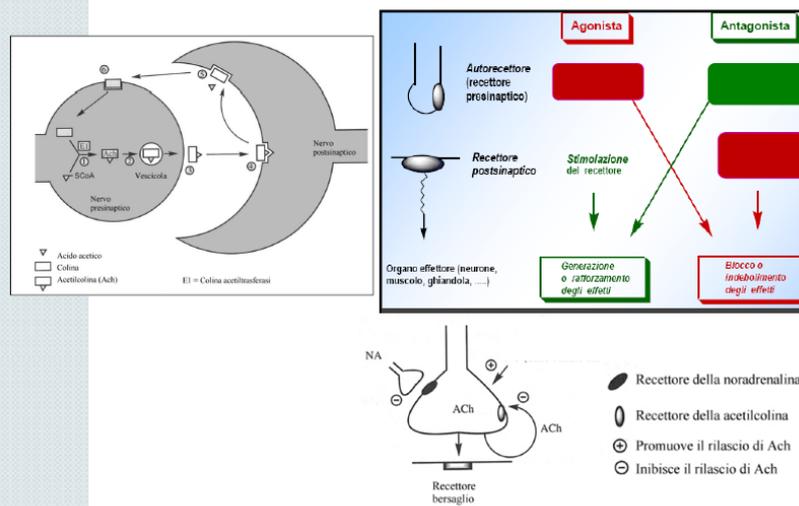
Qui abbiamo l'indicazione di che cosa faccia l'agonista acetilcolina: costringe le pupille, stimola la secrezione salivare, rallenta il battito cardiaco, costringe le vie aeree e così via. Questo è l'effetto che media l'agonista acetilcolina sul recettore colinergico, quindi questo significa che tutte le volte che noi avremo un'azione colinomimetica, in senso generale, direttamente o indirettamente, avremo questi effetti fisiologici. Tutte le volte che, invece, avremo un'azione cosiddetta colinolitica, in altre parole di blocco di azione dell'acetilcolina, avremo l'azione opposta. Ovviamente dobbiamo considerare che in diverse patologie, ci saranno diversi organi che saranno target preferenziali, gli effetti mediati sugli altri organi saranno potenzialmente effetti indesiderati.

Nelle slides vedremo diverse frasi tra cui: la fase di produzione di acetilcolina a livello della terminazione presinaptica; vedremo lo spazio intersinaptico dove il neurotrasmettitore viene rilasciato; vedremo poi ci sono i recettori post-sinaptici rappresentati come un recettori incastrati nella membrana del neurone post-sinaptico; vedremo un altro elemento fondamentale, sempre nella membrana, che è un enzima che distrugge, separa le due componenti da cui è costituita l'acetilcolina; infine vedremo che poi c'è un meccanismo di re-uptake della colina stessa.

Il meccanismo di produzione del neurotrasmettitore lo dovremmo conoscere tutti.

Vediamo ora alcune definizioni degli attori che possono essere presenti a livello di una sinapsi.

Recettori postsinaptici e recettori presinaptici (autorecettori)



In questa rappresentazione schematica della sinapsi colinergica abbiamo visto il **recettore post-sinaptico** che accoglie questa macromolecola proteica nel suo sito di legame, il neurotrasmettitore; il recettore va incontro a una formazione del complesso del ligando con il recettore, adattamento indotto e trasduzione del segnale (produzione di un segnale e di un responso biologico che si tradurrà in un certo

effetto a livello dell'organo o della fibra nervosa o delle ghiandola o del muscolo). Il suo effetto è quello di attivare, stimola il recettore. Un agonista stimola il recettore, un agonista che si comporta come l'acetilcolina andrà a generare gli stessi effetti dell'acetilcolina o a rafforzarli; in alcune patologie c'è proprio una carenza di questa trasmissione colinergica e quindi l'agonista, di sintesi per esempio, va a rafforzare gli effetti.

Abbiamo un altro attore possibile, il recettore che non è rappresentato in questa slide, ma in altre sinapsi ha un ruolo molto importante, ed è il **recettore pre-sinaptico**. Il neurotrasmettitore rilasciato nello spazio intersinaptico può andare sul recettore pre-sinaptico o post-sinaptico. I recettori pre-sinaptici hanno, di solito, un ruolo di andare a inibire con un feedback negativo il rilascio del neurotrasmettitore da parte della terminazione pre-sinaptica. Quindi se produciamo e introduciamo nell'organismo un antagonista pre-sinaptico abbiamo l'effetto opposto, non abbiamo la stimolazione del recettore, ma abbiamo l'inibizione della liberazione del neurotrasmettitore.

Immaginiamo di avere, non l'acetilcolina che va su entrambi i recettori pre-sinaptici e post-sinaptici, ma delle molecole che selettivamente vadano sul post-sinaptico o pre-sinaptico avremo, attraverso due molecole agoniste, effetti diversi e opposti.

Invece, avendo la possibilità di avere un'antagonista, cioè una molecola che sia affine ai recettori dell'acetilcolina, ma che non abbiamo la cosiddetta attività intrinseca, non dia l'adattamento indotto che scatena il responso, ma occupa il recettore al posto dell'acetilcolina, impedendone l'effetto.

Se io ho un antagonista al recettore post-sinaptico, avrò l'effetto di blocco o indebolimento degli effetti; se, invece, ho un'antagonista al recettore pre-sinaptico, il risultato sarà la generazione o il rafforzamento dell'effetto.

Se blocco l'azione di un agonista pre-sinaptico, aumento il rilascio dell'ACh (acetilcolina), blocco l'effetto di controllo a feedback negativo e quindi aumento il rilascio.

Nel caso dell'ACh non vedremo questa considerazione in maniera così applicativa, lo sarà per altri neurotrasmettitori in cui i ruoli dei recettori pre-sinaptici, nell'intervento farmacologico, è decisamente più importante.

Quindi l'aver agonisti o antagonisti a un certo recettore, ci fornisce degli strumenti che sono abbastanza flessibili.

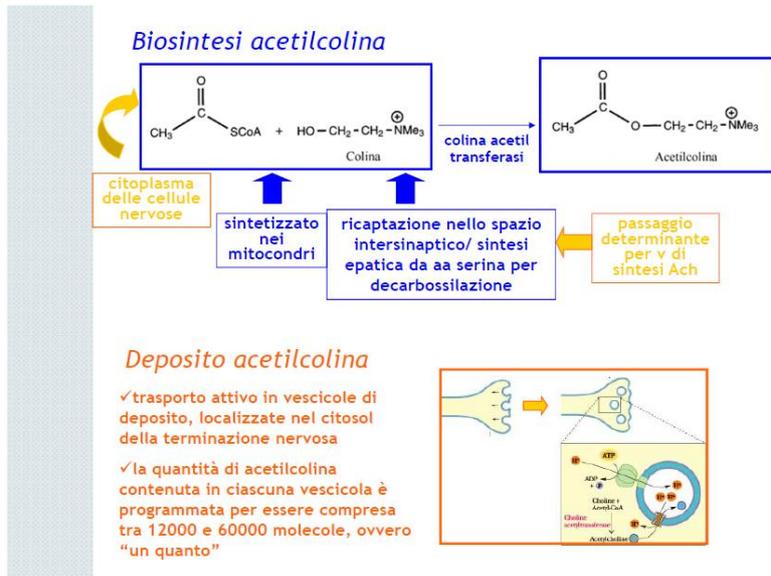
La selettività d'azione è sempre un qualcosa di relativo, quindi ci sono tendenze diverse nella sintesi, nel design i nuovi farmaci per cui, dopo aver cercato la famosa pallottola magica che vada nella maniera più selettiva possibile su un certo recettore, si è compreso che forse in certi casi i farmaci sono più attivi se hanno un ventaglio d'azione e non un'azione più selettiva.

Quindi deve essere chiaro il ruolo dei recettori pre-sinaptici e post-sinaptici.

BIOSINTESI DELL'ACETILCOLINA

Cominciamo a vedere l'Ach nella sua struttura chimica molto semplice e consideriamo i momenti chiave nella sua azione fisiologica.

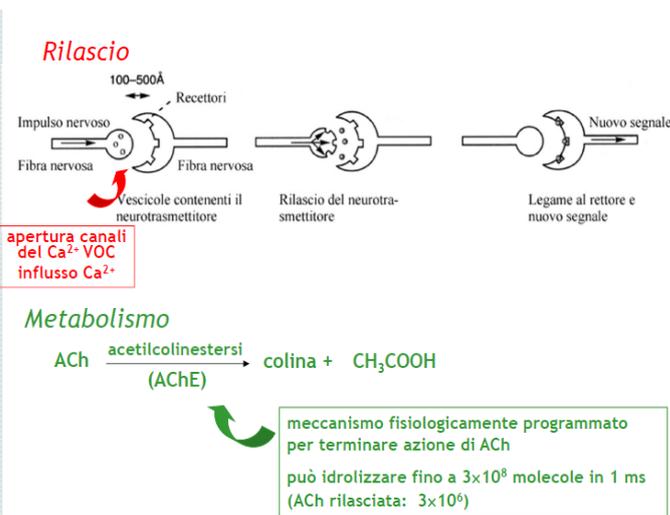
Come abbiamo visto prima, l'Ach è sintetizzata nelle terminazioni nervose, dove c'è l'enzima che è la **colina acetiltransferasi** che trasferisce su quell'aminoalcol che è la colina, un gruppo acetilico. In particolare agisce nei mitocondri. In questo modo è prodotta questa molecola



avente questa struttura che poi è immagazzinata all'interno della terminazione pre-sinaptica all'interno di **vescicole di deposito**; ci sono dei meccanismi di trasporto attivo, cioè consumo di ATP, all'interno delle vescicole.

Quando arriva l'impulso nervoso, è liberata attraverso la fusione della membrana di queste vescicole con la membrana pre-sinaptica e quindi viene liberata una certa quantità di Ach. È stato valutato che il numero di molecole addirittura di Ach sia tra 12.000 e 60.000 (questa è una curiosità).

Il rilascio del neurotrasmettitore passa attraverso l'apertura dei **canali del calcio**, quindi calcio-dipendenti, entra il calcio nella terminazione pre-sinaptica e si ha questo meccanismo di fusione e rilascio.

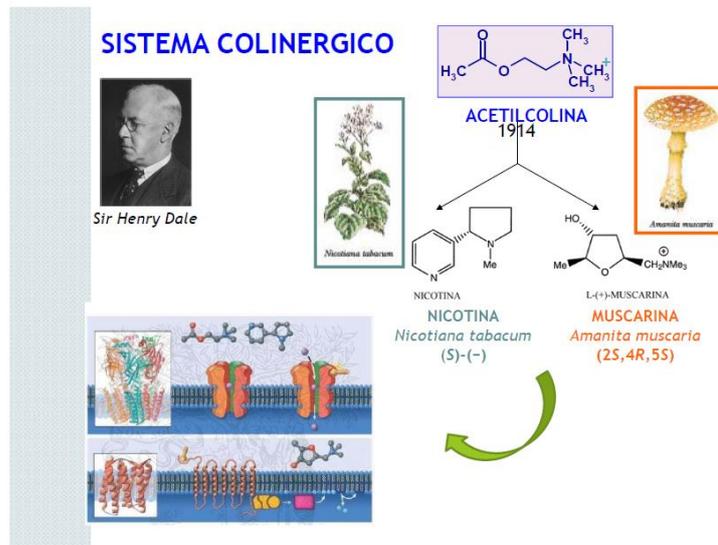


Quindi è rilasciato nello spazio intersinaptico e poi c'è l'interazione con il recettore post-sinaptico.

Si tratta di una vita attiva dell'Ach brevissima, perché nello spazio intersinaptico agisce anche l'enzima **acetilcolinesterasi** che è un'esterasi (ovviamente perché come abbiamo visto si è formato un legame estereo tra la colina e l'acetile, quindi si è formato un acetato di colina) che provvede alla distruzione del neurotrasmettitore.

È efficientissima questa esterasi, idrolizza anche fino a $3 \cdot 10^8$ molecole in 1 millisecondo, considerando che avevamo detto 12.000-60.000 per ogni impulso, questo enzima è efficientissimo. Dopo di che avremo il recupero della colina nella terminazione pre-sinaptica.

La conoscenza dei recettori dell'acetilcolina è partita anche grazie allo studio di molecole naturali che hanno a che fare con la struttura dell'Ach, sono affini ai recettori dell'Ach. La **muscarina** la ricorda in qualche modo, la **nicotina** ha degli elementi strutturali che sono in grado di dare delle interazioni simili a quelli dell'Ach. Dale fu un farmacologo che studiò il sistema recettoriale. Queste due sostanze, la muscarina e la nicotina, sono state isolate da



fonti naturali diverse; si era visto che erano in grado di indurre la contrazione di fibre nervose in preparati farmacologici da modelli sperimentali animali diversi. Per esempio la muscolatura dell'ileo, dell'intestino, era fortemente stimolata da queste sostanze, ma organi diversi rispondeva diversamente a queste due sostanze e da questa osservazione è cominciato lo studio dei recettori ed è cominciata la classificazione dei recettori colinergici.

Quindi organi diversi hanno diciamo o meglio le macromolecole hanno bersagli, si lega sempre l'Ach ma in modo diverso, con effetti diversi.

Oggi sappiamo che ci sono due grandi classi di recettori colinergici che sono il **recettore nicotinico** (a

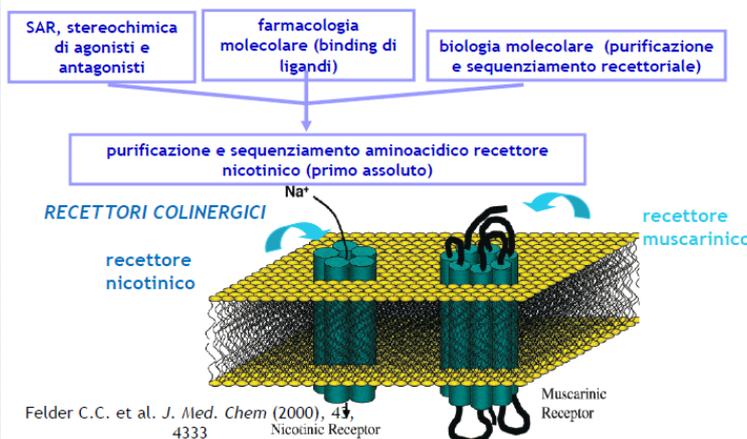
canale ionico) e il **recettore muscarinico** (recettore accoppiato a proteina G).

Qui di nuovo abbiamo delle letterature che è stata molto importante dove c'è stata la pubblicazione della purificazione e il sequenziamento aminoacidico dei recettori; in particolare il recettore nicotinico è stato il primo in assoluto dei recettori

RECETTORI COLINERGICI

I recettori colinergici (nicotinici e muscarinici) differiscono per l'affinità mostrata nei confronti di differenti agonisti ed antagonisti. Altri elementi di differenziazione sono:

- a) la localizzazione;
- b) la funzione;
- c) l'architettura molecolare;
- d) i meccanismi biochimici connessi con la loro attivazione



dei diversi neurotrasmettitori.

IL RECETTORE MUSCARINICO

Qui abbiamo, rappresentati all'interno della membrana plasmatica, la tipologia dei due recettori.

Qui vediamo il recettore muscarinico, questa è una semplificazione eccessiva, ci sono almeno 5 sottotipi del recettore muscarinico, tutti sono stati clonati, sono stati localizzati nel SNC e SNP.

Hanno tutti le caratteristiche tipiche dei recettori accoppiati a proteine G ovvero 7

attraversamenti transmembranal, queste sequenze di aa sono avvolti ad α - elica con le anse sia intrache extracellulari, con le porzioni N-terminale extracellulare e quella carbossi-terminale intracellulare. Qui abbiamo distinta la loro localizzazione all'interno dei tessuti e degli organi, vediamo che sono anche suddivisi in due diverse sottofamiglie, perché i recettori M1, M2 e M5, grazie all'accoppiamento con la proteina G, mediano degli effetti stimolatori. Le proteine G sono quelle determinanti per la trasduzione del segnale e quindi il risultato è che attraverso una proteina G di questo tipo si ha la stimolazione di una fosfolipasi C, aumento della concentrazione del calcio e così via.

Invece gli altri due sottotipi, M2 e M4, grazie a un accoppiamento con una proteina G_i mediano effetti inibitori.

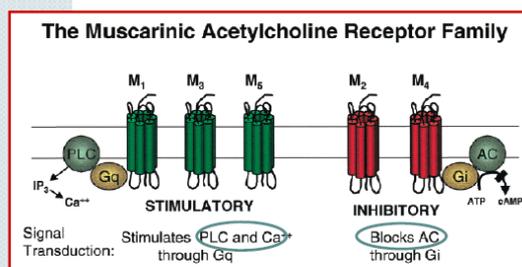
Di fatto si ha l'attivazione del recettore e un'inibizione dell'adenilato ciclasi e quindi si ha una depressione, una diminuzione del contenuto di M5 (?), l'effetto mediato dalla stimolazione di M2 e M4 è un effetto inibitorio.

Noi parleremo del sito di legame del recettore muscarinico, il sito è la struttura che ha una tasca a cui si lega l'agonista (ripetibile in tutti i sottotipi), l'effetto agonista dell'acetilcolina, in realtà, può essere tanto stimolatorio quanto inibitorio, dipende dal sottotipo e quindi legato anche a una diversa localizzazione.

Faremo delle considerazioni in termini di agenti terapeutici importanti soprattutto sui recettori M1 e M2. L'M1 è tipicamente localizzato nel SNC, ma anche nei recettori presinaptici nei gangli del SNA, localizzato a livello di ghiandole esocrine e ha anche questa importante implicazione.

Mentre il recettore M2, che fa parte dei sottotipi che mediano risposte inibitorie, si trova sempre sulle membrane postsinaptiche del SNA, sui muscoli lisci. Questo recettore M2 del sottotipo muscarinico, per esempio, si trova a livello dei muscoli lisci ma anche a livello del cuore, infatti responsabile dell'azione bradicardica di cui parlavamo prima.

•SOTTOTIPI DEL RECETTORE MUSCARINICO



Felder C.C. et al. *J. Med. Chem* (2000), 43, 4333

M ₁ :	tessuto neuronale (cervello, recettori presinaptici dei gangli del SNA) e ghiandole esocrine; implicate nel morbo di Alzheimer, in funzioni di apprendimento e memoria;
M ₂ :	membrane postsinaptiche dei gangli del SNA, muscoli lisci, cuore (diminuiscono ritmo e forza della contrazione cardiaca), ghiandole esocrine;
M ₃ :	cervello (regolano diminuzione del rilascio del neurotrasmettitore), muscoli lisci (contrazione) ghiandole (aumento secrezione);
M ₄ :	muscoli lisci (inibizione canali del Ca ²⁺) ghiandole;
M ₅ :	cervello, tessuti periferici

- eterogeneità dei recettori muscarinici (5 sottotipi da M₁ a M₅, clonati e localizzati in tutto il SNC, più sottotipi per ogni tessuto)
- componenti della membrana cellulare, sette domini di transmembrana ad α -elica di carattere idrofobico e di otto anse, quattro intra e quattro extracellulari, idrofile, con la porzione N-terminale extracellulare e quella C-terminale intracellulare

Sottotipi recettoriali muscarinici

Recettore	Proteina G	Localizzazione tissutale	Risposta cellulare	Funzione
M ₁	G _{q/11}	SNC, ghiandole gastriche e salivari, gangli autonomi, nervi enterici	Attivazione PLC (IP ₃ e DAG), canali Ca ²⁺ e PKC), potenziale postsinaptico eccitatorio (TsEPSP); attivazione PLA ₂ e PLD ₂ ; TAcido arachidonico	T Funzione cognitiva T Secrezione T Depolarizzazione gangli autonomi T Rilascio di dopamina e locomozione
M ₃	G _{q/11}	SNC muscolatura liscia, ghiandole e cuore	Come M ₁	T Contrazione muscolatura liscia (vescica) T Secrezione salivare T Assunzione di cibo, deposito dei grassi Inibizione rilascio di dopamina Sintesi di NO Media la dilatazione delle arterie cerebrali Facilita il rilascio di dopamina Aumenta il comportamento di ricerca e di ricompensa
M ₅	G _{q/11}	Bassi livelli nel SNC e periferico; recettore muscarinico predominante nei neuroni dopaminergici della substantia nigra e dell'area tegumentale ventrale	Come M ₁	Media la dilatazione delle arterie cerebrali Facilita il rilascio di dopamina Aumenta il comportamento di ricerca e di ricompensa
M ₂	G _{i/o}	Terminazioni nervose del sistema nervoso autonomo	Inibizione dell'adenilato ciclas (cAMP) e dei canali del Ca ²⁺ voltaggio-dipendenti; attivazione dei canali del K ⁺	I Battito cardiaco T Contrazione muscolatura liscia Inibizione neurale in periferia via auto- e eterorecettori I Trasmissione gangliare Inibizione neurale nel SNC T Tremori Ipotermia ed analgesia Inibizione del rilascio di neurotransmettitori nel SNC mediato da auto- e eterorecettori Analgesia Attività catalettica Facilita il rilascio di dopamina
M ₄	G _{i/o}	SNC	Come M ₂	Ipotermia ed analgesia Inibizione del rilascio di neurotransmettitori nel SNC mediato da auto- e eterorecettori Analgesia Attività catalettica Facilita il rilascio di dopamina

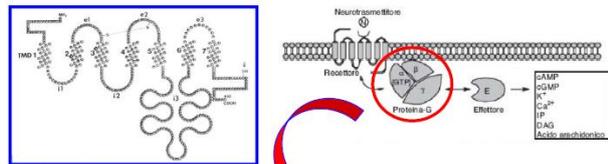
PLC, fosfolipasi C; IP₃, inositi-1,4,5-trifosfato; DAG, diacilglicerolo; PLD, fosfolipasi D; PKC, proteina chinasi C; PLA₂, fosfolipasi A; cAMP, adenosina monofosfato ciclico; (Adattato da Westfall TC, Westfall DP: Neurotrasmissione: the autonomic and somatic motor nervous systems. In: Brunton LL, Lazo JM, Parker KL, eds. Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Ed. New York: McGraw-Hill, 2006, pag. 127-181)

Qui abbiamo un'altra slide di classificazione con la localizzazione nei tessuti, la risposta cellulare, ma questo non ci interessa più di tanto.

