



Università degli Studi di Genova

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN

CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

TESI SPERIMENTALE DI LAUREA

**Sintesi e valutazione biologica di nuove 5-ammino-1-(2-fenilettil-
2-idrossi)-1H-pirazolo-4-carbossammidi**

Relatore: Prof.ssa Chiara Brullo

Correlatore: Prof.ssa Maria Grazia Signorello

Candidato: Ilaria Mascaretti

Anno Accademico 2020/2021

Indice

1	Introduzione.....	3
1.1	Generalità su p38 MAPK.....	3
1.2	Struttura.....	4
1.3	Pathway ed attivazione.....	5
1.4	Ruolo fisiologico e patologico.....	7
1.4.1	Artrite Reumatoide.....	10
1.4.2	Morbo di Crohn	11
1.4.3	Psoriasi, asma, BPCO.....	11
1.4.4	Malattie cardiovascolari	13
1.4.5	COVID-19	15
1.5	Inibitori in studio	16
2	Background della ricerca e progetto.....	21
3	Discussione	24
4	Parte sperimentale	26
5	Valutazione biologica.....	36
5.1	Raccolta del sangue e procedure di preparazione	38
5.2	Materiali.....	38
5.3	Valutazione dell'inibizione dell'aggregazione piastrinica.....	39
5.4	Valutazione dell'inibizione della produzione di ROS	39
5.5	Valutazione dell'inibizione della fosforilazione di p38	40
5.6	Calcolo del valore IC ₅₀	40
6	Conclusioni	41
7	Bibliografia	43
8	Acronimi e Abbreviazioni	53

1 Introduzione

1.1 Generalità su p38 MAPK

Le proteine chinasi (PK) sono enzimi responsabili della fosforilazione di specifici amminoacidi in diversi substrati proteici; oggi giorno le PK umane risultano la più importante famiglia di enzimi responsabile della modificazione di circa un terzo del proteoma umano.

Le p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) rappresentano una sottofamiglia di serin treonin (Ser/Thr) protein chinasi attivate da molecole segnale extracellulari atte a stimolarne l'azione.

Nel corso degli anni, le MAPK sono state caratterizzate e suddivise in due grandi categorie:

- 1) MAPK convenzionali, ulteriormente suddivise in ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated kinases), c-Jun N-terminal kinases quali JNK1, JNK2, JNK3 e p38, presenti come isoforme α (MAPK14), β (MAPK11), γ (MAPK12), δ (MAPK13);
- 2) MAPK atipiche, così definite per le loro non conformi peculiarità, tra le quali si ritrovano ERK 3/4, ERK7 e Nemo-like chinasi (NLK) [1].

Il target biologico del progetto qui presentato è la p38 la cui isoforma alfa è stata la prima ad essere identificata. Tale isoforma è un polipeptide di 38kDa attivato mediante fosforilazione di una specifica Tyr e che fu caratterizzato in contemporanea da quattro gruppi di ricerca negli anni '90 come proteina responsiva a stimoli di stress ambientale quali endotossine, in particolare esposizione a lipopolisaccaride LPS, iperosmolarità, calore o radiazione UV [2, 3].

In seguito, essendo state identificate le successive tre isoforme, si è reso necessario proporre una classificazione in due distinti raggruppamenti: da una parte p38 α e

p38 β , classificate come ubiquitarie in diverse linee cellulari e tessuti, con un'omologia del 75% nella sequenza amminoacidica ed entrambe suscettibili all'azione di composti in fase di studio in qualità di inibitori (piridinil-imidazoli); dall'altra parte p38 γ e p38 δ (in aggiunta conosciute rispettivamente con le denominazioni stress-activated protein SAPK3 e SAPK4), isoforme con un'omologia del 70%, peculiari sia per la modalità di espressione sia in termini di funzione, ed entrambe non suscettibili all'azione degli inibitori in studio [3, 4].