Quindi non stiamo nemmeno a vedere questi meccanismo, non è roba nostra.

Quello che a noi interessa è altro. L'acetilcolina arriva su un recettore muscarinico, in particolare andrà a localizzarsi nella tasca recettoriale; l'acetilcolina sarà l'agonista per eccellenza di questi recettori, quindi sarà la molecola che fitta al meglio all'interno di questa tasca, che determina sicuramente l'adattamento indotto perfetto.

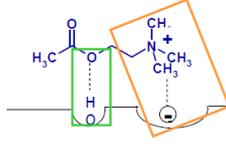
Recettore muscarinico M₁



- ✓ famiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR o G-Protein Coupled Receptors)
- ✓ a seconda del tessuto l'accoppiamento avviene con diversi sistemi effettori, come l'adenilato ciclas, la guanilato ciclas, la fosfolipasi C, i canali ionici del Ca²⁺ e del K⁺.

RECETTORE MUSCARINICO

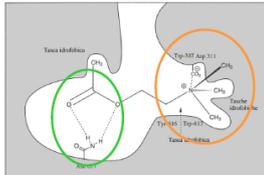
•primo modello di recettore muscarinico



- formulato sulla base di studi di SAR
- necessità gruppo estereo, gruppo ammonico quaternario, 2 atomi di C nel ponte
- legame di tipo ionico, elettrostatico con carica negativa (residuo di acido aspartico o glutammico?)
- legame a H tra O estereo e -OH di una serina del sito anionico

• non spiega: perché due alchili legati all'N devono essere gruppi metilici, requisiti stereochimici dell'interazione, regola del 5

•attuale modello di sito di legame muscarinico



- interazione a H tra gruppo estereo e un residuo di asparagina
- tasca idrofobica per accomodare metile acetilico, ma non gruppi più grandi (nel recettore muscarinico)
- per N interazione con Asp in una tasca idrofobica con tre aa aromatici + due piccole tasche per i metili sull'N

Facendo un minimo di storia, data la struttura dell'acetilcolina stessa, fu subito evidente, attraverso gli studi di relazione struttura attività che sono stati fatti, non andando a mappare il sito recettoriale attraverso per esempio la mutazione di aa, ma questo era stato lo studio fatto con un organo isolato da un modello animale, hanno visto che di volta in volta si avevano con molecole diverse, informazioni diverse.

Per avere un'azione come quella

dell'acetilcolina bisognava avere un gruppo con una carica positiva e un gruppo estereo, quindi si era ipotizzato che sulla controparte del recettore muscarinico ci dovesse essere un sito anionico, in una porzione di questa tasca ci doveva essere un aa che portasse una carica negativa, per esempio un aa a carattere acido, come l'acido aspartico o glutammico.

Mentre ci doveva essere in un'altra porzione un aa, una catena laterale di un aa in grado di dare un legame e ponte d'idrogeno con quell'ossigeno estereo. Questa era la prima ipotesi.

Però si era visto che, in realtà, rispetto a quello che si poteva pensare da un sito come questo, i limiti alla modificazione di questa molecola erano molto forti, non bastava.

Per avere una buona azione, com'è spiegato nel modello della slide, non diciamo che non possa avere modificazioni ma quasi. I due punti di attacco non erano sufficienti a spiegare la costrizione alla modificazione della struttura.

In realtà il sito è fatto così, una tasca angusta in cui si accomoda la molecola, effettivamente com'era stato ipotizzato senza grandi strumenti, ci sono proprio quelle due porzioni. Se osserviamo il disegno dell'ultima slide, vedremo la porzione dove si va ad accomodare il gruppo ammonico quaternario della colina, quindi la colina (aminoalcol che già conosciamo) ha come caratteristica fondamentale da ricordare la presenza di questo gruppo ammonico quaternario, una carica permanente.

Quale sarà la maggiore interazione che darà? Sarà quella con, identificata anche nel sequenziamento, un residuo di acido aspartico (il 311 nella sequenza amminoacidica) che si proietta verso questa tasca angusta ed è fondamentale per dare l'interazione con l'azoto quaternario.

Fu poi confermato dal sequenziamento e dallo studio tridimensionale di questo sito di legame che esistono due tasche idrofobiche di dimensioni limitate in cui vanno ad accomodarsi due dei tre metili che sono legati all'azoto quaternario, mentre il terzo metile si proietta la tasca recettoriale, non si accomoda in nessuna di queste tasche.

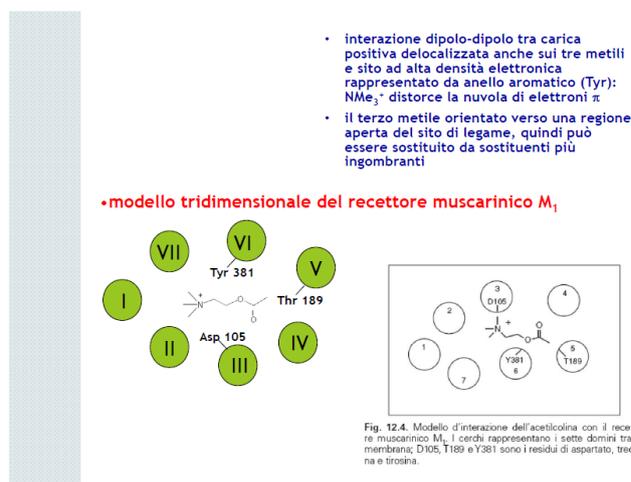


Fig. 12.4. Modello d'interazione dell'acetilcolina con il recettore muscarinico M_1 . I cerchi rappresentano i sette domini transmembrana; D105, T189 e Y381 sono i residui di aspartato, treonina e tirosina.

Sono stati poi identificati altri aa importanti, una tirosina o un triptofano che creano una porzione della superficie del sito del legame a natura idrofobica che va a dare interazioni di Van der Waals, questo ponte etilenico (CH₂-CH₂).

Dei tre metili l'accomodamento migliore è quello che hanno due dei tre metili, l'altro è libero proiettato verso questo spazio.

Spostandoci abbiamo una tasca dove si accomoda la porzione esterea, in questa tasca è stato evidenziato come aa fondamentale un residuo di asparagina

(non è un aa classico), ma un aa che ha nella catena laterale un residuo amidico. Questo residuo amidico, l'azoto amidico ha due atomi d'idrogeno che possono fungere da donatori nella formazione di legami a ponte d'idrogeno, quindi vanno a interagire uno con l'ossigeno carbonilico, l'altro con l'ossigeno estereo. Quindi interagiscono con i due atomi di ossigeno dell'acetato che fungono da accettori, hanno un ruolo di accettori nel legame a ponte di idrogeno. Poi abbiamo un'altra piccola tasca, dove può andare a sistemarsi il metile dell'acetato.

Quindi, rispetto a quello che era il modello iniziale, adesso sappiamo abbastanza bene come è costruito il sito di legame del recettore muscarinico.

Adesso ci sono anche dei diversi studi che ci dicono dove si trova la tasca recettoriale sulla struttura, immaginiamo tridimensionale, con i 7 domini transmembrana, incastonata nella membrana plasmatica del neurone post sinaptico o dell'organo effettore.

Oggi è possibile arrivare ad ipotizzare dove siano questi aa importanti, quali siano i segmenti transmembranali coinvolti, dove stanno gli aa.

Sono in queste sequenze di aa avvolti ad α -elica, è possibile ipotizzare anche dove.

Ricordiamoci dove gli agonisti possono ad avere azione, quindi questa slide l'abbiamo già praticamente detta, ma rivediamola.

A livello periferico, il recettore muscarinico parasimpatico, a livello degli organi effettori sarà localizzato a livello del cuore (induce bradicardia), a livello dei muscoli lisci (recettori M1 o M3, inducono contrazione della muscolatura del tratti

gastrointestinale, responsabili dei movimenti peristaltici, si trovano a livello del muscolo destruttore della vescica, a livello delle vie aeree, dell'uretra, della bile, a livello del muscolo circolare dell'iride), danno vasodilatazione e incrementano la secrezione delle ghiandole esocrine (per esempio ghiandole salivari, mucose delle vie aeree, secrezione gastrica e lacrimale).

Questo è molto importante, per capire gli effetti collaterali di molti farmaci che sono usati come bloccanti del sistema colinergico, per esempio nella terapia del Parkinson, chi prende questi farmaci ha come effetto collaterale il blocco della secrezione delle ghiandole, per esempio, salivari, delle secrezioni gastriche.

Ci sono anche a livello centrale, recettori muscarinici di corteccia e ippocampo entrano in una serie di funzioni, oggi sono considerati interessanti nel controllo delle funzioni cognitive superiori, della memoria, dell'apprendimento. Ecco perché il sistema colinergico interessa per la terapia delle demenze senili e dell'Alzheimer.

Tutte le volte che a mediare una risposta è un recettore accoppiato alla proteina G il responso è abbastanza lento, c'è bisogno di un secondo messaggero.

ASPETTI FISIOLGICI DEI RECETTORI MUSCARINICI

♦ localizzati a livello periferico, sulle membrane cellulari postsinaptiche della muscolatura liscia, del muscolo cardiaco, dei tessuti ghiandolari e sulle terminazioni dell'innervazione parasimpatica

♦ mediano quindi gli effetti fisiologici dell'attività nervosa parasimpatica

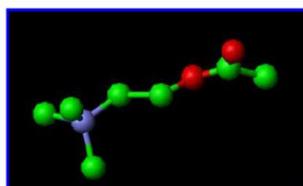
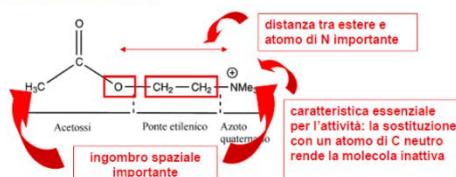
- bradicardia
- contrazione di un numero elevato di muscoli lisci (tratto gastro-intestinale, muscolo destruttore della vescica, bronchioli, uretra, bile, muscolo circolare dell'iride)
- vasodilatazione
- incremento della secrezione di ghiandole esocrine (ghiandole salivari, mucose delle vie aeree, secrezione gastrica e lacrimale).

♦ localizzati anche a livello centrale (corteccia e ippocampo)

- modulano una serie di funzioni vegetative, sensorie e motorie:
 - regolazione del sonno e della temperatura corporea
 - controllo di funzioni cognitive superiori, quali la memoria e l'apprendimento.

♦ risposte muscariniche più lente (50-200 ms successivi al rilascio di ACh) delle risposte "nicotiniche" e caratterizzate da una durata maggiore: la risposta cellulare è mediata da un secondo messaggero.

Acetilcolina: struttura

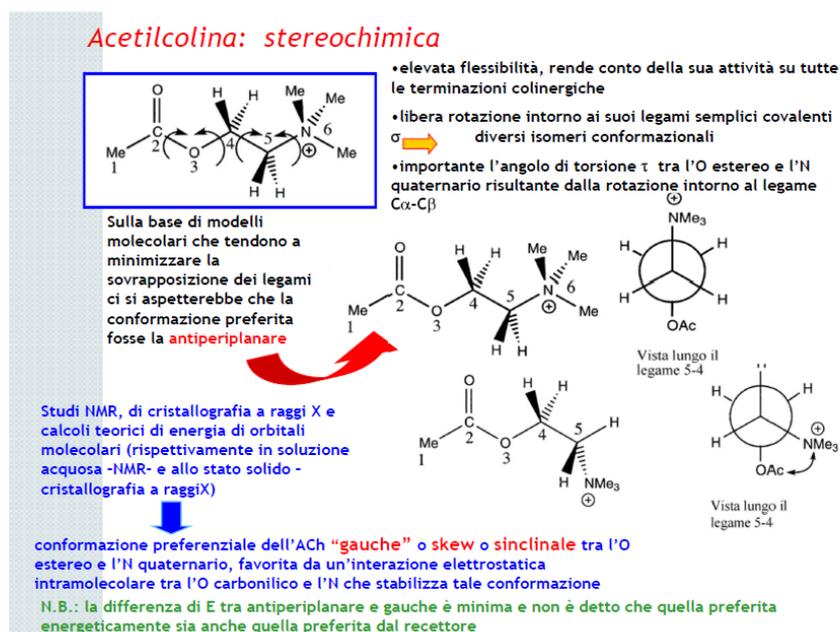


Questa è la struttura tridimensionale, abbiamo il gruppo ammonico e qui il gruppo estereo; una struttura molto semplice in cui riconosciamo queste tre porzioni, l'acetossi, il ponte etilenico e l'azoto quaternario.

Adesso che abbiamo visto il sito di legame, è chiaro perché prima abbiamo detto che per avere un agonista ci sia poca libertà di cambiamento della struttura, è una tasca chiusa con tutta una serie di limitazioni d'ingombri sterici, poco può essere fatto.

Vedendo sopra il commento, limita molta la libertà del chimico farmaceutico, il fatto che la distanza tra l'estere e l'azoto deve essere quella dell'agonista, dell'acetilcolina, altrimenti la molecola non può occupare in maniera efficace quel sito di legame.

Quindi alla fine, gli ossigeni per dare l'interazione sono importanti, l'azoto carico è importante, poche sono le modifiche che si possono fare.



Sulla struttura non abbiamo dubbi, vediamo qualcosa sulle caratteristiche di questa molecola.

È molto semplice, non ci sono centri chirali, non ci poniamo problemi della stereochimica, non ci poniamo problemi di isomeri ottici.

Il ponte etilenico, quindi, è l'elemento che garantisce la grande flessibilità di questa molecola, non ci sono

costrizioni alla sua rotazione; si adatta al recettore nicotinico altrettanto bene. Se noi vogliamo a considerare gli effetti di questa libera rotazione, immaginiamo di fare una proiezione di Newman della molecola e quindi di poter trarre la molecola attraverso i due legami 4 e 5, i due legami α e β , i due carboni del ponte etilenico.

Per avere la maggiore stabilità (la stabilità corrisponde ad un minimo energetico della molecola) si ha una determinata conformazione, una maggiore stabilità quando c'è una massima flessibilità ma anche quando c'è, considerando di guardare la molecola attraverso il legame 4 e 5, la possibilità di ruotare le porzioni rappresentate dai due sostituenti più ingombranti; ruotiamo questi sostituenti attraverso un conformero, consideriamo che passiamo dai minimi ai massimi di energia che sono poco diversi energeticamente (passare da un conformero e l'altro avviene liberamente in soluzione, non c'è bisogno di fornire energia alla molecola).

Quello più stabile è quello dove c'è il minimo ingombro sterico tra i sostituenti, quindi è il conformero **antiperiplanare**.

Quando l'acetilcolina si trova in soluzione, come può essere anche nello spazio intersinaptico, assume una certa conformazione, quella più stabile e quella più probabile è questa.

Allora per comprendere bene la struttura della scala recettoriale, ci si era chiesti se questa fosse anche la conformazione con cui si presentava nel sito di legame, ecco perché sono stati fatti una serie di studi.

In realtà lo studio sia fatto per via NMR, sia attraverso la cristallografia a raggi X, sia per calcoli teorici hanno dimostrato che la conformazione stabile non è quella, ma è quella più probabile. La conformazione preferenziale è quella gauche o sinclinale o skew, dove si ha un'interazione intramolecolare tra l'azoto carico positivamente e quel centro ricco di elettroni, dove la nube elettronica si concentra che è l'ossigeno dell'acetato.

C'è un'interazione all'interno della molecola, in soluzione non troveremo questa conformazione.

In realtà questi sono conformeri liberi di ruotare, non è detto che quelle energeticamente favorevole sia anche quella preferita, l'ha dimostrato, infatti, lo studio di molecole rigide, di analoghi rigidi dell'acetilcolina.

Ci siamo resi conto della totale flessibilità di questa molecola.

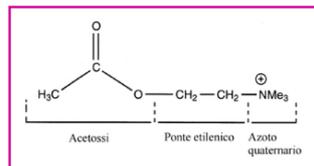
Adesso ci dobbiamo domandare se ha senso pensare a degli agonisti che non siano acetilcolina da utilizzare in quelle condizioni patologiche in cui può essere utile accentuare una risposta colinergica.

Abbiamo visto cosa significa attivare i recettori colinergici, se l'acetilcolina fitta così bene, allora la domanda è 'perché non usare l'acetilcolina tutte le volte che, in presenza di una certa patologia che coinvolge il sistema colinergico, ci sia bisogno di incrementare la stimolazione del sistema colinergico?'

La risposta è qui: l'acetilcolina non può essere usata come agente terapeutico, abbiamo visto dove agisce l'acetilcolina, abbiamo visto che viene sintetizzata dalla terminazione presinaptica e rilasciata, raggiungendo senza problemi il recettore.

ACh non è usata come agente terapeutico perché:

- 1) **non selettivo**, porta a seri effetti collaterali
- 2) **scarsamente assorbito** (sale ammonico quaternario) non passa le membrane biologiche, bassa biodisponibilità qualunque sia la via di somministrazione
- 3) **chimicamente labile** a causa della rapida idrolisi del suo gruppo estereo sia nel tratto gastrointestinale che nel sangue dove è attaccato dalle esterasi

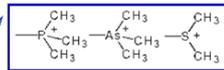


3 aspetti da migliorare...

Ricerca di agonisti muscarinici

Modificazione dell'N quaternario

- ✓ N sostituito con atomi di S, P e As porta a debole attività muscarinica
- ✓ carica positiva sull'atomo corrispondente all'N è **necessaria**
- ✓ **due sostituenti metilici** sono **indispensabili**: sostituzione con gruppi alchilici più grandi porta a prodotti inattivi (derivato con tre gruppi etilici è un antagonista muscarinico)
- ✓ sostituzione di un solo gruppo metilico con un etile o un propile porta ad agonisti più deboli, ma ancora dotati di attività intrinseca
- ✓ **sostituzione graduale con atomi di H** porta via via a prodotti (ammine secondarie e primarie) sempre **meno attivi**



Immaginiamo di avere un farmaco che è assunto per os (la via preferita) o per via parenterale, non è adatta e ci sono tre caratteristiche che la rendono un pessimo candidato ad essere un farmaco:

1) **Non è selettivo**: vale per tutti i neurotrasmettitori, quando è progettato un farmaco prima viene valutato per quale patologia (non il contrario, non viene prima progettato e poi valutata la patologia), affinché

vada a migliorare delle condizioni, per esempio, di carenza d'azione colinergica che si accompagna ad una certa patologia. Essendo non selettivo, essendo anche diffuso il recettore nicotinico;

- 2) **Scarsamente assorbito**: nella sua struttura c'è un gruppo ammonico quaternario, una carica permanente, un aspetto negativo per la biodisponibilità del farmaco, non sarà mai in grado se non in minima parte di attraversare le membrane plasmatiche; il suo percorso si ferma davanti alla prima barriera, rappresentata da una barriera da attraversare per diffusione transcellulare, quindi bassissima biodisponibilità;
- 3) **Chimicamente labile**: poi quel gruppo estereo, come molti gruppi estereo, è molto labile (abbiamo già visto questo concetto nelle prodrug), se presente nella molecola che deve arrivare al target questo è un problema, perché esistono delle esterasi a livello plasmatico che possono immediatamente o quasi idrolizzare il farmaco, non c'è bisogno che arrivi al fegato, basta l'arrivo al plasma.

Questi tre punti fanno sì che non si abbia tra le mani un buon candidato, quindi bisogna migliorare questi aspetti.

Tornando indietro, vediamo una prima classificazione dei farmaci che consideriamo, come primo approccio consideriamo gli agonisti muscarinici.

Quali molecole sono entrate in utilizzo come agonisti, come alternative all'acetilcolina per un'attività sul recettore muscarinico? In realtà non sono molte, perché l'alternativa per avere un'azione colinomimetica è un'altra.

Quando si vuole dopo un intervento chirurgico ripristinare un po' più velocemente il funzionamento della muscolatura viscerale, muscolatura liscia intestinale e urinaria, può essere utile avere un'azione colinomimetica.

Un altro caso è il trattamento del glaucoma, poi c'è un interesse per la cura delle demenze senili e dell'Alzheimer.

Per queste patologie i target sono moltissimi, però nessuno ha ancora portato, salvo un caso, a farmaci da usare in terapia. I farmaci che ci sono, sia per la demenza sia per l'Alzheimer, sono dei colinomimetici e questo perché ci sono tutta una serie di osservazioni che sono state fatte nei pazienti che hanno questo tipo di demenza, che mette in evidenza di come ci siano delle alterazioni della trasmissione colinergica.

RICERCA DI AGONISTI MUSCARINICI

Modificazione dell'N quaternario

Come facciamo a trovare degli agonisti colinergici? Prima di tutto consideriamo la porzione dell'azoto quaternario, che cosa si possa fare? Allora andare a sostituire l'azoto è stato assolutamente negativo, perché qualunque altro eteroatomo ha dimensioni più grandi e quindi già porta ad un indebolimento dell'attività muscarinica, consideriamo che se mettiamo un carbonio perdiamo anche la carica positiva (quindi non è nemmeno considerata la possibile sostituzione con il carbonio, la carica positiva è necessaria). Non solo la carica positiva è necessaria, ma non deve essere una carica positiva permanente come nell'acetilcolina. Inoltre abbiamo visto che ci sono due spazi molto limitati per accomodare i metili. Quindi dobbiamo avere la carica positiva e l'azoto, altre alternative non ci sono e i due sostituenti devono essere metilici.

Classificazione dei Farmaci Muscarinici

- ◆ AGONISTI MUSCARINICI
- ◆ ANTICOLINESTERASICI (azione indiretta)
- ◆ ANTAGONISTI MUSCARINICI

Agonisti muscarinici

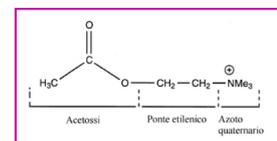
- ◆ impiego limitato, per ripristinare il funzionamento della muscolatura liscia intestinale e urinaria dopo interventi chirurgici
- ◆ trattamento del glaucoma
- ◆ potenzialmente utili nel trattamento della demenza presenile (morbo di Alzheimer, AD) e della demenza senile (ALD)

Anomalie del sistema colinergico nel cervello di pazienti AD/ALD

1. Degenerazione dei neuroni che si proiettano dal nucleo basale di Meynert e dal "locus ceruleus" alle aree neocorticali
2. Perdita dei terminali colinergici nella corteccia cerebrale
3. Riduzione dell'attività dell'ChAT e della sintesi di ACh
4. Ridotto uptake della colina
5. Ridotta attività dell'AChE
6. Riduzione del numero di recettori M₂
7. Riduzione del numero di recettori N

ACh non è usata come agente terapeutico perché:

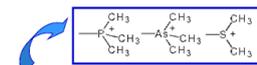
- 1) non selettivo, porta a seri effetti collaterali
- 2) scarsamente assorbito (sale ammonico quaternario) non passa le membrane biologiche, bassa biodisponibilità qualunque sia la via di somministrazione
- 3) chimicamente labile a causa della rapida idrolisi del suo gruppo estere sia nel tratto gastrointestinale che nel sangue dove è attaccato dalle esterasi



3 aspetti da migliorare...

Ricerca di agonisti muscarinici Modificazione dell'N quaternario

- ✓ N sostituito con atomi di S, P e As porta a debole attività muscarinica
- ✓ carica positiva sull'atomo corrispondente all'N è necessaria
- ✓ due sostituenti metilici sono indispensabili: sostituzione con gruppi alchilici più grandi porta a prodotti inattivi (derivato con tre gruppi etilici è un antagonista muscarinico)
- ✓ sostituzione di un solo gruppo metilico con un etile o un propile porta ad agonisti più deboli, ma ancora dotati di attività intrinseca
- ✓ sostituzione graduale con atomi di H porta via via a prodotti (ammine secondarie e primarie) sempre meno attivi



Quindi praticamente non ci sono molte alternative, avremo un'ammina secondaria o un ciclo in cui inserire questo azoto secondario.

Mettendo dei gruppi alchilici più grandi, si passa da un'attività agonista a un'attività antagonista; mettendo tre gruppi etilici già abbiamo una molecola che entra nel sito di legame, la occupa, è affine ma non ha attività intrinseca comportandosi da antagonista nei confronti dell'acetilcolina.

Se mettiamo al posto di un metile o un propile o un etile, abbiamo ancora una certa attività agonista anche se parziali.

Se sostituiamo i metili con degli idrogeni, abbiamo delle amine secondarie, amine primarie, ma abbiamo sempre degli agonisti parziali.

Dobbiamo passare da un azoto quaternario a un azoto terziario.

Modificazione del ponte etilenico: metacolina

✓ **Modificazione del ponte etilenico**

allungamento
 ✓ l'attività diminuisce rapidamente all'aumentare della catena
 ✓ **regola del 5:** ovvero per avere la massima potenza muscarinica non devono esserci più di 5 atomi tra l'N e l'H terminale
 in pratica il recettore non può ospitare molecole più grandi dell'acetilcolina e produrre il suo effetto fisiologico, molecole più grandi sono antagonisti

introduzione di sostituenti
 ✓ introduzione di **sostituenti più grandi del metile** porta a composti **meno attivi** dell'acetilcolina
 ✓ introduzione di un metile in β all'N quaternario porta alla acetil- β -metilcolina o **metacolina** un **agonista muscarinico equipotente con l'acetilcolina, selettivo** in quanto la potenza sul recettore nicotinic è notevolmente inferiore
 ✓ introduzione di un metile in α porta ad un derivato decisamente **meno attivo su muscarinico**
 ✓ molecole **asimmetriche** dotate di isomeria ottica
 ✓ sia i recettori muscarinici che l'enzima acetilcolinesterasi evidenziano stereoselettività verso gli enantiomeri della metacolina (**enantiomero S(+)** è 20 volte più attivo di quello R(-))

ingombro sterico introdotto in β abbatta la velocità di idrolisi delle esterasi e aumenta la selettività muscarinica; $>CH_3$ diminuisce l'affinità

"regola dei 5 atomi"
 $C-C-O-C-C-N^{\oplus}$
 5 4 3 2 1

In terapia:
 diagnosi iporroattività bronchiale o delle condizioni asmatiche glaucoma, per os, oggi in disuso a causa della variabilità nell'intensità della risposta.

Sfavorisce il legame all'esterasi e costituisce un impedimento all'attacco muscarinico

Il ponte etilenico ha interazioni deboli ma che contribuiscono all'affinità generale dell'agonista, è quello determinante per darci una dimensione della molecola. È stata addirittura definita la regola dei 5 atomi, per cui la distanza possibile tra l'azoto, che nell'acetilcolina è quello carico positivamente, e l'ultimo carbonio, quello metilico dell'acetato, deve essere di 5 atomi.

Poi vedremo che, in realtà, può anche non essere così rispettata, ma la molecola avrà delle costrizioni all'interno dei cicli, dove c'è un atomo in più, ma la distanza è quella.

Per avere la massima potenza muscarinica, non devono esserci più di 5 atomi tra l'azoto e l'idrogeno.

Anche qui dobbiamo considerare che introdurre dei sostituenti nel ponte etilenico, può portare a dei prodotti non così attivi, non così efficaci.

Il metile si può introdurre, tutto ciò che è più grande del metile porta a del composto meno attivo, in particolare, l'inserimento di questo metile, non in posizione α rispetto all'azoto, ma in posizione β ha portato ad uno stretto analogo dell'acetilcolina, in tutto per tutto identico, a parte questo metile, che è la **metacolina**. La metacolina è un agonista equipotente sul recettore muscarinico dell'acetilcolina, perché questo metile inserisce una certa selettività d'azione; la metacolina è più attiva sul recettore muscarinico che sul nicotinic.

Mentre sul muscarinico quel ponte metilenico si adatta a una porzione del sito di legame più libera, nel recettore nicotinic no. Abbiamo inserito un elemento di selettività, che era uno dei tre problemi per quanto riguarda l'utilizzo del mediatore naturale, introduce però un centro stereogenico. Quindi, anche qui, in questo caso, nella metacolina, i due possibili enantiomeri hanno attività diversa, si accomodano in maniera diversa sul recettore.

L'enantiomero S(+) si adatta bene, l'enantiomero R(-) si adatta meno bene, ha un centro ingombro sterico sul sito di legame; quindi il primo sarà l'eutomero, il secondo il distomero. È utile anche perché, come leggiamo nel commento, è sfavorito il legame delle esterasi.

Non solo è un agonista pieno, è selettivo, ma anche meno suscettibile all'idrolisi da parte delle idrolasi. Questo è già un buon miglioramento rispetto all'acetilcolina.

Negli agonisti muscarinici, quelli che utilizziamo per comprendere quali siano gli effetti delle sostituzioni abbiamo ancora l'azoto quaternario.

Modificazione della parte esterea: carbacolo

Consideriamo cosa si possa fare sulla parte esterea, c'è una piccola tasca per il metile dell'acetato, quindi non possiamo fare grandi cambiamenti.

Se sostituiamo, per esempio, all'acetato, un propionato o un butirrato, quindi i gruppi propionilossi o butirrilossi, questi di nuovo non sono attivi come agonisti, sono meno potenti.

Se utilizziamo, invece, degli acidi che abbiamo un R ancora più grande, degli esteri con degli acidi benzoici per esempio o altri più ingombranti passiamo ad avere degli antagonisti.

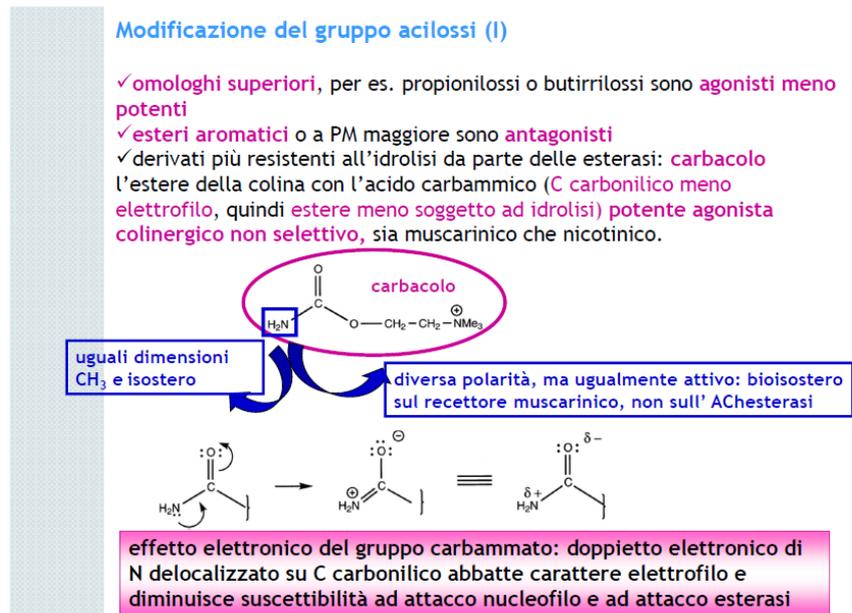
Troveremo queste sostituzioni quando parleremo degli antagonisti, dobbiamo avere molecole molto affini, ma non importa che diano l'adattamento con il recettore, il fitting con il recettore che determina la trasduzione del segnale.

Quindi tra le modificazioni possibili si è arrivati a un'unica sostituzione efficace, al posto dell'acetato si è usato un carbammato, il **carbacolo** è l'analogo dell'acetilcolina, in cui al posto del metile, è stato inserita un'amina, un gruppo $-NH_2$, quindi non è più un estere dell'acido acetico ma un estere dell'acido carbammico.

Questa sostituzione, l'abbiamo richiamata ieri, risponde ad un criterio di isosteria, si è andati a scegliere al posto del metile, un sostituito, un raggruppamento isostero che è il gruppo $-NH_2$. Certamente, dal punto di vista dimensionale, funziona, perché occupa uno spazio abbastanza confrontabile; si tratta, però, ovviamente, di un gruppo con una polarità diversa, l'azoto ha una polarità diversa rispetto al gruppo metilico, ciò nonostante è attivo, induce un legame con il sito del recettore muscarinico ugualmente efficace.

Ma non solo è un isostero, ma un bioisostero; non solo ma è un bioisostero sul recettore del recettore muscarinico, ma non è un bioisostero sul sito delle esterasi plasmatiche, in questo modo si è in parte risolto o comunque ridimensionato uno dei problemi, ovvero l'instabilità di questo estere, mantenendo il gruppo estereo.

Ma questo perché? Perché rispetto al metile, l'azoto ha questo doppietto elettronico libero, che può essere delocalizzato su questo legame azoto-carbonio che porterà a un'ulteriore delocalizzazione del doppietto di legame del carbonile sull'ossigeno: il risultato di queste due forme è che noi abbiamo una



parziale delocalizzazione della carica negativa su questo ossigeno, questo è fondamentale per diminuire l'attacco delle esterasi che comporta un attacco nucleofilo di questo carbonio.

Grazie al fatto che possiamo scrivere questo ibrido di risonanza, questo carbonio è molto meno elettrofilo.

Quindi diminuisce la suscettibilità all'attacco nucleofilo e all'attacco delle esterasi.

Il carbacolo è il carbammato della colina.

Betanecolo

C'è inoltre una molecola che ha messo insieme queste due modificazioni, che è il betanecolo, che è un agonista potente sul recettore muscarinico, è quasi privo di attività nicotinic. Assunto perlopiù per via sottocutanea, oltre che per os, qui abbiamo combinato l'effetto d'ingombro sterico del metile e l'effetto elettronico del carbammato.

Viene somministrato soprattutto

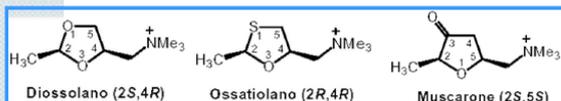
in caso di atonia gastrica e della vescica per dare uno stimolo alla muscolatura della vescica urinaria. È selettivo, ugualmente efficace, più stabile alle esterasi.

Finora abbiamo considerato delle molecole semplici, in cui le modifiche sono, dal punto di vista didattico, semplici.

Muscarina

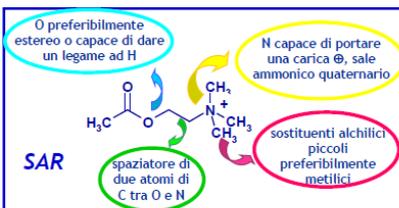
Modificazione del gruppo acilossi (II)

- ✓ **muscarina**: alcaloide naturale muscarina, isolata dal fungo *Amanita muscaria*, var. rossa, ad azione agonista (uno dei più vecchi agonisti colinergici)
- ✓ ha **tre centri chirali**, quindi otto isomeri ottici, ovvero quattro coppie di enantiomeri, di cui l'unico **attivo** è anche quello naturale, la L(+)-muscarina o (2S,3R,5S)-(+)-muscarina
- ✓ analoghi con uguale disposizione spaziale di sostituenti intorno ai centri stereogenici della L(+)-muscarina naturale: agonisti muscarinici con attività decrescente



eteri e alchilaminocetoni :

- **etero etilico** ha significativa attività muscarinica, chimicamente stabile, non usato clinicamente
- **derivati chetonici** più potenti : carbonile sul C in δ rispetto ad N quaternario (posizione = nell'acetilcolina) può legarsi sul recettore muscarinico con interazione dipolo-dipolo o attraverso un legame a H

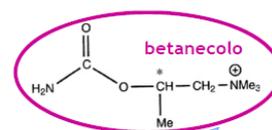


presenta la sequenza (2S,3R,5S)-(+)-muscarina.

Modificazione del gruppo acilossi (I)

- ✓ **betanecolo**, potente agonista muscarinico efficace per os o per via sottocutanea (quasi privo di attività nicotinic). Anche qui si osserva **stereoselettività** verso gli isomeri ottici del betanecolo

combinazione effetto elettronico del gruppo carbammato + effetto sterico del metile in β



In terapia:

- forme di atonia gastrica e della vescica: stimola la muscolatura liscia del tratto gastro-intestinale e della vescica urinaria; promuove la salivazione.
- da preferirsi al Carbacolo che ha una componente nicotinic rilevante.

Sono possibili altri tipi di modificazioni al gruppo acilossi, non va dimenticata la molecola iniziale, quella che è stata studiata di origine naturale, isolata dall'*amanita muscaria*, la muscarina, studiata per moltissimi anni come agonista su questo recettore.

È una molecola naturale, ha diversi centri stereogenici, l'unico attivo è quello che

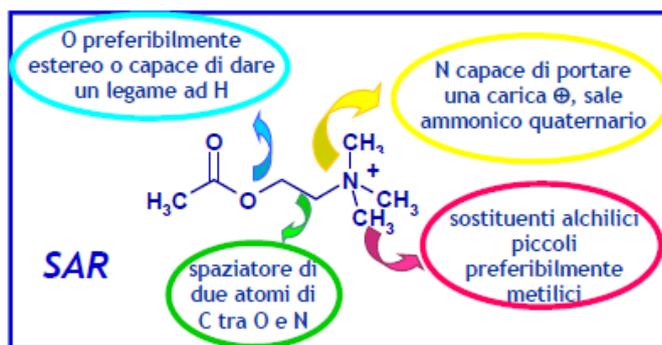
Facciamo delle considerazioni sulla struttura:

- ha un gruppo ammonico quaternario
- ha il resto della struttura che ricorda abbastanza da vicino quello dell'acetilcolina:
- un carbonio nella catena laterale,
- un carbonio che rappresenta il punto di attacco di questa catena al ciclo,
- l'ossigeno che può ricalcare l'ossigeno estereo,
- un carbonio che dovrebbe occupare la posizione del carbonio carbonilico, il metile
- 'manca' rispetto alla struttura del mediatore naturale l'ossigeno carbonilico, che manca a livello dell'interazione del sito di legame (interazione a ponte di idrogeno con l'asparagina), ma c'è comunque un punto di attacco, quel gruppo alcolico inserito in questa posizione 3 del ciclo in realtà presenta un ossigeno che può orientarsi e dare quell'interazione a ponte di idrogeno come accettore ma anche l'idrogeno può dare interazioni come donatore.

L'attività come agonista della muscarina è spiegabile, in quanto, ripropone buona parte della struttura del mediatore stesso. Andando a fare degli analoghi sintetici, in cui la disposizione spaziale sia più o meno la stessa, intorno ai centro stereogenici perlomeno, si sono ottenuti degli analoghi non così attivi. L'analogo con il diossolano è poco efficace, con l'ossatiolano (sostituzione con lo zolfo) è meno efficace del precedente, un agonista meno efficace, anche il muscarone (prodotto ossidato con un gruppo chetonico in 3) è meno efficace e sono degli agonisti parziali al sito colinergico muscarinico.