Al momento le funzioni specifiche delle singole isoforme nei processi fisiologici e patologici non sono state ancora ben definite; per un'esaustiva comprensione si richiedono infatti ulteriori studi. Tuttavia è stato riscontrato come le quattro p38 siano codificate da geni differenti e presentino distinti modelli di espressione tissutale: p38 α è espressa ubiquitariamente a livelli significativi nella maggior parte delle cellule; p38 β è ubiquitaria, con una probabilità di presenza maggiore a livello cerebrale; p38 γ è maggiormente espressa nei tessuti della muscolatura scheletrica dell'adulto; infine p38 δ è tessuto-specifica in testicoli, reni, intestino tenue e ghiandole endocrine, tra le quali si annovera il pancreas dove sembra essere correlata a secrezione di insulina e sopravvivenza di cellule β [1].

1.2 Struttura

A livello strutturale, p38, come altre chinasi, è composta da due domini principali (Figura 1):

- 1) il dominio C-terminale, caratterizzato da una prevalenza di struttura elicoidale;
- 2) il dominio N-terminale composto da β -foglietti [5-7]. Tra questi si ritrova il sito catalitico in cui si posiziona l'ATP in qualità di substrato fisiologico: qui, in

aggiunta al sito di legame dell'adenina, alla tasca del ribosio e alla regione di legame del fosfato, si riscontra la presenza di due ulteriori tasche idrofobiche adiacenti, in fase di studio per la comprensione della disposizione degli inibitori ATP-competitivi di p38 [7].

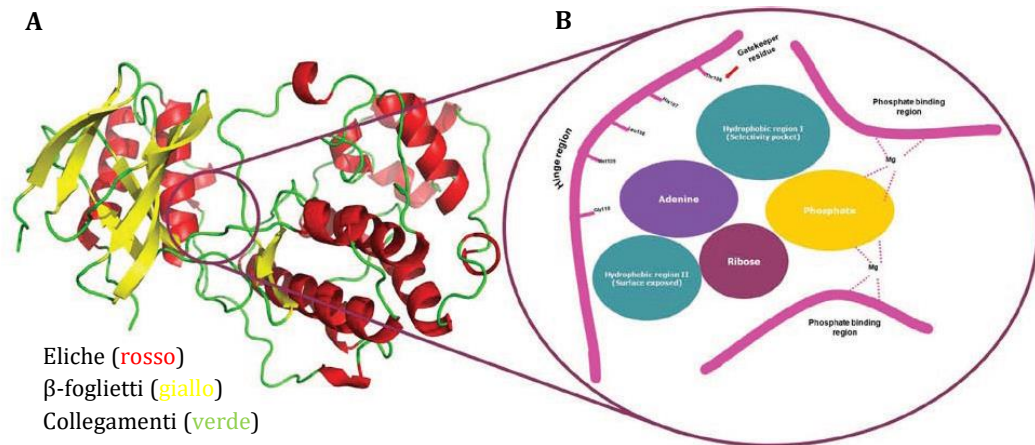


Figura 1. Struttura schematizzata di p38 (A) e struttura del sito catalitico (B) [7].

1.3 Pathway ed attivazione

In linea generale, un percorso di attivazione di una MAPK coinvolge, attraverso meccanismi di fosforilazione, la sequenza MAPK chinasi chinasi (MAPKKK), MAPK chinasi (MAPKK), MAPK.

Quest'ultimo enzima, in particolare, è attivato attraverso una doppia fosforilazione su un dominio altamente conservato specifico della famiglia delle MAPK, il dominio Thr-AA-Tyr, dove con la dicitura AA si intende un amminoacido differente per ogni sottofamiglia di MAPK convenzionali: per ERK è un Glutammato (E), per JNK una Prolina (P), per p38 una Glicina (G) [8]. Dati sperimentali ottenuti da cellule di mammifero mostrano come le 4 isoforme risultino fortemente attivate da numerosi