Sono state fatte delle semplificazioni strutturali, al gruppo estere, per esempio, è stato tolto un ossigeno carbonilico per fare degli eteri, è stato tolto l'ossigeno e messo il carbonio per ottenere dei derivati chetonici. Anche queste sostituzioni tolgono un elemento d'interazione con il sito di legame, ma possono dare ancora degli agonisti attivi sul recettore muscarinico, possono, in questo caso, modificare il tipo d'interazione, ma si hanno ancora delle interazioni efficaci.

Quindi lo schema che riassume la relazione struttura attività è questo, piuttosto limitativa. Quindi sostituenti alchilici piccoli preferibilmente metilici, carica positiva non permanente, spaziatore possibilmente a due atomi di carbonio, ossigeni preferibilmente l'estere (abbiamo visto anche alcune possibili modificazioni su cui non ci soffermiamo perché non hanno portato a dei farmaci usati in terapia).



Esistono recettori muscarinici usati in terapia ancora oggi? Questo è un agonista naturale, che è la pilocarpina. È importante nel trattamento del glaucoma. Abbiamo citato Ocusert che, dal punto di vista tecnologico, è una preparazione che permette il trattamento a lungo termine, il rilascio controllato e programmato di pilocarpina inserito all'interno dell'occhio.

pilocarpina (Ocusert®)

(3S,4R)-3-etilididro-4-[(1-metil-1H-imidazol-5-il)metil-2-(3H)-furanone]logP: 1.15

✓ **agonista parziale muscarinico non segue SAR classica (non ha attività nicotinic)**
 ✓ **alcaloide estratto dal *Pilocarpus jaborandi***

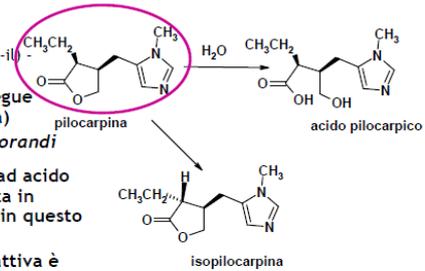
✓ **lattone che si idrolizza in soluzione ad acido pilocarpico inattivo, oppure epimerizza in ambiente basico al C3 per dare anche in questo caso uno stereoisomero inattivo**

✓ **non ha N quaternario, ma la specie attiva è protonata a pH fisiologico**

✓ **moderatamente selettivo per sottotipo M₁**

✓ **sostituzione isostera dell'O all'interno dell'anello con S modifica il profilo farmacologico: tilocarpina agonista pieno M₁, parziale M₃, debole antagonista M₂.**

✓ **potenzialmente utile terapia Alzheimer**



In terapia:

- ✓ **trattamento topico del glaucoma (riduce in pochi minuti la pressione intraoculare), insufficiente salivazione**
- ✓ **buon assorbimento a livello oculare:**
 - **miotico di elezione per il glaucoma ad angolo aperto**
 - **attacchi acuti del glaucoma ad angolo chiuso**
- ✓ **attualmente commercializzata come soluzione oftalmica, gel, compresse e sistema a rilascio prolungato Ocusert**

È un agonista parziale, in cui riconosciamo, anche se costretti all'interno di due cicli, degli elementi strutturali importanti per l'interazione con il recettore muscarinico: anello lattonico a 5 termini non così stabile in soluzione (ci può essere anche un'inversione del centro chirale, dove c'è il sostituente metilico, abbiamo così l'**isopilocarpina**, quindi può epimerizzare al carbonio C3). È un alcaloide, ha chiaramente proprietà basiche legate all'anello imidazolico che non è una base forte, pK_b=7.5, quindi una pK_a intorno a 6.5, quindi parzialmente protonato a pH fisiologico.

Normalmente quello che si trova nell'Ocusert è il cloridrato, quindi siamo a soluzione, normalmente, debolmente acido, perché possa essere una forma protonata, di solito c'è un tampone di acido borico perché ci sia una maggiore solubilità di questo composto.

Quindi normalmente si fanno colliri o dei gel che sono tamponati a un pH 5, 5.2, che è il pH dell'acido borico o borato.

Di solito si fanno certe scelte perché la struttura richiede determinate cose.

L'azoto, coinvolto nel oppio legame, l'azoto imidazolico, sarà protonato e la basicità dell'eterocicli è data dalla possibilità di delocalizzare la carica positiva su entrambi gli atomi di azoto.

Vedremo altri esempi di derivati imidazolici, rivedremo questo equilibrio. È una molecola debolmente basica, la carica positiva ce la dobbiamo immaginare non su un solo atomo, ma delocalizzata su un ciclo.

Ciò nonostante il ciclo riesce ad accomodarsi, è un agonista parziale con un metile almeno in una delle tasche del recettore muscarinico.

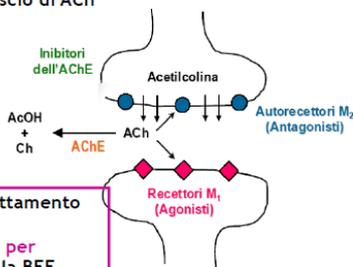
Poi dobbiamo immaginare che la costrizione di questo estere all'interno dell'anello lattonico avvicini gli atomi, permettendo l'adattamento al sito estereo del recettore muscarinico. Presenta una certa selettività per il sottotipo M₁, è stata anche sintetizzata la **tilocarpina** in cui al posto dell'ossigeno, nell'anello, c'è uno zolfo. Anche questo è un buon agonista al recettore M₁.

Vedete che vediamo la scala di attività: agonista pieno M₁, parziale M₃, debole antagonista M₂. Quindi è utilizzato per via topica, ecco come realizza una buona selettività d'azione.

Il suo meccanismo d'azione è un'agonista del recettore muscarinico, induce la contrazione del muscolo intraoculare, il muscolo dell'iride e questo permette il deflusso dell'umore acqueo dal canale verso il canale dello Schlemm, riducendo la pressione dell'umore acqueo nell'occhio. Quindi questo, detto malamente, è la base del problema del glaucoma. Quindi questo è sicuramente un agonista muscarinico importante.

Ipotesi colinergica del Morbo di Alzheimer

- ✓ graduale perdita di capacità intellettive correlata con diminuzione neuroni colinergici in diverse aree del cervello
- ✓ deficit colinergico compensato con diverse classi di farmaci, secondo la **teoria del "potenziamento colinergico"**:
 1. **inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChE)** es tacrina
 2. **precursori della colina** (fosfatidilcolina)
 3. **rilascianti dell'ACh**, facilitano il rilascio di acetilcolina dalle terminazioni presinaptiche (mimano l'influsso di ioni che innescano il rilascio del neurotrasmettitore, Ca²⁺, K⁺)
 4. **agonisti ai recettori postsinaptici M₁ e M₃**;
 5. **antagonisti ai recettori M₂ e M₄**, autorecettori presinaptici che regolano con un meccanismo a feed-back negativo il rilascio di ACh
 6. **agonisti nicotinici**



- ✓ al momento gli AChEI rappresentano il trattamento più efficace
- ✓ ricerca di agonisti (e antagonisti) **selettivi per sottotipi recettoriali** e in grado di superare la BEE

Parliamo ora degli agonisti muscarinici riguardo la famosa ipotesi colinergica. In tutte le demenze di origine vascolare o l'Alzheimer si è fatta avanti negli anni un'ipotesi seconda la quale vi fosse un deficit colinergico alla base.

In realtà sappiamo che la patologia è più complessa, ma gli altri target non hanno portato a dei trattamenti utili (fatta eccezione per la memantina ? che poi

vedremo più avanti e che si può utilizzare anche nelle fasi non più gravi della demenza).

Questa ipotesi porterebbe a pensare all'utilizzo di agonisti dei recettori muscarinici, anche se si è fatta un'ipotesi secondo la quale possano essere utili dei recettori nicotinici.

In realtà vedremo che i composti utili e oggi utilizzati sono dei colinomimetici cosiddetti indiretti, cioè non degli agonisti muscarinici, ma, invece, sostanze che potenziano l'azione muscarinica per via indiretta, non andando a reagire direttamente sul recettore, ma andando per via indiretta ovvero bloccando il famoso enzima che idrolizza in maniera così potente e così veloce l'ACh rilasciata. Se blocca l'enzima l'ACh può permanere per un tempo più lungo nello spazio intersinaptico, quindi attivare e riattivare il recettore muscarinico postsinaptico.

Nel potenziamento delle funzioni del recettore colinergico visto che ci sono così forti limiti alla progettazione di agonisti, si è preferito concentrare gli sforzi su un'azione indiretta, andando a progettare degli efficaci inibitori enzimatici, quindi per fare un esempio l'exelon che è una specialità, generico a base di rivastigmina, inibitore dell'acetilcolinesterasi usato nel trattamento delle demenze.

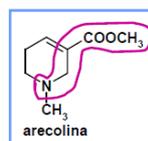
Arecolina

Sono stati fatti dei tentativi per avere dei buoni agonisti muscarinici, un'idea, per esempio, l'ha data l'alcaloide arecolina estratta dai semi di una pianta che ha una struttura con un ciclo che è una tetraidropiridina (?) che ha un sostituito estereo sintetizzata e quindi studiata per la sua possibilità di essere utilizzata come agonista.

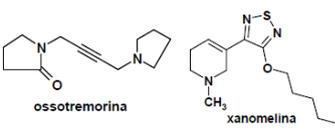
Il problema aggiuntivo, di cui non abbiamo parlato finora, è che per avere un buon agonista muscarinico utile nelle demenze, dovremmo avere **una molecola che sia in grado di attraversare efficacemente la BEE**. Purtroppo ha una pKa intorno a 7.8, basta questo perché abbia una buona percentuale di farmaci protonato.

arecolina

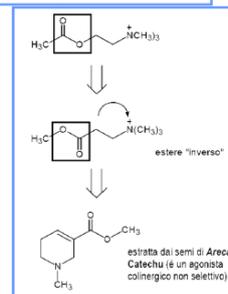
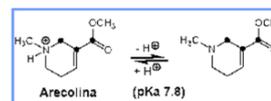
- ✓ estratta dai semi di *Areca catechu*
- ✓ sintetizzata secondo il criterio dell'estere inverso, poi sintetizzati analoghi a catena più lunga
- ✓ problema di superamento della BEE, in quanto ionizzata all'83% a pH fisiologico (pKa: 7.8)



ossotremorina e xanomelina



- ✓ xanomelina, **bioisostero non classico** dell'arecolina, agonista muscarinico M₁/M₄ promettente nelle sperimentazioni per il trattamento del morbo di Alzheimer, non tollerata per os, usata per via transdermica



Viene sintetizzata secondo il criterio dell'estere inverso, non vedremo molte sintesi, ma alcuni concetti devono essere chiari. Osservando l'acetilcolina vedremo che deve essere rispettata la regola del 5 anche qui, ma se guardiamo la posizione dell'estere il ponte etilenico tra l'azoto e l'ossigeno estereo, poi l'estere è un estere di un aminoalcol legato al carbonio in β .

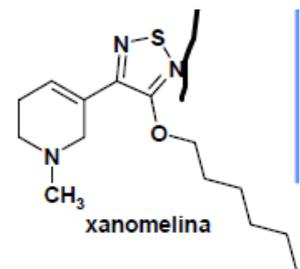
Nella progettazione del farmaci dove la porzione carica e l'estere sono due elementi importante per l'interazione, può essere fatto uno switch delle due posizioni. Se faccio dell'acetilcolina un estere inverso non sarà più un estere dell'amminoalcol colino, ma sarà un estere con il metanolo.

Ho mantenuto i due elementi importanti per il sito di legame, sono anche alla giusta distanza, ma lavorando bene posso fare questo spostamento. La molecola dell'arecolina presenta questa inversione dell'estere, anche facile da sintetizzare.

Ha lo svantaggio di non attraversare così facilmente la barriera ematoencefalica, ha anche lo svantaggio di non essere così selettiva, alla fine non se ne è fatto nulla (non è un farmaco).

Xanomelina

Questo però ha portato allo studio e alla sintesi di altre due molecole, una è l'ossotremolina e l'altra è la xanomelina. Per esempio nella xanomelina, essendo un analogo dell'arecolina, si è cercato di migliorare la lipofilia aggiungendo una catena lunga lipofila e si è fatto un bioisostero non classico inserendo l'anello tiadiazolico per avere una porzione analoga in parte all'estere. Questa è una molecola promettente ma non è un farmaco.



INIBITORI DELL'ACETILCOLINESTERASI O COLINOMIMETICI INDIRETTI

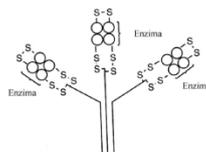
Abbiamo concluso la parte dedicata agli agonisti al recettore muscarinico, volevamo affrontare come, attraverso i diversi agenti terapeutici, le diverse classi di agenti terapeutici, possiamo potenziare una trasmissione colinergica insufficiente, inadeguata. Abbiamo visto la via diretta, andare a sintetizzare degli agonisti al recettore muscarinico con caratteristiche di farmacocinetica, se non di farmacodinamica, migliori, più favorevoli rispetto all'acetilcolina stessa.

L'altra strategia è quella di ricercare un'azione colinomimetica indiretta, andando cioè a prolungare il tempo di vita dell'acetilcolina a livello della trasmissione sinaptica. Questo secondo approccio si realizza andando a sintetizzare gli inibitori dell'enzima acetilcolinesterasi che avevamo localizzato a livello del tessuto nervoso, a livello della sinapsi, proiettato nello spazio intersinaptico. Di fianco al recettore c'è l'enzima, questo enzima è rappresentato per far capire quanto sia efficiente questa proteina enzimatica, quanto sia fisiologicamente efficiente la distruzione dell'acetilcolina una volta che è avvenuta la trasmissione dell'impulso.

Questa struttura la si conosce benissimo, oramai è stata descritta, cristallizzata, sequenziata, quindi si sa che ha una struttura ad albero di questo tipo. C'è un macromolecola di collagene che si lega a tre ramificazioni che sono tenute da ponti disolfuro. Per ogni ramificazione sono legate 4 subunità enzimatica (cerchi nella figura), ogni cerchio è una subunità dell'enzima, ciascuna delle quali ha un suo sito catalitico, ha un suo attivo.

Inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChEI) o colinomimetici indiretti

- ✓ proteina enzimatica purificata, sequenziata, descritta nella sua struttura quaternaria (studi di modellistica molecolare e cristallografia a raggi X)
- ✓ struttura ad albero: collagene che si lega su tre rami con ponti disolfuro a 4 subunità enzimatiche. ciascuna con sito catalitico (ogni enzima ha 12 siti attivi)



Interazioni di legame al sito attivo di AChE

- ✓ sito catalitico dell'enzima ospita punti di attacco per gruppo estereo e testa cationica, siti esterasico ed anionico
- ✓ sito anionico: a) gruppo carbossilico di un residuo di acido glutammico oppure b) ipotesi di interazione dell'N quaternario con il sistema elettronico π di un residuo di triptofano; tasche idrofobiche per ospitare i metili, ma non gruppi più ingombranti
- ✓ protonazione dell'O carbonilico avviene da parte di un protone imidazolico di un residuo di istidina
- ✓ attacco in modo concertato del residuo nucleofilo -OH di una serina al carbonio elettrofilo

Per ogni molecola di acetilcolinesterasi ci sono ben 12 siti catalitici attivi, questo giustifica il fatto che, immediatamente, nell'arco di pochi millisecondi, tutta l'acetilcolina liberata sia distrutta. Vi è un enzima estremamente efficiente.

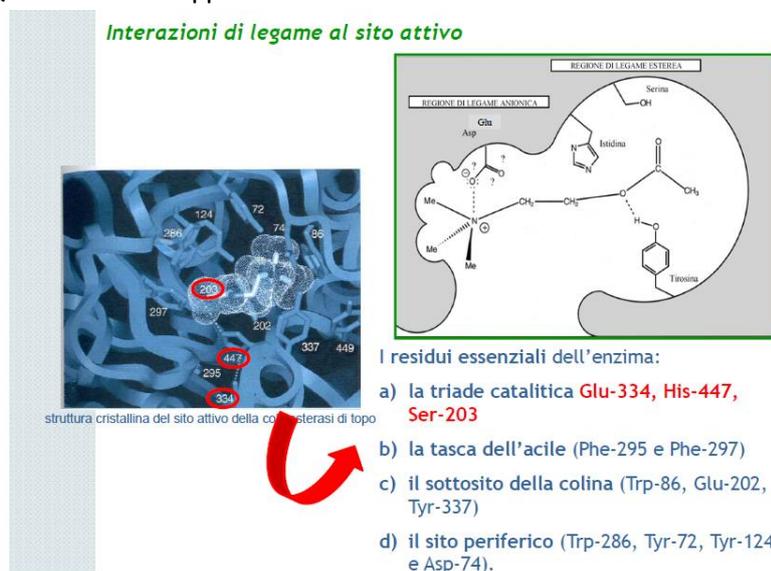
A noi interessa parlare di strutture chimiche, di come una struttura così efficiente possa essere bloccata, inibita nella sua azione. Il risultato sarà che l'acetilcolina ha una vita fisiologica maggiore, si potenzia la trasmissione colinergica, sappiamo come è il substrato di questo enzima, è sempre l'acetilcolina. Quindi sappiamo quali sono i requisiti strutturali per richiamare e legare una molecola come l'acetilcolina. Possiamo supporre che ci siano nuovamente, potremmo individuare in una mappa analoga a quella del recettore muscarinico, un sito estereo e un sito anionico. Possiamo chiamarlo sito esterasico perché è un sito dove si rompe, viene liscio il legame estereo.

Il sito anionico di questo enzima, del sito catalitico è quello che deve tenere legato la testa cationica, l'azoto quaternario. Quindi dovrà avere una catena laterale di un sito di aminoacido che ha una carica negativa, esattamente come avevamo visto nel recettore muscarinico.

Ci sono diverse ipotesi di interazioni che può avere l'azoto quaternario.

Inoltre abbiamo visto che, normalmente, nell'attività di un sito attivo di un enzima, nel sito catalitico, si parla della triade catalitica, di catene laterali di aminoacidi che hanno ruoli ben specifici. Anche qui ritroviamo la stessa triade.

Questa è una rappresentazione della struttura cristallina del sito attivo di una colinesterasi, murina,



rappresentata con il suo substrato. Ci sono gli stessi enzimi, le stesse catene laterali degli stessi enzimi. Abbiamo, nel sito catalitico dell'acetilcolinesterasi, una porzione dove far accomodare la testa cationica, abbiamo, di nuovo, nel sito anionico, un residuo o di acido glutammico o di acido aspartico (secondo alcuni ricercatori c'è l'aspartico, secondo altri il glutammico, per questo ci sono i punti interrogativi). Si

proiettano nella tasca che dà un'interazione di tipo ionico, questo è il sito per la porzione ammonica quaternaria. Anche qui si sono delle piccole tasche idrofobiche dove vanno a proiettarsi i metili, interazioni di tipo ionico. Vediamo gli altri elementi della triade, un residuo di istidina in cui abbiamo un anello imidazolico che è in grado di dare un support, attraverso il suo equilibrio acido-base, a scambiare protoni con il substrato, con l'obiettivo di cambiare i requisiti di elettrofilia e nucleofilia di alcuni elementi del substrato.

Poi c'è, l'altro elemento della cosiddetta triade catalitica, il nucleofilo, in questo caso è un residuo di serina; il nucleofilo, all'interno di un'esterasi, andrà ad attaccare quello che è il centro più elettrofilo del substrato ovvero il carbonio carbonilico.

Poi abbiamo ancora un residuo tirosinico, che ferma, contribuisce a interagire con il substrato e tenerlo fermo, con l'ossigeno estereo.

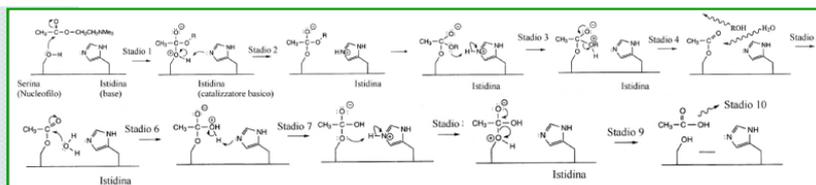
La triade catalitica è costituita, nell'ipotesi del ricercatore dal cui articolo è stato preso questa immagine, da:

- ❖ Un residuo di acido glutammico il numero 334 nella sequenza aminoacidica della sequenza enzimatica;
- ❖ un residuo di istidina il 447;
- ❖ un residuo di serina.

Nell'immagine ritroviamo i numeri che corrispondono anche alla proiezione ai residui delle catene laterali di questi aminoacidi.

Vedremo che appunto abbiamo l'ingombro spaziale della molecola del substrato, dell'acetilcolina, abbiamo il 334 (il residuo di acido glutammico), vediamo la porzione dell'azoto quaternario dell'acetilcolina, il residuo di acido glutammico darà un'interazione di tipo elettrostatico. Qui vedete rappresentato l'anello imidazolico, il residuo della catena laterale dell'istidina, che dà una reazione acido-base. Poi c'è la serina 203 che si proietta da dietro ed andrà ad attaccare il carbonio carbonilico. Nella tasca dell'acile ci sono dei residui di fenilalanina che servono a dare delle interazioni di Van Der Waals per stabilizzare la porzione acilica, altri aa importanti che sono stati individuati nella porzione che accomoda la colina, poi ancora altri aa nel sito periferico che serve per accomodare anche il ponte etilenico.

Quindi andiamo a vedere nel dettaglio il meccanismo, almeno una parte del meccanismo. Guardando velocemente il meccanismo, non ci interessa l'aspetto biochimico, ma dobbiamo capire come funzionano gli inibitori dell'enzima, altrimenti non ci sarebbe motivo di soffermarsi.



- ✓ **meccanismo idrolisi** è un insieme dei due meccanismi classici:
 1. attacco nucleofilo di uno ione ossidrilico al C carbonilico elettrofilo, ecc.
 2. protonazione dell'O carbonilico in ambiente acido, attacco al C carbonilico di una molecola di acqua, collasso dello stato di transizione quaternario per dare l'acido e l'alcol
- ✓ **enzima nella forma acetilata è inattivo** perché non può legare un'altra molecola di acetilcolina
- ✓ normalmente **idrolisi dell'enzima acetilato è rapida**: rigenera la forma iniziale attiva + una molecola di acetato
- ✓ passaggio chiave per la progettazione di inibitori dell'AChE: mentre l'estere carbossilico è molto instabile, un **estere dell'acido fosforico o dell'acido carbammico** è molto più stabile e **l'enzima rimane inattivo più a lungo**
- ✓ la progettazione di due classi di AChE inibitori, reversibili e irreversibili si basa sul criterio della velocità di idrolisi

Come avviene l'idrolisi dell'acetilcolina? La prima interazione che avrà il substrato con il sito catalitico, sarà l'interazione long-range ovvero interazioni elettrostatiche tra una porzione carica positiva e una porzione carica negativamente della proteina. Le interazioni di tipo elettrostatiche sono le più forti energeticamente

parlando, due centri di interazioni possono richiamare il substrato, il sito di legame. Ecco il primo ruolo a uno degli aa della triade, l'aa glutammico o aspartico danno interazione long-range che avvicina il substrato al sito enzimatico.

Poi abbiamo la serina, il nucleofilo, che ha il ruolo di attaccare il carbonio carbonilico dell'estere dell'acetilcolina, l'ossigeno della colina, pur non essendo un nucleofilo così potente, ha dei doppietti elettronici disponibili per attaccare il carbonio carbonilico, si riarrangerà tutta la molecola, uno dei doppietti elettronici del doppio legame carbonio ossigeno, va sull'ossigeno e si forma l'intermedio tetraedrico.

Perché la reazione proceda in modo efficiente, interviene l'istidina, l'imidazolo istidinico, che con l'azoto che ha il doppietto elettronico libero e disponibile sequestra un protone a un atomo di ossigeno, l'imidazolo si protona e quindi il doppietto di legame ossigeno-idrogeno vada sull'ossigeno → stabilizzazione dell'intermedio tetraedrico. Dopo di che l'istidina, che ha l'anello imidazolico, come abbiamo accennato per la pilocarpina che ha un anello imidazolico la cui pKa è circa 6.5, ha discrete proprietà acido-base. L'eterociclo protonato ha anche buone proprietà acide, andrà facilmente a cedere questo idrogeno, il protone all'ossigeno del raggruppamento alcossilico, in questo caso della colina, R non è altro tutto il raggruppamento dell'aminoalcol colina. Quindi una volta protonato l'ossigeno, facilmente l'intermedio tetraedrico collassa, perché questa porzione alcossilica è diventata un ottimo gruppo uscente e quindi l'intermedio tetraedrico collassa, da una parte se ne va l'alcol colina, e dall'altra la serina della colinesterasi risulta acetilata e quindi bloccata. Un sito attivo acetilato o, in generale, acilato sul residuo ossidrilico della serina non è in grado di funzionare come esterasi.

La serina acetilata, l'estere acetilico della serina, può essere facilmente idrolizzato anche solo da un nucleofilo debole come una molecola d'acqua, quindi molto velocemente, attraverso l'attacco nucleofilo della molecola d'acqua, l'assistenza nuovamente dell'imidazolo dell'istidina in questa reazione acido-base, in questo scambio di protoni, molto velocemente questo residuo serinico è nuovamente liberato dall'acetile. In questo modo l'acetilcolinesterasi è di nuovo pronta ad idrolizzare una nuova molecola di acetilcolina. Normalmente è estremamente rapida questa idrolisi della serina acetilata.

Questo è il passaggio chiave per capire come sono stati progettati gli inibitori dell'acetilcolinesterasi, si è cercato di arrivare a molecole che potessero acilare lo stesso sito attivo in modo molto più stabile, facendo in modo che, essendo queste molecole, per la maggior parte, substrato dello stesso enzima, possano lasciare inattivo l'enzima per un periodo di tempo significativo.

Più è stabile questo legame, più l'acetilcolinesterasi rimane a lungo inattiva.

Si parla nella progettazione degli inibitori dell'acetilcolinesterasi di inibitori reversibili o, addirittura, irreversibili basandosi sulla durata dell'inibizione.

La maggior parte delle molecole che sono state progettate sono degli inibitori che agiscono come substrati stessi

dell'acetilcolinesterasi, vanno incontro alla stessa reazione del substrato, acilano cioè con una porzione della loro molecola quell'ossidrilico serinico, con la differenza di dare un enzima acilato molto più stabile.

Una parte di questi inibitori occupano il sito catalitico, ma non sono substrato dell'enzima stesso, non reagiscono con esso, semplicemente lo occupano.

Inibitori reversibili dell'AChE

due meccanismi d'azione:

1. **substrati dell'AChE**: reagiscono con essa per dare un **enzima acilato più stabile** dell'enzima acetilato, ma ancora in grado di dare idrolisi del substrato e rigenerarsi
2. molecole che si legano all'enzima ma **non** ne sono **substrato**, non reagiscono con esso

1. più utile dal pdv clinico, comprende

- ✓ **arilcarbammati** o **esteri dell'acido carbammico con fenoli** (fisostigmina e analoghi)
- ✓ **alchilcarbammati** (carbaco e betanecolo) molto più stabili dell'ACh e quindi idrolizzate più lentamente

dopo il legame al sito catalitico si ha:

- idrolisi del **carbammato** che **transesterifica il residuo della serina** con l'acido carbammico per dare l'enzima carbamoilato
- **rigenerazione** in un tempo dell'ordine di minuti (ad es. emivita metilcarbammato 15 min contro un'idrolisi dell'enzima acetilato dell'ordine di msec) (carbamoilazione dell'AChE più efficace quando viene operata dagli arilcarbammati)

Dal punto di vista clinico, oggi abbiamo in terapia l'utilizzo di quelli che fungono da substrato, sintetizzati con l'approccio già visto con la produzione degli agonisti muscarinici più stabili, cioè sono dei carbammati.

Abbiamo parlato della modificazione del gruppo acetilosi dell'acetilcolina sostituendo l'acetile con un carbamoile, facendo degli esteri dell'acido carbammico, perché gli effetti elettronici dell'azoto con il suo doppietto libero, sostituzione isosterea dell'acetile, determinava una diminuzione delle caratteristiche elettrofile del carbonio carbonilico e quindi una maggiore stabilità all'attacco da parte delle esterasi.

Abbiamo lo stesso qui, questa volta sono molecole che più che avere un'azione agonista, ricordiamo il carbacolo e betanecolo, hanno un'ottima azione come inibitori di questo enzima.

Abbiamo tanto gli alchilcarbammati, come carbacolo e betanecolo, cioè molecole che si adattano al sito attivo muscarinico e in parte vanno a carbamoilare la serina dell'acetilcolinesterasi, dando un enzima carbamoilato che è idrolizzato più lentamente.

Prevalentemente come inibitori dell'acetilcolinesterasi sono gli arilcarbammati, non molecole di dimensioni ridotte da poter avere un'azione diretta sul recettore muscarinico, ma per avere un'azione selettiva di inibizione dell'acetilcolinesterasi si utilizzano soprattutto arilcarbammato. Sono degli estere dell'acido carbammico con degli alcoli aromatici ovvero dei fenoli.

Anche qui partiamo da un esempio importante, da una molecola di origine naturale, la fisiostigmina.

Quindi il meccanismo d'azione degli arilcarbammati è quello che abbiamo dedotto, sono substrato della serina, carbamoilano il residuo.

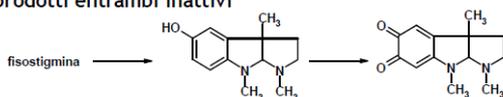
Si aprla di agonisti reversibili e più o meno reversibili. Per comprendere la portata la differente cinetica di una serina di un enzima acetilata o carbamoilata, facciamo un confronto tra la durata di questa acilazione, che nel caso dell'acetile dell'acetilcolina ha una durata di qualche millisecondo, un enzima carbamoilato, nel caso di un metilcarbammato, rimane carbamoilato per quindici minuti. La differenza nei confronti dei millisecondi dell'acetilazione è enorme, verrà comunque rigenerato il sito attivo libero dell'acetilcolinesterasi ma con un tempo enormemente più alto.

Arilcarbammati: fisiostigmina

Fisostigmina (Fisostigmina salicilato Salf®)

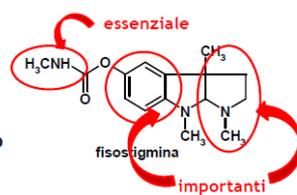
logP: 1.58; pKa: 6.12

- ✓ alcaloide ottenuto dai semi del *Physostigma venenosum* o Fava del Calabar
- ✓ instabile in soluzione acquosa, in quanto si idrolizza a dare eserolina, poi fotoossidata a rubroeserina, rossa, prodotti entrambi inattivi



impiego in terapia

- ✓ usata per anni nella **terapia del glaucoma**
- ✓ usato il suo salicilato nella **terapia di emergenza** per trattare **sovradosaggi di farmaci con effetti anticolinergici centrali** (sintomo depressione) provocati da antidepressivi triciclici
- ✓ a differenza di altri AChEI, non è un sale ammonico quaternario, è lipofila e **supera la BEE**
- ✓ in fase di studio per il **possibile impiego nella terapia dell'Alzheimer** e di altri disturbi cognitivi



Il punto di partenza degli arilcarbammati è un alcaloide di origine naturale che è la fisiostigmina, ancora oggi usata. Isolata dai semi della *Physostigma venenosum*, metabolita secondario della pianta, ha questa struttura con una porzione aromatica. Abbiamo un metilcarbammato (porzione esterea) che è essenziale, un estere con un fenolo, , abbiamo un primo anello aromatico importante e utile per l'interazione con una controparte idrofobica del

sito catalitico dell'enzima, poi c'è l'anello terminale triclo (?) pirrolidinico che ha l'azoto con le proprietà basiche necessarie per essere protonato a pH fisiologico. Quindi abbiamo una serie di differenze rispetto al substrato naturale, la molecola è più complessa rispetto a quella dell'acetilcolina.

Al posto dell'acetato abbiamo il carbammato (un'interazione in più con la porzione aromatica) ma abbiamo sempre l'interazione di tipo ionico, con l'azoto dell'anello pirrolidinico protonato. La pka è 12, quindi abbiamo una pkb di circa 7.9, quindi a pH fisiologico la molecola sarà parzialmente protonata, parzialmente ionizzata.

Questa porzione protonata andrà ad occupare il sito ionico al posto dell'azoto quaternario dell'acetilcolina.

Quali sono i vantaggi di una struttura di questo tipo, al di là del carbammato? Il vantaggio di questa molecola che l'ha resa tale per cui si è pensato di utilizzarla nella terapia dell'Alzheimer, quindi in grado di arrivare al SNC, è quello di passare la BEE, infatti ha una lipofilia normale di 1.58, ma soprattutto non deve avere una cosa che l'acetilcolina ha, ovvero la carica permanente. Ha una pkb di 7.9 sarà solo parzialmente protonata, ha un equilibrio tra la forma neutra e quella protonata tale che permette il passaggio delle membrane e soprattutto della BEE. Ha un problema: è instabile in soluzione acquosa.

Viene anche chiamata eserina, si può idrolizzare il carbammato in soluzione acquosa, abbiamo la porzione fenolica e può dare fotossidazione. Quindi instabile in soluzione acquosa e instabile alla luce.

Utilizzata molto nella terapia del glaucoma, nel caso in cui si abbiano casi di tossicità per sovraddosaggio di anticolinergici, magari antidepressivi triciclici che hanno anche una componente d'azione anticolinergica, si può usare nella terapia di emergenza. È stata presa in considerazione per la terapia dei disturbi cognitivi.

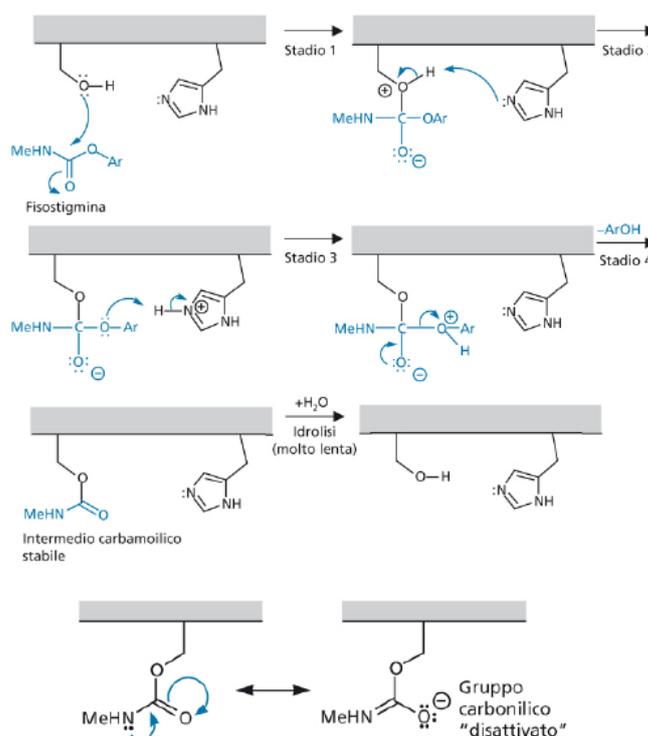
Il meccanismo d'azione lo vediamo solo per dimostrare che il meccanismo d'azione è in tutto e per tutto simile, quindi intermedio tetraedrico, protonazione dell'anello imidazolico, distacco della porzione del fenolo e formazione dell'intermedio carbamoilico.

Il meccanismo è molto simile, la giustificazione alla stabilità di questo legame è che nell'intermedio carbamoilico abbiamo l'azoto con un doppietto che può mettere in copartecipazione con il carbonio del carbonile e può andarsi a delocalizzare anche sull'ossigeno.

Questa delocalizzazione rende molto stabile questo estere del carbammato.

[nell'ultima struttura, quella di risonanza di destra manca una carica positiva all'azoto, che ha una carica positiva in quanto ha quattro legami totali]

Alla fine avremmo un metilcarbammato che hanno un effetto induttivo che favorisce la disponibilità di questo doppietto, sia con un solo metile sia con due.

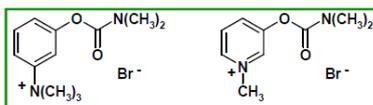


Neostigmina e Piridostigmina

Sono stati fatti degli analoghi sintetici, su questo modello si è andati a semplificare la struttura. Allora è rimasta la porzione del carbammato, in questo caso nella neostigmina e nella piridostigmina (che ha un

Neostigmina (Prostigmina®)

Piridostigmina (Mestinon®)



- miastenia gravis
- in anestesia per antagonizzare i curari
- profilassi pre e post operatoria dell'atonia intestinale

- ✓ analoghi alla fisostigmina a struttura più semplice, mantengono le caratteristiche strutturali essenziali della fisostigmina e dell'acetilcolina
- ✓ carbammato disostituito aumenta potenza inibizione
- ✓ **neostigmina** mantiene gruppo carbammico sostituito, anello benzenico (*meta*-sostituzione) e atomo di N del primo anello eterociclico, distanza tra il gruppo ammonico quaternario ed estere è la stessa della fisostigmina e dell'acetilcolina.
- ✓ **piridostigmina**: N quaternario incorporato nell'anello piridinico
- ✓ inibitori reversibili dell' AChE come fisostigmina, più stabili chimicamente e a più lunga durata d'azione, assunti per os e (no azione centrale) usati nella cura della miastenia grave: piridostigmina ha minori effetti collaterali e maggiore durata d'azione di neostigmina

anello piridinico) si sono utilizzati dei dimetilcarbammati che hanno un'ulteriore stabilità rispetto ai metilcarbammati. La differenza che hanno è la presenza di un azoto quaternario, in questo caso hanno il vantaggio di essere più stabili in soluzione rispetto alla fisostigmina; sono stati sintetizzati con l'obiettivo di non avere un'azione centrale, ma sono somministrati nelle anestesi (come antagonisti dei curari), per bloccare la muscolatura liscia viscerale in pre-anestesia (per abbassare il livello di anestetico e danno un

rilassamento della muscolatura viscerale negli interventi chirurgici dell'addome) e in fase di post-anestesia per velocizzare la ripresa della tonicità muscolare con la neostigmina per esempio.

Quindi sempre per tenere sotto controllo l'azione dei curari e la progressiva paralisi della muscolatura liscia fino ad arrivare al diaframma. Poi si utilizza nella patologia Miastenia gravis (patologia che riguarda la mancanza di tonicità muscolare), si fanno per esempio anche somministrazione sottocutanea anche per os (biodisponibilità variabile), l'azoto quaternario non favorisce il passaggio attraverso le membrane. Raramente sono utilizzate delle forme farmaceutiche per via orale che non favorisce il passaggio per le membrane a meno che non debbano avere un'azione locale a livello della muscolatura intestinale.

L'obiettivo è quello di fare in modo che non avessero un'azione centrale. Sono attualmente in uso.

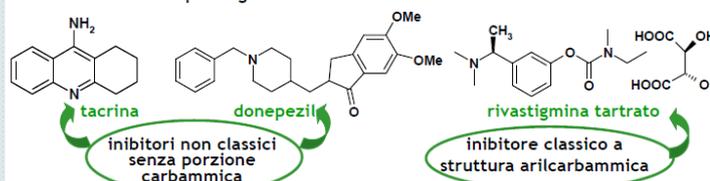
Rivastigmina

Inibitori dell'acetilcolinesterasi in utilizzo ce n'è solo una: la rivastigmina utilizzata nella terapia del morbo dell'Alzheimer, in utilizzo nelle condizioni del cosiddetto *mild cognitive impairment* ovvero situazioni non troppo gravi in cui sembra riuscire ritardare il peggioramento dei sintomi per un periodo variabile dai 6 ai 12 mesi.

Andremo a ragionare su due molecole come la tacrina e il donepezil che sono inibitori non classici, non sono substrato dell'acetilcolinesterasi, non hanno la porzione carbammica. Mentre la rivastigmina tartrato non è altro che un ennesimo arilcarbammato e quindi è il principio attivo dell'exelon che è l'unico farmaco in uso per l'Alzheimer.