fattori come stress ambientale, stress cellulare e ossidativo, radiazioni UV, condizioni di ipossia o ischemia, lipopolisaccaride (LPS), chemochine o citochine infiammatorie quali interleuchina-1 (IL-1) e fattore di necrosi tumorale (TNF α) [2]. In questo ultimo caso IL-1 e TNF α attivano le isoforme p38 con l'ausilio di proteine TRAF, che reclutano diverse MAPKKK tra cui MLK, ASK1, MEKK in base al tipo di cellula coinvolta [9]. Queste fosforilano le MAPKK, responsabili dell'effettiva attivazione della p38. Principali esempi di queste MAPKK sono MKK3, più selettive, e MKK6, conosciute anche come SKK3. Diversi studi ipotizzano che anche MKK4 sia coinvolta, specialmente in caso di stimolo attraverso radiazione UV (Figura 2) [8].

Recentemente, nonostante l'attivazione sia convenzionalmente regolata dalla cascata chinasi sopra descritta, sono stati proposti due ulteriori possibili meccanismi di autofosforilazione in seguito a interazione con proteine: il primo, descritto sia in processi immunologici sia in casi di ischemia cardiaca e selettivo per l'isoforma α , coinvolge l'interazione di questa con la proteina TAB1; il secondo osservato principalmente in linfociti T, prevede l'innescò di una tirosin chinasi che fosforila l'isoforma α su un residuo non canonico (Tyr323) [10].

Una volta attivata, la p38 subisce una modifica conformazionale, con un cambiamento nell'allineamento di entrambi i domini chinasi (C-terminale e N-terminale) in modo da migliorare l'accesso al substrato ed effettuare la fosforilazione su residui alcolici degli amminoacidi serina e treonina [8].

In generale, la durata del processo di fosforilazione si rivela un fattore determinante per il destino della cellula: alcuni studi riportano come una fosforilazione definita "sostenuta nel tempo" possa, nella maggior parte dei casi, essere associata a fenomeni apoptotici; una fosforilazione definita "transiente" risulta invece correlata a sopravvivenza cellulare [11-13].

La disattivazione delle p38 avviene mediante l'attività di specifiche fosfatasi, come PP2C (Serina/Treonina fosfatasi) e PTP (Tirosina fosfatasi) che riportano le p38 allo stato inattivo [14].

E' inoltre opportuno sottolineare come la presenza di p38 sia stata riscontrata a livello citoplasmatico e nucleare; in particolare è stato dimostrato un fenomeno di traslocazione e conseguente accumulo nel nucleo in seguito ad attivazione sotto determinato stimolo di stress. Infine, quando attivate, le p38 interagiscono con numerosi substrati quali ulteriori chinasi MNK1/2, MK2/3 o MAPKAP- K2/3 a livello citoplasmatico, regolatori dell'espressione genica ATF1/2/6, MK5/PRAK, MSK1/2, HSP-70 p53 a livello nucleare [15].

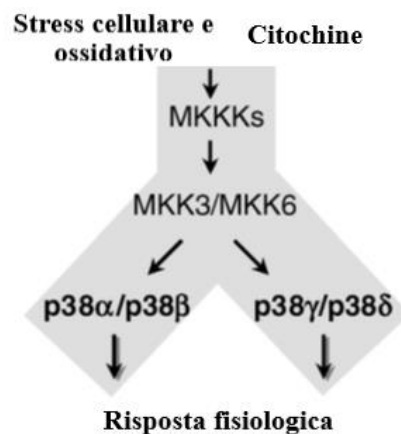


Figura 2. Pathway di attivazione delle diverse isoforme di p38.

1.4 Ruolo fisiologico e patologico

Numerosi studi riportano come le p38 siano coinvolte in diversi processi cellulari quali regolazione del ciclo cellulare e induzione di apoptosi, fenomeni correlati a plasticità neuronale, migrazione chemiotattica, biosintesi di citochine pro-infiammatorie (PIC) e in differenti patologie di origine infiammatoria, malattie

cardiovascolari, cancro, malattie neurodegenerative e diabete insulino-resistente. In particolare, differenti studi sulle p38 si sono focalizzati sulla loro funzione in patologie di origine infiammatoria al fine di determinare il coinvolgimento di tali proteine nell'eziopatogenesi di tali malattie e pertanto con l'obiettivo di progettare nuove strategie terapeutiche [16].

E' stato riscontrato come le p38 svolgano un ruolo chiave nella biosintesi di citochine pro-infiammatorie, la cui sovra-espressione sembra causare numerosi disturbi. Tra questi, si evidenziano patologie autoimmuni quali Artrite Reumatoide (AR) e Morbo di Crohn, appartenente alle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), psoriasi, spondilite anchilosante, asma e broncopneumopatia cronico ostruttiva (BPCO), pancreatite, aterosclerosi e molte altre.

Generalmente le malattie autoimmuni prevedono come principale terapia l'utilizzo di Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei (FANS), alcuni sulfamidici, corticosteroidi, immunosoppressori, e farmaci biotecnologici; poter disporre di ulteriori alternative terapeutiche è ovviamente di estrema importanza.

Analizzando il razionale per cui le p38 sono oggetto di investigazioni, essendo queste coinvolte nella produzione di citochine, principale causa di origine e mantenimento, attraverso amplificazione a feedback positivo, del fenomeno dell'infiammazione, appare evidente come un'inibizione delle p38 comporti un blocco nella produzione di tali molecole segnale e, di conseguenza, un'inibizione dell'infiammazione stessa. Nello specifico, tra le citochine, la cui espressione si rivela regolata da p38, si annoverano il TNF α (fattore di necrosi tumorale), numerose e differenti interleuchine quali IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-4, IL-13 ed importanti mediatori infiammatori quali MCP-1, interferone- γ e COX-2 (Figura 3) [8, 17].

Nonostante la produzione e secrezione di citochine risulti limitata nel tempo,

queste influenzano la sintesi e l'azione di ulteriori citochine, che a loro volta, manifestando effetti autocrini o paracrini, stimolano la creazione della cosiddetta "tempesta citochinica" rispettivamente nella cellula stessa o nelle cellule adiacenti. A tal proposito, prima di focalizzare l'attenzione sulle patologie infiammatorie in cui p38 risulta coinvolta, è necessario soffermarsi su un'ulteriore dettaglio: a livello piastrinico, il mediatore citochinico PAF (fattore attivante le piastrine) sembra innescare, attraverso meccanismi autocrini e paracrini, l'attivazione di p38 ad opera di LPS con conseguente produzione di interleuchina IL-8, una potente chemochina in grado di richiamare ed attivare i neutrofilii in sede di infiammazione, dove le cellule si dimostrano allertate e predisposte alla produzione di nuovi mediatori infiammatori [18]. Diversi studi mostrano come, sia IL-8, sia i neutrofilii da essa stimolati, contribuiscano alla patogenesi e al potenziamento del fenomeno infiammatorio alla base di molte patologie. Per quanto concerne i neutrofilii, particolare importanza riveste il processo di fagocitosi che, prevedendo la secrezione di enzimi litici, provoca l'attivazione della NADPH ossidasi con creazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), ulteriore produzione endogena associata all'infiammazione cronica [19, 20].

Recentemente l'inibizione del processo di reclutamento dei leucociti è stata proposta come aspetto fondamentale per la progettazione di farmaci per patologie in cui la componente infiammatoria è preponderante, quali ad esempio aterosclerosi, osteoporosi o malattia di Alzheimer.