Inibitori reversibili per il Morbo di Alzheimer:

danno miglioramento delle capacità cognitive, ritardano da 6 a 12 mesi avanzamento della patologia



tacrina (Cognex®):

- aminotetraidroacridina (1930)
- primo farmaco approvato nella terapia dell'Alzheimer
- molto epatotossico
- non molto selettivo tra le esterasi

donepezil (Aricept®):

- abbastanza selettivo tra le esterasi
- agisce come inibitore non competitivo sulla AChE
- azione principalmente sul SNC
- emivita più lunga
- nettamente minore epatotossicità rispetto alla tacrina

rivastigmina (Exelon®):

(S)-3-[1-(dimethylamino)ethyl]phenyl N-ethyl-N-methylcarbamate, logP:2.3; pKa: 8.89

- azione selettiva sul SNC
- entrato recentemente nella terapia dell'Alzheimer
- t_{1/2}: 2h ma azione può permanere per 10 h
- scarsa dissociazione dell'enzima carbamoilato
- pseudoirreversibile
- poco tossico per il fegato

Vedremo ancora come occupano il sito catalitico sia la rivastigmina che il donepezil, in modo classico o meno e parleremo degli inibitori irreversibili (dalle cronache abbiamo sentito anche che i gas nervini ne fanno parte, vengono ancora oggi utilizzati).

Avevamo presentato nella classe degli inibitori dell'acetilcolinesterasi quelli che vengono utilizzati nel trattamento di alcune forme di demenza, in particolare nel morbo di Alzheimer, in cui sono state identificate tra le possibili cause un deficit colinergico. Quindi bisogna potenziare la trasmissione colinergica una delle possibili strategie è quella di incrementare la vita del neurotrasmettitore a livello sinaptico, bloccando l'enzima che degrada il neurotrasmettitore.

La rivastigmina ha una porzione che è quella dell'estere dell'acido carbammico, quindi possiamo dire che è un inibitore classico a struttura arilcarbammica e agisce come substrato dell'enzima lasciandolo inibito attraverso la carbamoilazione, per un tempo piuttosto lungo.

Questa molecola che ha quindi come sua caratteristica fondamentale, di essere substrato dell'acetilcolinesterasi e di lasciare legato a quella serina, nucleofilo presente sul sito enzimatico, legata con l'acido carbammico.

Le altre molecole riportate sono a strutture completamente diversa, non ritroviamo un'analoga porzione carbammica e quindi hanno un meccanismo d'azione diverso: occupano, come molti inibitori enzimatici, il sito catalitico senza essere substrato dell'enzima stesso.

Il logP della rivastigmina è superiore a 2, sufficientemente lipifila per superare la BEE; la pKa che sarà fondamentale per andare a occupare lo stesso sito catalitico dell'acetilcolina (nel sito catalitico dell'acetilcolinesterasi, l'acetilcolina occupa un sito con due sezioni, uno il sito anionico con la testa cationica, la porzione ammonica quaternaria, e l'altro sito esterasico).

Questo è il commento che dovremmo sapere fare, dovremmo sapere riconoscere in un inibitore o in un antagonista quali siano le porzioni che mimano l'azione dell'agonista o del substrato dell'enzima).

Quindi abbiamo il gruppo aminico, con proprietà basiche, è in grado di protonarsi a pH fisiologico, ha una sua pKa e ci dice che la molecola a pH fisiologica sarà in gran parte protonata. Ciò nonostante è in equilibrio, la forma neutra sarà in grado di superare la BEE. Infatti notiamo la presenza del logP della molecola. La sua caratteristica fondamentale è la lentissima dissociazione che avrà la porzione carbamoilica dal residuo serinico. Per la durata di questa inibizione è un inibitore pseudo-irreversibile. Anche se la molecola ha apparentemente una farmacocinetica non così favorevole, $t_{1/2}$ di due ore, l'effetto della sua azione permane per tempi molto lunghi. Quindi effettivamente tutte le volte che si fa valutare l'attività di una molecola, si valuta tanto l'aspetto farmacocinetico, quello che ci dà l'emivita di un farmaco, che ci dà il risultato dell'assorbimento (a seconda della forma farmaceutica usata) e del metabolismo e dell'eliminazione del farmaco, anche la sua azione farmacodinamica. Concludiamo dicendo che il farmaco non ha un aspetto farmacocinetico così favorevole, ma la sua azione farmacodinamica, cioè l'efficienza dell'inibizione dell'enzima, è molto buona. Quindi il farmaco è entrato in terapia, poco tossico per il fegato. Ha un numero di effetti collaterali gestibili.

Se devo pensare agli effetti inibitori di un farmaco inibitore dell'acetilcolinesterasi, saranno tutti gli effetti collaterali derivati da una stimolazione molto alta del sistema colinergico. Dovremmo ricordarci cosa va ad innervare, ghiandole e muscoli lisci.

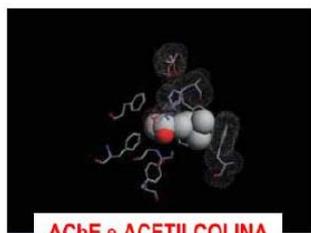
Tacrina

In particolare la tacrina ha una struttura, ha lo scheletro base delle acridine, in particolare una tetraidroacridina, uno degli anelli non è aromatico, non è completamente planare, è un derivato aminotetraidroacridinico. Ha una sintesi molto datata, primo farmaco a entrare nella terapia dell'Alzheimer. È stato ritirato in quanto epatotossico.

Donepezil

È il principio attivo dell'aricept e di altre specialità, agisce come inibitore non competitivo. Un'altra caratteristica è quella di avere un bilancio lipofilo/idrofilo tale da permettere il passaggio della BEE. Anche il donepezil ha caratteristiche adeguate ad essere attivo sul SNC.

Occupava una porzione del sito catalitico occupato dall'acetilcolina, ma occupa anche una porzione aggiuntiva, ha un'inibizione non competitiva.



Vedendo questa immagine, poco chiara, cosa notiamo? Le nuvolette ci danno l'ingombro delle catene laterali degli aa. Per dare un'idea la posizione degli aa nel sito catalitico è mantenuta costante e vediamo l'ingombro delle molecole che occupa lo stesso sito catalitico.

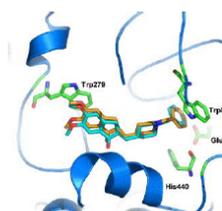
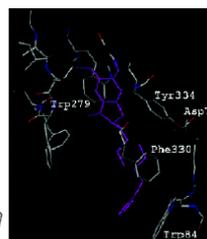
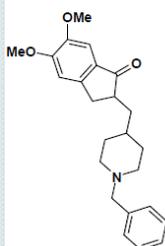
Questa è l'acetilcolina e qui abbiamo, invece, la rivastigmina che ha all'incirca nella stessa posizione il carbammato con i sostituenti, la porzione dell'anello aromatico che occupa parte del sito catalitico.

Il donepezil ha una struttura molto più ampia che occupa anche siti accessori, di legame, oltre al sito catalitico. Qui vediamo che sono coinvolti altri residui aminoacidici.

In particolare la porzione benzilica dà un'interazione π - π con l'anello indolico del triptofano, qui vediamo la catena laterale del triptofano. Chiaramente questa è una porzione che sarà carica positivamente, almeno in parte a pH fisiologico. Poi abbiamo ancora che l'azoto protonato darà un'interazione catione- π che è evidenziata qua dove non si vede bene.

Poi ancora abbiamo un'interazione tra questa porzione indanonica e un residuo di triptofano (il 279). Se dovete commentare l'interazione di questo inibitore enzimatico con il sito catalitico dell'acetilcolineterasi, ritroviamo alcuni aa che abbiamo citato con l'acetilcolina. Abbiamo in questo caso un'inibizione non competitiva.

Ipotetica interazione del donepezil con l'enzima AChE:



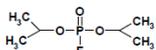
Donepezil lungo la gola del sito attivo dell'AChE sembra instaurare tre interazioni principali

- un'interazione π - π tra l'anello benzilico e l'anello indolico di Trp 84
- un'interazione π -catione tra l'azoto protonato e l'anello fenilico di Phe 330
- un'interazione π - π del sistema indanonico con Trp 279.

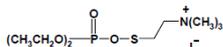
Inibitori irreversibili

Inibitori irreversibili

- ricerca di un'acilazione dell'AChE più stabile all'idrolisi ⇒ inibitori molto efficaci.
- derivati degli acidi fosforico, pirofosforico, fosfonico
- uguale meccanismo dei derivati carbammici, ma enzima rimane come estere fosforico
- enzima si rigenera per idrolisi molto lentamente in termini di ore ⇒ irreversibile
- AChE fosforilata può subire processo di "invecchiamento" ruolo importante nella tossicità: idrolisi di uno o più gruppi fosfoesterei su enzima fosforilato
- formazione di un fosfato anionico legato al residuo serinico molto meno elettrofilo dell'estere fosforico di partenza
- minore tendenza ad idrolizzarsi ed a rigenerare l'enzima
- può diventare insensibile anche all'attacco di nucleofili impiegati come antidoti specifici
- meccanismo sfruttato per progettazione di armi chimiche gas nervini (Sarin)



Isofluorofato (Floropryl) diisopropyl fluorophosphate, Fluostigmine



Ioduro di ecotiofato (Fosfolina)

- impiegati nella terapia del glaucoma ad angolo aperto refrattario all'uso di altri farmaci (miotici a breve durata, beta-bloccanti, adrenalina e inibitori dell'anidrasi carbonica)
- uso topico: il primo come unguento ed il secondo in soluzione
- diminuzione della pressione endoculare fino a 4 settimane
- piuttosto tossici, inducono cataratta e distacco della retina.

Dal punto di vista di strutture importanti di inibitori dell'acetilcolinesterasi utilizzati a questo scopo, questi sono gli unici esempi.

Ci sono alcuni inibitori dell'acetilcolinesterasi che vale la pena citare perché hanno un meccanismo d'azione diverso, in quanto danno un blocco irreversibile dell'acetilcolinesterasi. Apparentemente il meccanismo sembra simile, ma il sito catalitico libero non può più rigenerarsi e si parla di inibizione irreversibile.

Sono strutturalmente appartenenti alla classe degli esteri dell'acido o fosforico o pirofosforico o fosfonico.

Il meccanismo d'azione comporta in questo caso che il residuo serinico sia esterificato da un fosfato, abbiamo sempre la serina come nucleofilo che si lega, attacca questo atomo di fosforo dando quindi l'addotto. Se non che, come nell'isofluorofato, tutte le cariche negative che ci sono, rispetto a un acido carbammico o ad un acetato risulta meno elettrofilo. L'estere risultante risulta meno difficilmente attaccabile da un nucleofilo e per liberare nuovamente il residuo serinico.

Esiste poi sul sito dell'acetilcolinesterasi fosforilata un processo di invecchiamento che porta alla totale irreversibilità dell'addotto.

Quindi il meccanismo apparentemente è lo stesso, il risultato è una derivatizzazione di quella serina molto più stabile.

Isofluorofato

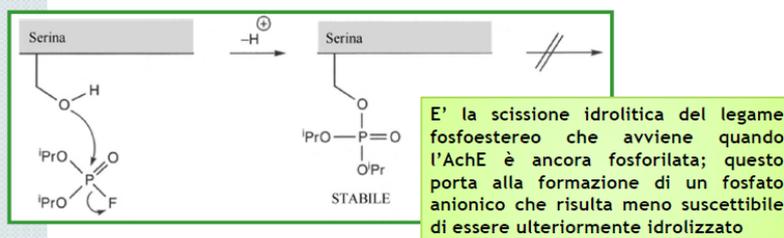
Alcune di queste, come l'isofluorofato, indicato come il diisopropilfluorofosfato o fluostigmina, trova impiego nella terapia del glaucoma, solo quando questo risulta refrattario all'uso di altri farmaci.

Non sono di certo farmaci di prima scelta.

L'uso è topico, sono molto efficaci, l'effetto si può prolungare anche per un mese, ma sono piuttosto tossici anche a livello del sito di somministrazione, possono portare fino al distacco della retina.

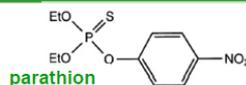
L'impiego, purtroppo, è soprattutto a livello di armi chimiche, ad esempio i gas nervini sfruttano questo tipo di meccanismo e anche quindi l'estrema tossicità del meccanismo stesso.

meccanismo d'azione dell'isofluorofato

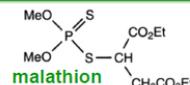


Insetticidi

- derivati esterei fosforici di natura lipofila, come il malathion, parathion, paraoxon, utilizzati in tutto il mondo per incrementare la produzione agricola



parathion



malathion

- Parathion: derivato tiosforico del paraoxon ⇒ tossicità selettiva verso gli insetti
- nell'uomo metabolizzato da esterasi plasmatiche in acidi carbossilici, metaboliti idrofili meno tossici.

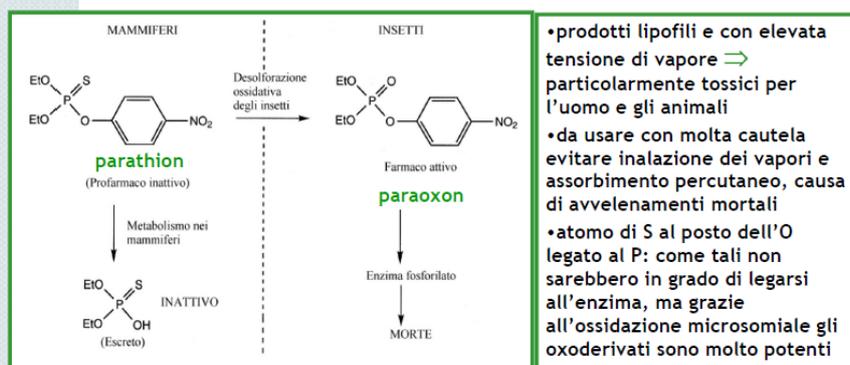
Queste molecole sono inibitori dell'acetilcolinesterasi a struttura estere fosforico, sono utilizzate, ad esempio, come insetticidi. Non si usano gli esteri fosforici, perché sarebbero tossici per l'uomo, ma si utilizzano gli esteri tiofosforici. questi sono due esempi di insetticidi che realizzano una buona tossicità selettiva, esiste nell'insetto e nell'uomo un diverso metabolismo: gli esteri tiofosforici sono attivati ad esteri fosforici solo dal metabolismo degli insetti, mentre il metabolismo dei mammiferi li porta ad idrolisi e quindi la porzione estremamente idrofila viene velocemente escreta.

Al contrario nel metabolismo degli insetti si ha una desolforazione ossidativa che porta alla sostituzione dell'atomo di zolfo con un atomo di ossigeno, quindi all'attivazione di un estere fosforico che ha il meccanismo detto prima. Tuttavia si tratta di molecole che vanno utilizzate con estrema

cautela per evitare rischi allo stesso meccanismo visto prima.

(un nostro compagno fa la seguente domanda) Ma quindi l'uomo non viene per niente intossicato?

(prof) No, ma quando c'è un'inalazione di vapori o assorbimento percutaneo possono esserci in minima parte delle ossidazioni a livello microsomiali per cui si ha una tossicità parziale. Dato il rischio, sono stati sintetizzati dei possibili antidoti.



Antidoti agli insetticidi organofosforici



- tossicità e uso generalizzato come insetticidi ⇒ ricerca di antidoti nei casi di avvelenamento
- ricerca di un nucleofilo sufficientemente potente da idrolizzare gli esteri fosforici senza essere un problema per la salute ⇒ **funzione idrossilamminica**, sufficientemente potente come nucleofilo da aumentare la velocità di idrolisi degli esteri fosforici, ma solo a concentrazioni tossiche per l'uomo

Nell'ultima slide vediamo il processo di invecchiamento dell'estere in cui vediamo che, una volta fosforilato, c'è il distacco dell'atomo di fluoro che lo rende assolutamente stabile e non più soggetto all'attacco di un nucleofilo di media potenza come quelli che potremmo trovare nel nostro organismo.

Per fare degli antidoti è necessario avere nucleofili potenti, la progettazione di questi antidoti utili nei rischi di avvelenamento ha riguardato la ricerca di un nucleofilo estremamente potente in grado di andare ad attaccare l'atomo di fosforo staccandone la porzione.

Un nucleofilo sufficientemente potente è rappresentato dall'idrossilamina. Se non che non può essere utilizzata tal quale, perché sarebbe necessario utilizzarne una concentrazione tale che sarebbe tossica per l'uomo. Allora l'idrossilamina è stata inserita su una molecola che fosse utile tanto perché venisse facilmente assunta, si distribuisse nell'organismo sia perché potesse fare da supporto e direzionasse il nucleofilo sul sito attivo.

Pralidossima

In particolare vediamo la pralidossima, si è ottenuta facendo reagire il gruppo aldeidico in posizione 2 e anziché l'idrossilamina si è ottenuta un'ossima.

Nell'ossima questo gruppo ossidrilo è un nucleofilo estremamente potente.

L'utilità è che nasce dal fatto che l'anello piridinico è un ciclo compatibile biologicamente con l'uomo perchè lo troviamo in una serie di strutture presenti e attivi nel nostro organismo, per esempio nella struttura del NAD e del NADP. Quindi questa molecola che fa da supporto chimico non ha una tossicità

per l'uomo. Quindi questo derivato piridinico in cui l'azoto è quaternario, derivatizzando questa struttura, partendo da un sale di piridinio, in particolare la 2-piridinaldeide, si è ottenuta un'ossima che una carica positiva, un azoto quaternario, che gli permette di direzionarsi sul sito catalitico andando a interagire con il residuo di aspartato (presente nel sito catalitico) e l'ossigeno attacca il fosforo, così si stacca dalla serina dell'acetilcolinesterasi.

Questo antidoto è ancora oggi molto utilizzato nei casi di prevenzione nei soldati che devono intervenire in delle aree dove c'è rischio di presenza di gas nervini. È usata per il trattamento preventivo e quindi abbiamo come risultato del meccanismo d'azione il distacco dell'estere fosforico. Il problema è che è necessario intervenire velocemente.

RICERCA DI ANTAGONISTI MUSCARINICI

Abbiamo concluso la parte relativa come target nel sistema di neurotrasmissione dell'acetilcolina, come target possibili per avere un'azione colinomimetica abbiamo visto la sintesi di agonisti al recettore muscarinico e la sintesi di inibitori dell'acetilcolinesterasi.

Antagonisti muscarinici

• composti che si legano con alta affinità ai recettori muscarinici, ma privi di attività intrinseca

• comunemente chiamati anche **anticolinergici**, **antimuscarinici**, **bloccanti colinergici**, **antispasmodici** o **parasimpaticolitici**

• Effetti:

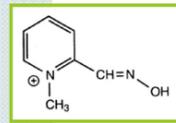
- ✓ diminuita contrattilità della muscolatura liscia del tratto gastrointestinale ed urinario
- ✓ dilatazione delle pupille o azione midriatica e paralisi della struttura ciliare che controlla l'accomodazione visiva
- ✓ ridotta secrezione gastrica e salivare

• Applicazioni:

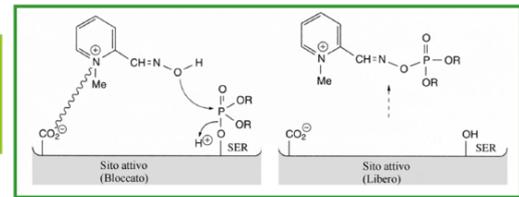
- ✓ spasmi della muscolatura liscia (coliche, ecc.) **spasmolitici**
- ✓ esami oftalmici **midriatici** e **cicloplegici**
- ✓ trattamento delle ulcere gastriche **antiulcera** e preparazione di prodotti contro il raffreddore per ridurre le secrezioni nasali e quelle delle vie respiratorie
- ✓ prodotti contro il mal d'auto, mal di mare, ecc.

• **Precauzioni:** usati con molta cautela in ambito oftalmico → dilatazione pupilla, riduzione del drenaggio dell'iride attraverso il Canale di Schlemm, aumento della pressione intraoculare (antimuscarinici controindicati in caso di glaucoma)

• Nel **SNC** antagonisti muscarinici trovano impiego nel **Morbo di Parkinson**



pralidossima



• reazione di un'idrossilamina con un aldeide o un chetone → **ossima** con atomo di O nucleofilo

• supporto per questa funzione ⇒ **anello piridinico** presente in molte strutture biologicamente attive come il NAD ed il NADP (con basso grado di tossicità)

• N della piridina **quaternario** (per reazione con ioduro di metile) presenta carica ⊕ che dovrebbe aumentare l'affinità del composto per il sito anionico dell'AChE fosforilata

• isomero più efficace è quello ottenuto dalla **2-piridinaldeide (2-PAM)** o **pralidossima**, unico antidoto con provata efficacia contro gli avvelenamenti da esteri fosforici

• **meccanismo di azione:** 1) interazione tra l'N ammonico quaternario ed il sito di legame anionico dell'AChE; 2) l'O nucleofilo dell'ossima si trova in stretta vicinanza dell'atomo di P elettrofilo; 3) attacco nucleofilo dell'O porta all'idrolisi del legame estereo tra l'O della Serina e l'atomo di P; 4) alla fine risulta fosforilato il PAM

• deve essere somministrata a poche ore dall'avvelenamento → prevenire il processo di invecchiamento dell'enzima fosforilato

A che scopo vengono sintetizzate delle sostanze che vadano a bloccare, invece, il recettore muscarinico, parliamo quindi di antagonisti muscarinici. Saranno molecole che hanno sempre affinità per il recettore ma lo occupano senza indurre l'adattamento indotto e il responso biologico, non hanno attività intrinseca.