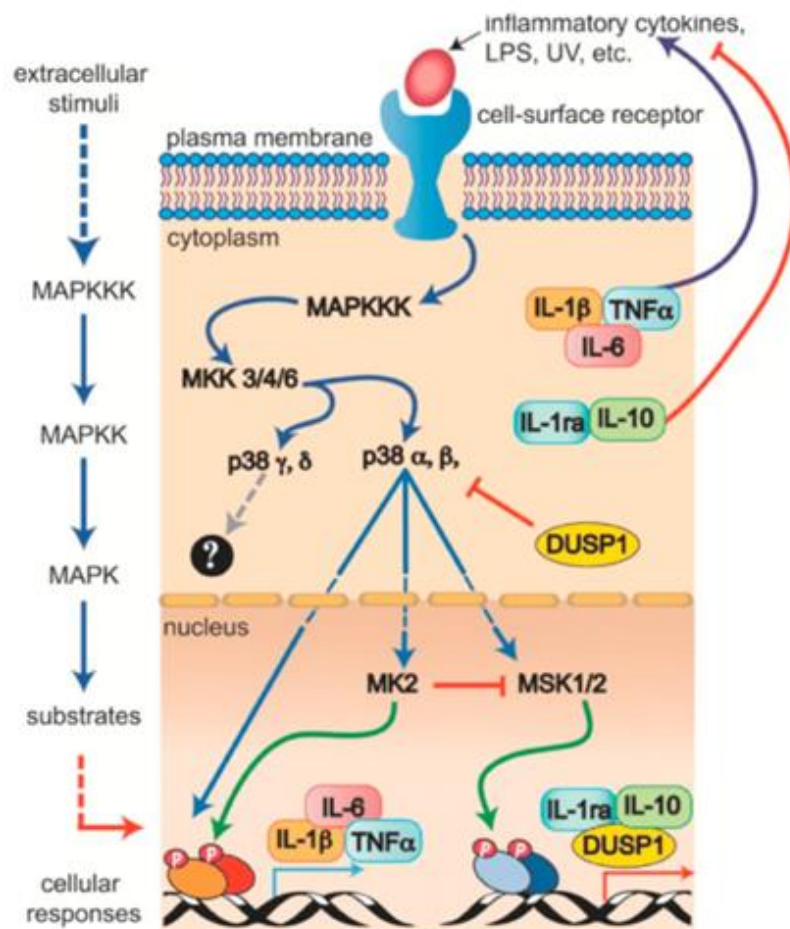


Figura 3. Rappresentazione schematica della produzione di citochine ad opera della cascata chinasi di p38 [8].

1.4.1 Artrite Reumatoide

Approfondendo la correlazione e gli studi in cui p38 risulta coinvolta, nell'Artrite Reumatoide (AR) si dimostra come sia stata riscontrata l'espressione di tutte le quattro isoforme di p38 [21], nonostante l'isoforma più presente risulti essere la p38 α . Recentemente l'interesse dei ricercatori è incentrato sul pathway TNF α /p38, che sembra essere un attivatore chiave nella patogenesi dell'AR, dal momento che questa citochina è responsabile della distruzione dell'osso e della cartilagine [22-24], e manifesta effetti inibenti a livello di differenziazione dei condrociti e del processo stesso di neocondrogenesi [25]. A tal proposito, è

interessante notare come fino a un terzo dei geni indotti dal $\text{TNF}\alpha$ dipendano dalla cascata di segnalazione di p38 [26] che risulta implicata nella produzione di citochine infiammatorie responsabili dell'insorgenza di AR: $\text{TNF}\alpha$ stesso, IL-8, IL-1 β e IL-6.

È stato inoltre recentemente dimostrato come il deficit di MKK3, una delle chinasi attivanti della cascata di segnalazione di p38, riduca la produzione di citochine a livello sinoviale e conseguentemente sopprima l'AR [8].

1.4.2 Morbo di Crohn

Anche nel morbo di Crohn, come nell'AR, le citochine infiammatorie sono causa della patogenesi, attraverso la cascata di segnalazione ad opera di p38, la cui attivazione è a sua volta potenziata dalle medesime citochine [4].

Nella mucosa del colon di pazienti affetti da Morbo di Crohn è stata infatti riscontrata un'aumentata attività chinasi attribuibile a p38 MAPK con un meccanismo di regolazione a feedback positivo ad opera delle citochine prodotte. Diversi studi sostengono inoltre come le p38 nel tratto gastrointestinale possano rivelarsi utili marker predittivi della risposta del paziente specialmente nell'ottica di prevedere complicanze a livello di ulcere intestinali, caratteristiche della malattia, che spesso richiedono interventi chirurgici [27].

1.4.3 Psoriasi, asma, BPCO

L'aumento dei livelli di p38 è stato evidenziato anche in biopsie di lesioni di tipo psoriasico: in particolare, la forma fosforilata di questa protein chinasi è stata riscontrata nel citoplasma e nel nucleo delle cellule epidermiche, in cui si è notato

un notevole aumento dell'attività chinasi attribuibile proprio alle isoforme p38 α , p38 β e p38 δ [28].

E' stato inoltre dimostrato come questa aumentata attività diminuisca in modo consistente al momento della risoluzione dello stato patologico [29], aspetto che induce a ipotizzare un ruolo di p38 nella patogenesi di questa malattia. Si ricorda, inoltre, come diverse citochine siano state identificate come causa del fenomeno infiammatorio: nella psoriasi è stato anche dimostrato come IL-8 ne risulti il principale promotore. Come riportato in precedenza, p38, si rivela implicata anche nella patologia dell'asma. Nello specifico, la produzione di citochine Th2 dipendenti, IL-4 e IL-13, comporta l'espressione della proteina "monocyte chemoattractant" (MCP)-1 nelle cellule epiteliali polmonari [30] e IL-9 nei mastociti [31]. Studi su topi knockout per MAPKAP2 ne hanno dimostrato il ruolo in quanto substrato a valle per la via metabolica di p38 nell'asma [32], suggerendo come questo possa essere un target utile per lo sviluppo di nuove terapie per la tale tipo di patologia.

È stato inoltre stabilito che la forma attiva fosforilata di p38 è altamente espressa negli alveoli polmonari dei fumatori e non fumatori affetti da BPCO a diversi stadi [33].

Un'alterata infiammazione si è inoltre rivelata una fondamentale causa patologica della pancreatite; si suppone che l'isoforma p38 α in cellule fagocitarie quali macrofagi sia responsabile della regolazione dell'autofagia e della risposta infiammatoria correlata all'insorgenza di tale malattia [8].

In aggiunta, diversi studi suggeriscono come l'inibizione di p38 α possa avere un ruolo nello sviluppo dell'aterosclerosi; inibitori selettivi in questo campo

sembrano infatti costituire una promettente strada terapeutica nel prevenire l'infiammazione associata all'aterosclerosi [34].

Dal momento che l'infiammazione contribuisce in qualche modo all'oncogenesi, l'inibizione della cascata chinasi di p38 α potrebbe ricoprire un ruolo chiave anche in tumori associati ad infiammazione [35].

Sfortunatamente la maggior parte degli inibitori specifici della p38 α è stata ritirata prima dell'effettiva immissione in commercio a causa di gravi effetti collaterali e problematiche concernenti la sicurezza [36]. Al momento sono avviati studi clinici per il potenziale trattamento dell'AR o della psoriasi; tuttavia, l'accesso alla fase III della sperimentazione sembra essere precluso a causa degli effetti collaterali dimostrati [37].

1.4.4 Malattie cardiovascolari

Con il termine “malattie cardiovascolari” ci si riferisce generalmente alle malattie che interessano il cuore ed i vasi sanguigni. Principalmente tra queste si ricordano: angina pectoris, cardiopatia ischemica con possibile conseguente infarto del miocardio, scompenso cardiocircolatorio, ictus cerebrale e malattia vascolare periferica. Secondo l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), le malattie cardiovascolari rappresentano ancora la principale causa di morte nel nostro paese, essendo responsabili del 44% di tutti i decessi. In particolare la cardiopatia ischemica è la prima causa di morte in Italia, mentre gli episodi cerebrovascolari sono al terzo posto con il 13%, dopo i tumori. Il 23,5% della spesa farmaceutica italiana (pari all'1,34 del prodotto interno lordo), è destinata infatti a farmaci per il sistema cardiovascolare [38].