Se noi conosciamo gli effetti mediati dall'acetilcolina, capiremo quale possa essere il risultato di un blocco del recettore muscarinico.

I recettori sono localizzati a livello della muscolatura viscerale, quindi intendendo la muscolatura del tratto gastroenterico e delle vie urinarie, sono localizzati a livello delle pupille, dove uno stimolo del colinergico è utile nel glaucoma per indurre un effetto miotico, di restringimento della pupilla e soprattutto un deflusso dell'umor acqueo che si accumula ed esercita una pressione dannosa nell'occhio nella camera, nel canale dove si accumula l'umor acqueo.

Poi ci sono anche a livello delle ghiandole come quelle gastriche o salivari.

Quali saranno gli effetti per cui si possono impiegare gli antagonisti muscarinici? Esattamente per avere gli effetti contrari, cioè quando si vuole diminuire la contrattilità della muscolatura liscia gastrointestinale e urinaria, quando si vuole avere una dilatazione delle pupille (azione midriatica non miotica), quando si vuole avere la paralisi della struttura ciliare utile per l'accomodazione visiva. In certi casi è utile quando è necessario fare qualche esame, alcune indagini a livello oculare, quando si vuole mantenere il più possibile bloccato l'apparato ciliare e dilatate le pupille.

Oppure quando si vuole avere una ridotta secrezione gastrica e salivare. Quindi saranno spasmolitici, agenti midriatici o cicloplegici (che servono in esami oftalmici), farmaci antiulcera (blocco della secrezione). La stragrande maggioranza dei farmaci utilizzati come antiulcera appartengono in realtà ad altre classi.

Ciò nonostante esiste un principio attivo impiegato (oggi di meno) efficacemente per trattare l'ulcera che è un antagonista muscarinico, oppure anche prodotti che contrastano la cefalosporina, mal d'auto, mal di mare..

Quali sono le precauzioni? Dato che la dilatazione della pupilla riduce il drenaggio attraverso il canale dello Schlemm, che permette il deflusso dell'umor acqueo, bisogna fare attenzione (impiego solo in casi di esami oftalmici) per il rischio dell'aumento della pressione intraoculare.

A livello centrale gli antagonisti muscarinici li ritroveremo quando parleremo del morbo di Parkinson.

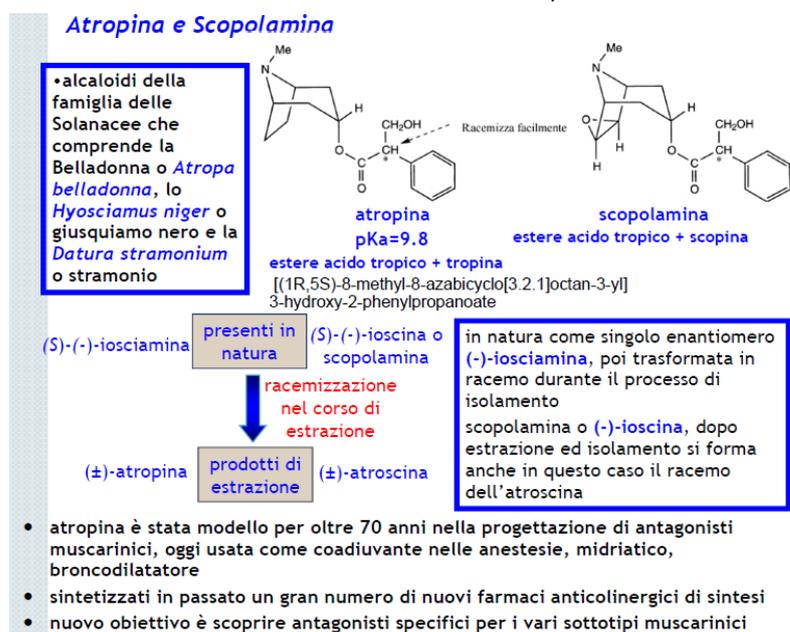
Ci dovremmo ricordare qual è il meccanismo d'azione di una parte dei farmaci utilizzati.

Atropina

Se parliamo di farmaci che hanno un impiego datato ci facciamo a sostanza di origine vegetale. Sicuramente il primo antagonista muscarinico che è stato descritto e riconosciuto, dalla cui struttura sono partite le successive modificazioni che hanno portato negli anni '70 all'attribuzione di una quantità enorme di antagonisti muscarinici è l'atropina. Ha caratteristiche basiche, vediamo subito la presenza del centro basico, l'azoto protonabile, la pianta è l'atropa belladonna che appartiene alla famiglia delle solanacee.

Accanto all'atropina ricordiamo la scopolamina che si distingue per la presenza del ponte epossidico e che cambia il nome dell'alcol. Osservando la struttura vediamo la presenza di un

estere, il nome tradizionale è acido tropico, l'alcol a cui è esterificato è la tropina, mentre nel secondo caso abbiamo la scopina che è l'alcol che presenta il ponte epossidico.

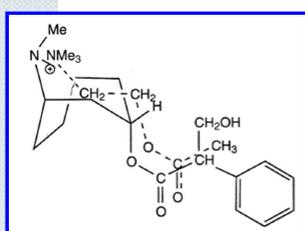


In natura esistono le sostanze come singoli enantiomeri, il processo estrattivo porta alla racemizzazione per cui abbiamo entrambi gli enantiomeri. Allora anche se la forma attiva è quella evidenziata attraverso la nomenclatura IUPAC (1R,5S).

Che cosa vogliamo vedere di questa struttura? Intanto vediamo subito una porzione esterea (può richiamarci una parte della struttura dell'acetilcolina), un centro basico (pka molto alta, quindi a pH fisiologico la molecola è quasi completamente protonata).

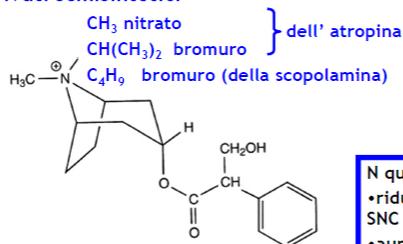
Se andiamo a paragonare la struttura della molecola con quella dell'acetilcolina, vediamo che nonostante

Ricerca della struttura dell' ACh nella molecola dell'atropina



- distanza tra N e O è superiore a due atomi, ma per conformazione assunta dall'anello del tropanolo i due atomi sono orientati in modo che la loro distanza sia simile a quella dell'acetilcolina
- differenza strutturale importante sta nella dimensione della porzione acilica
- ! dimensioni e ingombro dei sostituenti sono un fattore molto importante per determinare l'attività antagonista

Derivati semisintetici



metonitrato
ipratropio
buscopan

- N quaternario
- riduzione effetti collaterali sul SNC
- aumento affinità con il recettore

la molecola sia molto più complessa e nonostante non si riproduca quella famosa regola del 5 di cui avevamo parlato come distanza importantissima da mantenere tra l'azoto e il carbonio terminale perché ci sia attività agonista, vediamo che parte della molecola sia inglobata nel ciclo costringe gli atomi ad occupare una certa disposizione spaziale e le distanze tra l'azoto quaternario della colina e il carbonio carbonilico dell'acetato non sono poi così diverse tra l'azoto del biciclo e il

carbonio carbonilico dell'estere tropico.

Dal punto di vista della distanza tra questi due elementi strutturali, la molecola dell'antagonista non è poi così diversa dalla molecola dell'agonista, quindi può accomodarsi nella tasca del recettore muscarinico.

Per avere un'attività intrinseca la molecola poteva essere modificata pochissimo perché ci sono delle tasche in cui si devono andare ad accomodare i sostituenti poco ingombranti, qui il discorso è ovviamente diverso. Per essere un antagonista deve entrare nel sito attivo, occuparlo, ma non deve dare nessun responso biologico.

Sono sufficienti quelle interazioni come quella ionica del centro carico con il sito anionico, l'interazione del gruppo estereo con gli stessi aminoacidi con cui si legava il gruppo estereo dell'acetato; però poi ci saranno la struttura molto più complessa, questo è un discorso tipico degli antagonisti, per esempio qua c'è un anello aromatico, vanno ad attaccarsi su altri punti del recettore, in punti detti **siti accessori di binding** che sono fondamentali, perché legandosi a questi siti accessori la molecola ha una grande affinità perché aumenta i punti di attacco. Ricordiamoci che l'energia del legame che è quella che determina l'affinità della molecola dipende da quanti punti di attacco ci sono, quindi si sommano proprio tutte le interazioni anche se deboli.

Quindi noi non potremmo aspettarci da una molecola come questa un'azione agonista, ma sicuramente antagonista.

Modificazioni della molecola: derivati semisintetici

Prima vedremo delle modificazioni molto limitate, poi vedremo che la struttura è stata dissezionata e ha portato a molte molecole che hanno a primo impatto ricordano poco la molecola di partenza.

Parliamo di derivati semisintetici ovvero derivati che si sono ottenuti a partire dalla molecola naturale vegetale. Sono molecole in cui è stato modificato l'azoto basico dell'atropina rendendolo anziché un centro basico un'azoto quaternario. Per esempio è stato metilato ottenendo la **metilatropina**. Qui abbiamo riportato il controione. Normalmente ogni volta che abbiamo il centro quaternario o il centro basico viene riportato il sale. Per esempio la metilatropina si trova principalmente come nitrato, viene fatto un derivato isopropilico oppure un derivato butilico (come bromuro partendo però dalla scopolamina non dall'atropina).

Il **buscopan** alla fine è il principio attivo di più largo impiego tra i derivati semisintetici della scopolamina.

Quale sarà la conseguenza dell'azoto quaternario? Non ci aspetteremo una grande concentrazione a livello plasmatico, sicuramente abbiamo il blocco degli effetti a livello centrale e non si garantisce un buon assorbimento. Infatti il buscopan viene utilizzato come spasmolitico della muscolatura liscia intestinale, quindi la somministrazione per os non viene fatta per avere una distribuzione efficace del farmaco, ma per avere un'azione a livello della muscolatura liscia intestinale, alla barriera dell'enterocita per arrivare subito al muscolo liscio intestinale.

Anzi si vuole esser certi che l'azione sia localizzata lì e che non sia sistemica.

Inoltre l'azoto quaternario può servire per aumentare l'affinità con il recettore, per garantire l'immediato orientamento di tutte le molecole verso il sito anionico del recettore muscarinico.

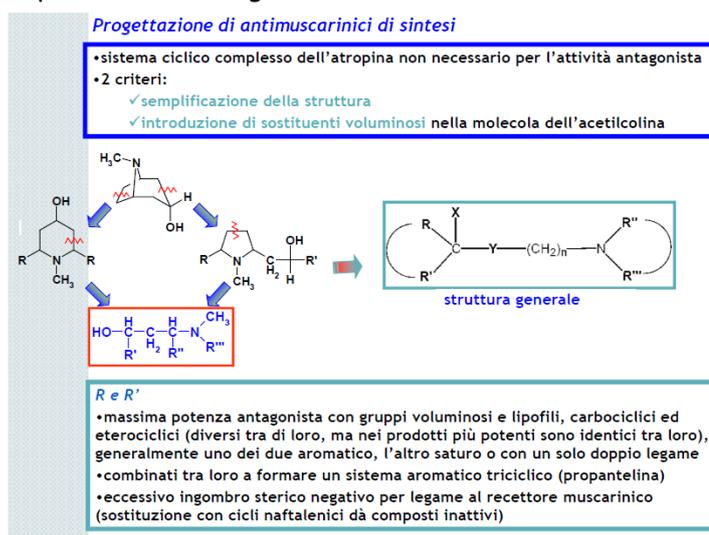
Quindi molecole di questo tipo se sono utilizzate, normalmente la via di somministrazione deve seguire il sito di azione in cui vogliamo avere un'azione topica.

Quindi quando abbiamo visto le vie di somministrazione quelle topiche sono: cutaneo, ma anche vie di azione non sistemica per os (basta che sia un farmaco con le caratteristiche giuste per non essere assorbito), la via inalatoria...

Progettazione di antimuscarinici di sintesi

Queste erano le modificazioni più semplici, in realtà, la stessa possibilità della molecola dei derivati di accomodarsi sul recettore muscarinico si è ritrovata anche andando a fare delle modifiche sui due criteri fondamentali: il primo è quello della **semplificazione della struttura** (come primo approccio) e il secondo è quello di rendere la **struttura più complessa** perché si vogliono ricercare, riprodurre sullo scheletro ottenuto delle altre porzioni che permettano il legame con i famosi siti accessori di binding.

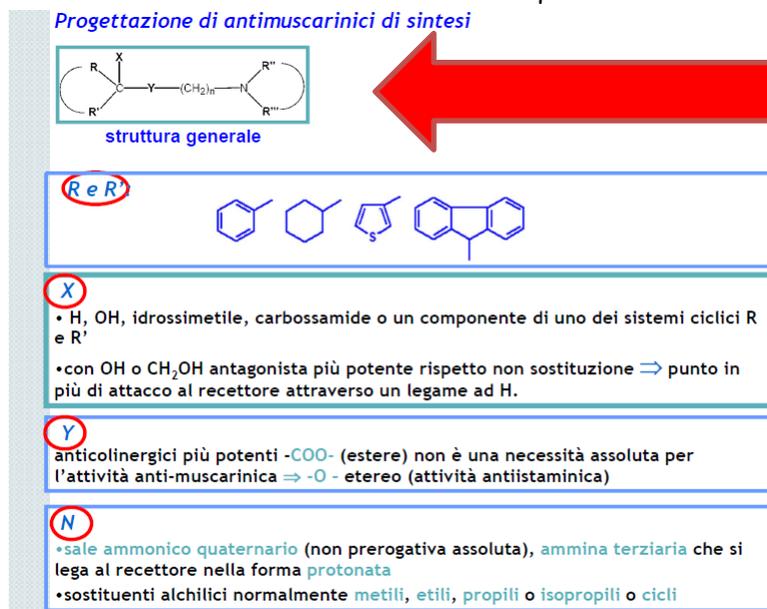
Da una parte si sono aperti gli anelli, il biciclo che presenta l'atropina che è un target dal punto di vista sintetico assolutamente sfavorito, si è però aperto per andare a verificare se si poteva mantenere l'affinità per il recettore anche senza conservare questa struttura. L'anello a cinque termini viene aperto e otteniamo un derivato piperidinico, apriamo l'anello a sei termini e otteniamo un derivato pirrolidinico.



Qualunque sia il target, l'intermedio a cui siamo arrivati, apriamo anche il secondo ciclo e otteniamo una struttura decisamente più lineare. Dal punto di vista progettuale o passa prima per l'apertura dell'anello a 5 o dall'anello a 6, si fa vedere a grandi linee i legami che sono stati rotti per avere la semplificazione. Il risultato è uno solo, siamo partiti dall'alcol non dall'estere, non è quella la struttura generale degli antimuscarinici che hanno bisogno del legame alla porzione estere per essere antimuscarinici.

Questo è l'approccio che è stato fatto sull'amminoalcol atropina.

Shiftiamoci a una molecola che consideri qualcosa che conservi la porzione esterea, arriviamo a questa



grande struttura generale che include tutte le possibili trasformazioni. In questa struttura generale troviamo la porzione azotata che potrà essere più o meno complessa, inclusa in un ciclo, un'ammina secondaria, terziaria; un ponte indicato in maniera generico come un ponte metilenico ripetuto n volte; c'è un carbonio che, per comprendere tutte le modificazioni fatte, non è nemmeno un carbonio carbonilico.

Nella struttura dell'antagonista c'è una libertà di trasformazione maggiore rispetto alla progettazione

dell'agonista, perché non solo la funzione esterea dà dei legami a ponte di idrogeno (come accettore di idrogeno) dando delle interazioni con il sito attivo, (anche altri gruppi funzionali come ossigeno, gruppo alcolico... possono funzionare per dare interazioni a ponte di idrogeno).

Quando si progetta un antagonista, entro certi limiti, la struttura può essere variata più ampiamente.

Abbiamo un carbonio che non è rappresentato da un carbonio carbonilico di un estere, ma l'abbiamo rappresentato come legato a degli eteroatomi X e Y (mentre X è sempre un eteroatomo, Y non è detto che lo sia), a sua volta legato a dei sostituenti R.

L'arco tra R ed R' ci indica che questi due sostituenti possono essere uniti a formare un tricyclo, elemento molto ingombrante; come l'azoto è indicato come possa essere endociclico.

Quali sono le possibilità per avere un'azione antagonista? C'è necessità che siano ingombranti, voluminosi, lipofili (per avere antagonisti attivi per esempio sul SNC, utili nel Parkinson).

Quindi come R e R' possiamo avere dei gruppi carbociclici o eterociclici, possono essere tutti e due aromatici, uno solo aromatico, uno può essere saturo o avere una sola insaturazione, possono essere combinati tra loro per dare un tricyclo. Con certe sostituzioni può non trovare una collocazione ideale.

Abbiamo X che possiamo ricordare come il carbonio carbonilico, in realtà consideriamo che può non esserci, non è indispensabile, può essere un ossidrilico, può anche essere un idrossimetile, può essere una carbossamide, oppure una carbossamide inclusa in un ciclo.

La modifica può portare a degli antagonisti più efficaci, perché potrebbero andarsi a legare ad aa diversi rispetto all'acetilcolina.

Y è invece l'atomo inserito, quello che poteva essere l'ossigeno estereo, in molti anticolinergici rimane l'ossigeno estereo. Ma può anche essere un'ossigeno etereo; molecole così possono anche in certi casi, spostandosi per altri tipi di attività, adattarsi ad altri recettori. (vedremo poi alcuni esempi)

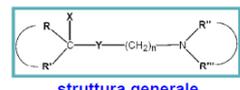
Abbiamo il ponte preso n volte, poi abbiamo la parte azotata che può essere o un sale ammonico quaternario o un'ammina terziaria e i sostituenti alchilici possono essere metili, etili, isopropili.

Allora nel caso dell'antagonista non è più così critica, nell'atropina era abbastanza ridotta; questo ponte, in realtà, può anche essere di due, tre o quattro atomi di carbonio.

I risultati di alcune modifiche: se abbiamo i sostituenti, per esempio, due ciclo aromatici o eteroaromatici, hanno una natura altamente idrofobica aumentano la lipofilia di queste molecole e potrà cambiare il profilo farmacocinetico, potrebbero avere maggiore azione centrale per esempio.

La differenza tra un'azoto terziario e quaternario: l'azoto terziario permette di avere un'azione sistemica, l'azoto quaternario previene l'assorbimento sistemico e quindi avremo un'azione maggiormente a livello del tratto gastrointestinale.

Per fare un esempio a livello del tratto gastrointestinale abbiamo l'azione antispastica o la riduzione della motilità intestinale oppure una riduzione delle secrezioni gastriche.