In risposta a stimoli di stress, nel miocardio l'attivazione di p38 sembra essere implicata nello sviluppo delle patologie in oggetto e in processi contemporaneamente dannosi e protettivi [4].

Sebbene restino da risolvere diverse incongruenze, [39, 40] sono stati evidenziati alcuni aspetti chiave. Da una parte, un'aumentata attivazione della cascata di p38 promuove una disfunzione dei cardiomiociti, antagonizzandone la crescita e contribuendo allo sviluppo di lesioni durante l'ischemia miocardica. Conseguentemente, un'inibizione a questo livello produce un effetto cardioprotettivo [39]. Dall'altra parte, sempre l'attivazione di p38 α sembra verificarsi durante il rimodellamento del tessuto cardiaco danneggiato, ad esempio in seguito ad infarto del miocardio, fornendo quindi protezione ed effetti ricostitutivi del tessuto. Inoltre, se con l'attivazione di questa protein chinasi si riscontrano incongruenze nell'effetto prodotto, anche nell'inibizione si osserva un comportamento antitetico: l'inibizione dell'isoforma α sembra diminuire l'insorgenza di infarto del miocardio grazie agli effetti protettivi cardiaci sopra citati; allo stesso tempo, l'inibizione della via di segnalazione di p38 comporta un'ipertrofia incontrollata nei cardiomiociti.

Inoltre, è stato appurato che p38 risulta essenziale nel processo di maturazione delle placche aterosclerotiche, in quanto coinvolta nell'uptake di lipoproteine a bassa densità in forma ossidata, il cui assorbimento ad opera di macrofagi conduce alla deposizione lipidica a livello vasale formando la cosiddetta "placca aterosclerotica", responsabile di molte forme di malattie cardiovascolari [41].

Date le incongruenze evidenziate negli effetti positivi e negativi di p38, al momento gli studi si concentrano sulla comprensione dei meccanismi che coinvolgono

queste proteine e sulla possibilità di ottenere diverse eziologie di malattia considerando le differenti isoforme di p38 [39].

1.4.5 COVID-19

COVID-19, causato dal virus SARS-CoV-2, è anch'essa una patologia con aspetti infiammatori su cui gli attuali studi si stanno concentrando.

Come riportato in precedenza, la via di segnalazione di p38 ricopre un ruolo chiave nel rilascio di citochine pro-infiammatorie, ad esempio l'interleuchina IL-6, implicata nel danno polmonare acuto e nella disfunzione miocardica.

Alcuni studi si orientano alla comprensione della correlazione tra la tempesta infiammatoria nell'infezione da COVID-19 e la sovra-regolata attività di p38: ad ora sono stati proposte tre plausibili differenti spiegazioni [42]. In primo luogo, deve essere sempre ricordato il legame tra l'attivazione di p38 e la produzione di citochine pro-infiammatorie, principali responsabili del mantenimento e della modulazione del processo infiammatorio: tra queste risultano protagoniste TNF α , IL-1 β e la già citata IL-6. In secondo luogo, è stato riportato come il peptide angiotensina regoli l'attivazione di p38: l'angiotensina II, ormone pro-infiammatorio, pro-vasocostrittore e pro-trombotico, attiva la cascata di segnalazione di p38 [43], mentre l'angiotensina 1-7, prodotto dell'attività di ACE2 sull'angiotensina II, contrasta l'attività di p38 [44]. Come mostrato in Figura 4, durante l'ingresso di SARS-CoV-2, si assiste ad una perdita dell'attività dell'enzima di conversione dell'angiotensina II (ACE2) [45]; pertanto ne consegue uno squilibrio nella concentrazione dei diversi peptidi: la cospicua presenza di angiotensina II porta ad un'attivazione sregolata della via di p38 con effetti distruttivi nella cellula. Inoltre, è stato precedentemente dimostrato come il virus

SARS-CoV, in analogia ad altri virus respiratori a RNA, dirotti l'attività di p38 alla promozione della replica virale, e, data l'omologia tra SARS-CoV e SARS-CoV-2, si pensa che quest'ultimo possa impiegare un meccanismo simile [46-49].