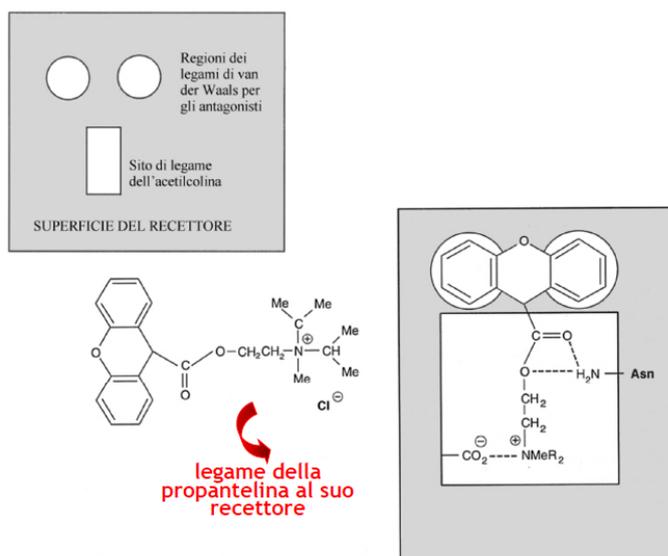


struttura generale

N

- distanza tra N e il C sostituito con i cicli non critica: lunghezza del ponte alchilico da due a quattro atomi di C (agenti anticolinergici più potenti due unità metilene)
- gruppi voluminosi R e R' ⇒ legame al di fuori del sito di legame dell'acetilcolina, con **area di natura idrofobica** ⇒ antagonisti colinergici più potenti R e R' idrofobici (fenile, cicloesile e ciclopentile)
- proprietà **farmacocinetiche** di assorbimento e distribuzione molto migliori con N amminico protonato piuttosto che N quaternario
 - **N terziario**: somministrazione per os o per via parenterale, buon assorbimento e distribuzione con tutte vie di somministrazione ⇒ **azione sistemica**
 - **supera BEE** ⇒ **azione a livello centrale** (ad es. nel trattamento del morbo di Parkinson e di altre patologie che richiedono un effetto anticolinergico centrale)
 - **N quaternario**: assorbimento non buono nel tratto gastrointestinale ⇒ **azione a livello del tratto G.I.**: riduzione delle secrezioni gastriche (trattamento di ulcere, ecc.) o riduzione motilità gastrointestinale

Siti di legame sulla superficie recettoriale



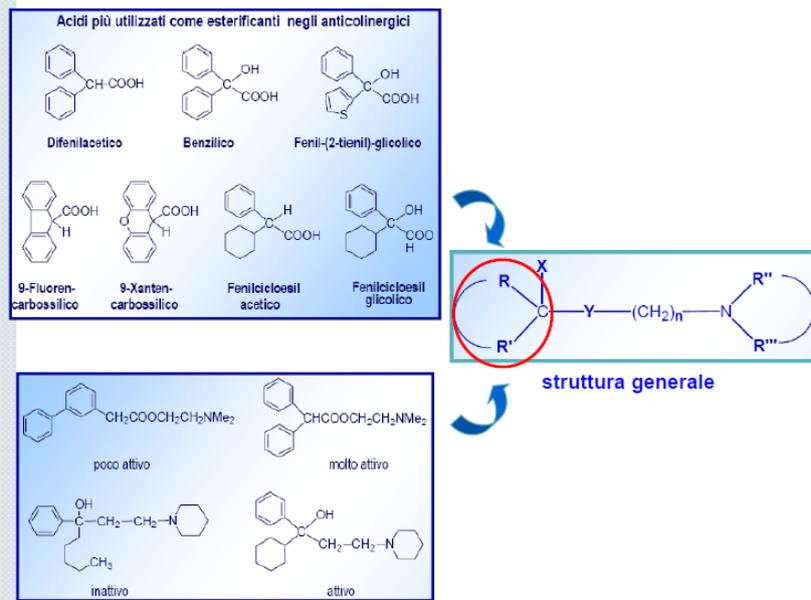
Questa slide ha a che fare con una molecola, un antagonista muscarinico, tra quelli che hanno la struttura più complessa. È utile l'immagine della propantelina perché mostra come rispetto a quello che è il sito attivo del recettore muscarinico a cui si lega l'antagonista, si vede bene come questa porzione voluminosa R e R' che qui è unita a formare un tricyclo vada a legarsi su delle aree che non sono quelle dell'antagonista ma sono le aree accessorie di binding che sono delle regioni in cui la molecola forma delle interazioni di Van Der Waals.

L'area in cui si lega l'antagonista è un'estensione della struttura, va considerata la presenza e la copartecipazione di queste aree accessorie.

Nella propantelina, che non vedremo come sua utilità d'impiego, è uno strumento in questo caso, vediamo lo schema generale; abbiamo l'estere, X è l'ossigeno, Y l'ossigeno, anziché avere il metile nell'acetilcolina o il carbammato che avevamo nel carbacolo, nel betanecolo, abbiamo una porzione molto grande, poi abbiamo il ponte a due atomi di carbonio e poi l'azoto quaternario (isopropile, isopropile, metile).

Questo è lo schema di legame della propantelina al suo recettore.

Qui possiamo avere tutta una serie di possibili porzioni R. Abbiamo il nome dello scheletro base a seconda che ci sia nei triciclici uno xantene piuttosto che altri tricicli base. Possiamo avere un difenile, anzi un acido difenilacetico. Oppure possiamo avere una porzione di acido benzilico, oppure ancora un anello aromatico e un anello eteroaromatico; oppure possiamo anche avere anello aromatico e un anello non aromatico, un cicloalchile.



Quindi l'acido da cui partire può essere diverso. Questi esempi ci mostrano come, a parità di elementi strutturali sia molto importante, per avere l'affinità con il recettore muscarinico, la disposizione di queste due porzioni aromatiche. Poi abbiamo la stessa molecola nella stessa porzione che accomoda i due anelli fenilici in una posizione diversa, quindi questi che non sono legati entrambi alla catena non si accomoderanno bene. Quindi uno sarà un antagonista poco attivo, il secondo sarà un agonista molto attivo.

Sotto invece vediamo come sia importante avere dei sostituenti ciclici aromatici oppure no, nel primo caso abbiamo che X è un ossidrilico e Y non c'è (abbiamo subito il ponte etilenico) e abbiamo un sostituito normale alchilico e non attivo che non dà interazioni sufficienti con le aree accessorie di binding per avere una sufficiente attività, nel secondo caso abbiamo, a parità di atomi di carbonio un sostituito ciclico.

La famiglia del recettore muscarinico è eterogenea, ha diversi sottotipi, l'obiettivo oggi è di avere delle

molecole che vadano indifferentemente su tutti i sottotipi recettoriali, ma se questi sottotipi sono coinvolti in effetti fisiologici diversi vorremmo andare a bloccare uno di questi effetti, magari localizzato a livello di un organo. Quelli che si conoscono meglio e che sono i più utilizzati sono i recettori M1 e M2, che sono accoppiati a proteine G diverse che quindi mediavano all'interno

Sottotipi muscarinici: localizzazione e importanza come target terapeutici

Nome Tipo	M ₁ nervoso	M ₂ cardiaco	M ₃ ghiandolare	M ₄ ?	M ₅ ?
Localizzazione	SNC (corteccia ippocampo), gangli, cellule parietali gastriche	atri, tessuto di conduzione, SNC (presinaptico)	ghiandole esocrine muscoli lisci endotelio	SNC polmone utero	SNC
Agonisti	ACh, CCh, McNA433	ACh, CCh	ACh, CCh	ACh, ?	ACh, ?
Antagonista selettivo	pirenzepina	tripitramina AFDX384	4-DAMP	MT3	?
Meccanismo di trasduzione	↑ IP ₃ , DAG ↑ Ca ²⁺ intracell	↓ cAMP ↑ correnti K ⁺ ↓ correnti Ca ²⁺	↑ IP ₃ , DAG ↑ Ca ²⁺ intracell ↑ cAMP	↓ cAMP ↑ canale K ⁺ ↓ canale Ca ²⁺	↑ IP ₃ , DAG ↑ Ca ²⁺ intracell ↑ cAMP
Proteine G	G _q /G ₁₁	G _i /G _o	G _q /G ₁₁	G _i /G _o	G _q /G ₁₁

CCh = carbacolo; DAG = diacilglicerolo; IP₃ = inositil trifosfato; ↑ = aumenta; ↓ = diminuisce
MT3 = tossina del serpente mamba verde; 4-DAMP = 4-difenilacetossi-N-metilpiperidina metilioduro

della cellula ed gli effetti diversi; uno di stimolo e l'altro di inibizione. Quindi sicuramente anche il meccanismo di trasduzione è importante, così come è importante dove sono prevalentemente localizzati questi recettori.

(Questa slide non è stata nemmeno citata dal prof, la inserisco per completezza)

Il recettore M1 è principalmente localizzato a livello del sistema nervoso (SNC: corteccia, ippocampo, gangliare anche se c'è anche il nicotino), ma non solo. È importante ricordarsi che ci sono anche a livello delle cellule parietali gastriche, mentre il recettore M2 soprattutto a livello cardiaco (come target potenziale di farmaco), è un recettore presinaptico nel SNC con effetti inibitori.

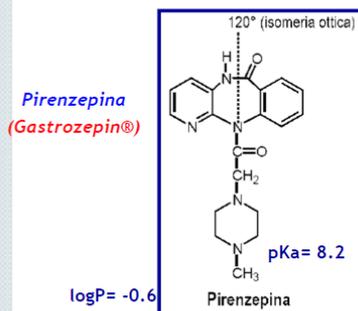
Sottotipi muscarinici: localizzazione e importanza come target terapeutici

Principali effetti funzionali mediati dall'attivazione dei recettori muscarinici in alcuni tessuti periferici		
Tessuto	Risposta	Recettore
Cuore Nodo senoatriale Miocardio atriale	Diminuzione frequenza cardiaca Diminuzione forza di contrazione e durata del potenziale d'azione	M2
Nodo atrioventricolare	Diminuzione velocità di conduzione	M2
Muscolatura liscia Intestino, Tratto respiratorio, Vescica Utero Vasi sanguigni	Contrazione Contrazione Rilassamento Contrazione	M3 M2, M4? M3 M1, M3
Ghiandole esocrine Lacrimali, Salivari, Nasofaringee, Bronchiali, Gastrointestinali, Pancreatiche Sudoripare	Secrezione Secrezione (colinergico "simpatico")	M3 M3

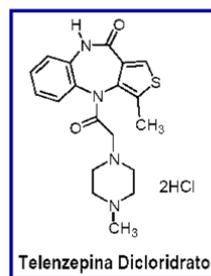
Su alcuni recettori M4 e M5 la localizzazione e quindi anche l'impiego terapeutico non è così chiaro.

Di fatto come target terapeutico quello che è stato maggiormente sfruttato è stato M1, dal punto di vista di un antagonista selettivo.

Antagonisti muscarinici M₁-selettivi



- non supera la BEE (molecola idrofila protonata a pH fisiologico, azione periferica)
- selettività M₁ (affinità per M₁ rispettivamente 6, 17, 50 volte più alta che per M₄, M₃ e M₂)
- inibisce la secrezione acida a concentrazioni cui non influenza salivazione e frequenza cardiaca
- trattamento ulcera peptica e gastroduodeniti
- somministrata per os, i.m., e.v.



- antagonista muscarinico
- selettività M₁
- azione antisecretiva a livello gastrico
- 4-10 volte più potente della pirenzepina

Pirenzepina

L'esempio più importante per dare una SAR specifica e selettiva per il recettore M1 è quella di questo farmaco. La pirenzepina è il principio attivo del gastrozepin, oggi sono altre le classi di farmaci che si usano come i farmaci antiulcera.

Andiamo a vedere qual è la sua struttura e se risponde abbastanza allo schema generale.

Il farmaco ha una porzione che corrisponde alle porzioni R ed R' che sono un anello piridino e benzenico che sono inglobati nel tricyclo, in cui

abbiamo da fare da ponti ai due anelli aromatico ed eteroaromatico una sottostruttura amidica.

Si parla quindi di un'amide endociclica (elemento importante per l'interazione), poi la giunzione delle due porzioni, aromatica ed eteroaromatica, con la catena spaziatrice è data da un altro eteroatomo che è un azoto, legato ad un carbonio carbonilico. Quindi abbiamo di nuovo una sottostruttura amidica che però sarà esociclica. Quindi, essendo azoti amidici, non hanno proprietà basiche, entrano in gioco nell'interazione, ma non è questa la porzione protonabile.

Abbiamo un carbonio carbonilico, un ponte metilenico, anello piperazinico, dei due atomi di azoto quello che ha proprietà basiche maggiori è quello terminale della catena che ha una pKa = 8.2.

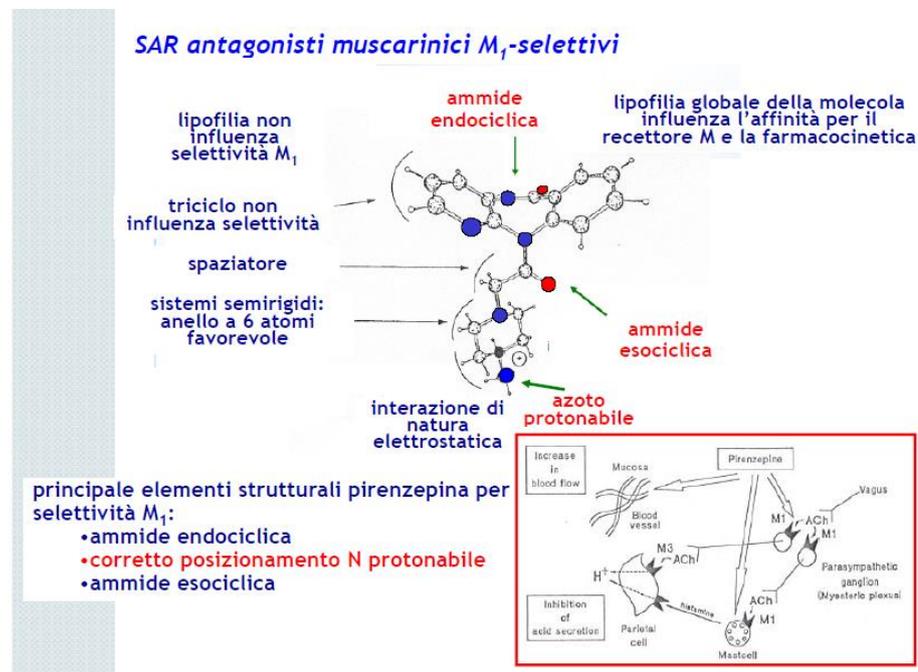
Questa struttura in cui abbiamo immaginatevi questa funzione come elemento di congiunzione amidico che dà anche l'angolo di legame con cui sono orientati i due anelli aromatici, la molecola non è planare, non è di 180° ma di 120°. Quindi per avere questo tipo di orientamento è importante questo ponte amidico, anzi fondamentale.

In realtà a fare da spaziatore tra il carbonio carbonilico e l'azoto protonato a pH fisiologico c'è quest'porzione di molecola che è rappresentata da questo ciclo.

Anche questo ciclo contribuisce all'orientamento dell'azoto terminale, quindi la molecola è certamente con una pKa di 8.2, in gran parte protonata; ma nel complesso la molecola risulta fortemente idrofila. Bisogna conoscere le proprietà chimico-fisiche della molecola che ha un logP negativo, quindi destinata ad avere azione periferica.

Assunta per os non avremo delle condizioni facili per il superamento delle membrane, ancor più impedito sarà il superamento della BEE.

Gli elementi importanti sono il fatto che gli elementi della molecola hanno una certa orientazione determinata per esempio dall'amide endociclica; l'orientamento dell'azoto terminale è determinato dal ciclo, più stretta. L'insieme delle caratteristiche, oltre il fatto che ci porta ad avere un'azione periferica, è importante per avere la selettività M₁.



Andando a fare delle prove di binding selettivo sugli altri recettori clonati per esempio, si vede che in buona parte è più affine per l'M₁ rispetto agli altri. 6 volte più selettivi l'M₁ rispetto l'M₄, 17 rispetto l'M₃ e 50 rispetto l'M₂ (si fa il rapporto tra le costanti).

Quindi siccome sappiamo che gli M₁ sarebbero localizzati anche a livello centrale, ma questa non supera la BEE, allora gli M₁ sono fortemente localizzati a livello delle ghiandole della secrezione acida dello stomaco.

Ecco perché bloccare la trasmissione colinergica a livello degli M₁ vuol dire trattare l'ulcera peptica o gastroduodenale. Infatti questo è un farmaco che veniva assunto per os, per via intramuscolo o per via endovenosa, per dare un'idea questo è un altro antagonista che ha una buona attività secretiva a livello gastrico, più potente della pirenzepina.

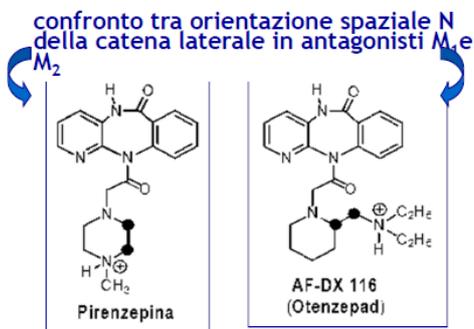
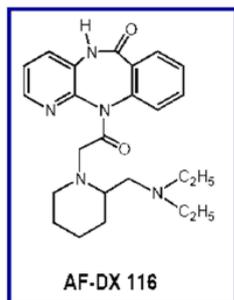
Il limitato sviluppo di questa classe è dato dal fatto che la classe degli inibitori di pompa in realtà detengono il 100% del mercato, l'efficacia di quelle molecole è superiore. Ma per avere un altro antagonista M₁ selettivo, le modifiche che sono state fatte sono limitate: mettere un benzene al posto della piridina e un tiofene al posto del benzene, due sostituzioni isostereiche ma la struttura è sempre quella.

Tanto che, come vediamo nella slide, fa vedere come l'amide endociclica influenzi i due cicli, poi c'è lo spaziatore e poi c'è il ciclo che genera un sistema semirigido che condiziona l'orientamento dell'azoto protonabile. L'orientamento dell'azoto protonabile è fondamentale.

La pirenzepina, come vediamo dall'ultima immagine, agisce anche in una zona gangliare, gli M1 non sono solo a livello gangliare ma anche a livello delle mass-cellule che sono quelle che secernono istamina per stimolare la secrezione acida gastrica.

Otenzepad

Antagonisti muscarinici M₂-selettivi



In sperimentazione clinica per il trattamento di alcune forme di bradicardia

Perché è così importante l'orientamento dell'azoto protonabile? Perché se andiamo a vedere una molecola molto simile alla pirenzepina, abbiamo sempre l'amide endociclica, la piridina, l'anello aromatico, l'amide esociclico, questa volta abbiamo la piperidina dove però l'azoto anziché essere in basso è legato attraverso questo ponte metilenico. Basta cambiare

l'orientamento dell'azoto per avere un antagonista M₂ selettivo.

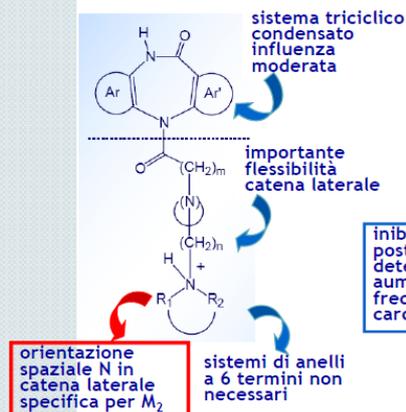
Infatti i numeri di atomi dall'azoto è la stessa, ma l'orientamento cambia.

L'otenzepad è il prototipo in sperimentazione clinica per alcune forme di bradicardia, perché l'acetilcolina a livello degli M₂ induceva effetti bradicardici. Infatti contrasta l'azione della noradrenalina, l'azione adrenergica.

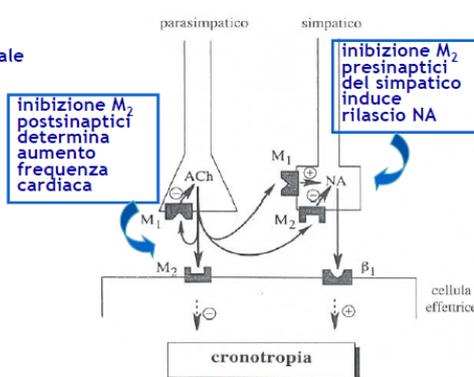
Questi sono target ancora sotto sperimentazione. Il target del sistema adrenergico è più facile, più conosciuto.

L'inibizione di questi M₂ presinaptici favorirebbe il rilascio della noradrenalina nelle terminazioni adrenergiche e colinergiche.

SAR antagonisti muscarinici M₂-selettivi



Antagonisti muscarinici M₂ a livello cardiaco



In realtà questo significa che mentre il ciclo è indispensabile per avere l'orientazione corretta e quindi l'azione selettiva, per avere un'azione M₂ è importante avere una flessibilità della catena; la possibilità che la catena sia libera di ruotare e nel caso dell'irrigidimento molecolare come nel caso dell'otenzepad l'orientazione sia quella prevista dalla molecola.