Lo sviluppo di una strategia terapeutica atta ad inibire p38 potrebbe quindi attenuare la risposta infiammatoria tipica dell'infezione da COVID-19.

Al momento, alcuni inibitori di p38 sono oggetto di studi clinici su pazienti ospedalizzati con gravi infezioni infiammatorie causate da COVID-19: come esempio di inibitore si riporta il farmaco sperimentale Losmapimod, il cui dosaggio (15 mg in volontari anziani) sembra ripristinare la normale risposta immunitaria dovuta ad infiammazione acuta, presentando un buon profilo di sicurezza e tollerabilità [50]. In caso di successo, questa strategia, potrebbe avviare una serie di innovative applicazioni terapeutiche per gli inibitori di p38.

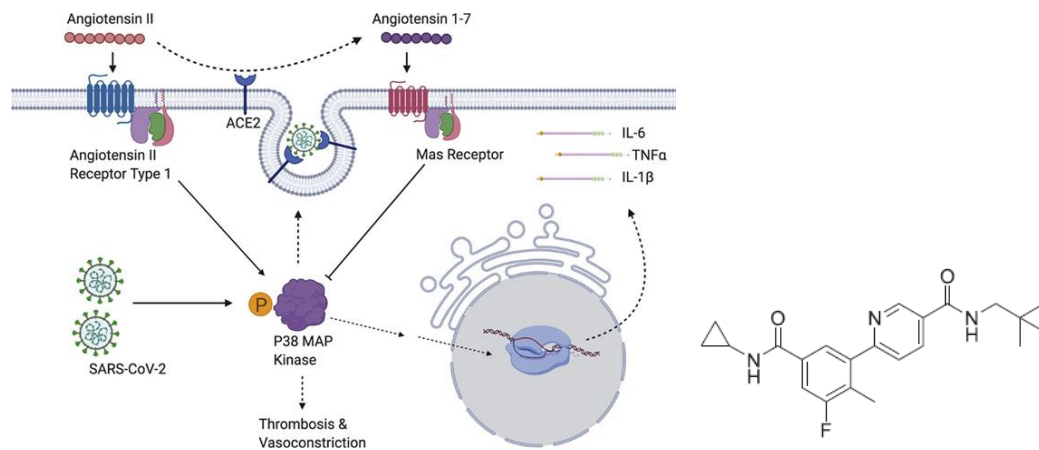


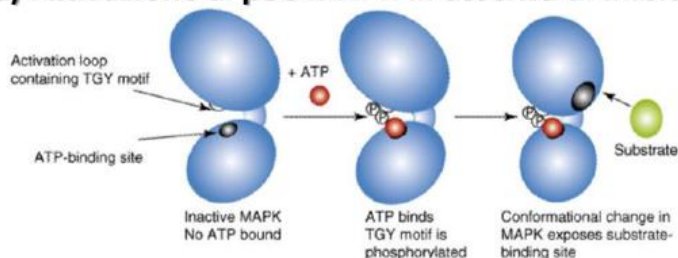
Figura 4. Struttura del meccanismo infiammatorio di SARS-CoV-2 e dell'inibitore Losmapimod [42].

1.5 Inibitori in studio

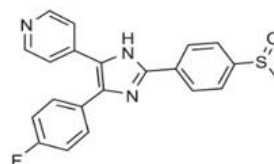
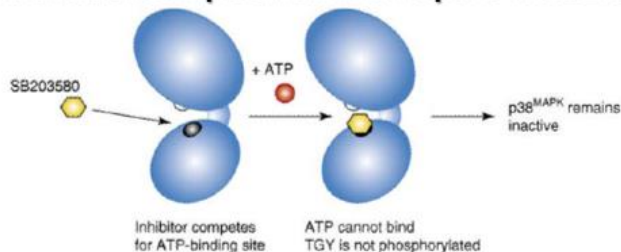
Da quanto in precedenza riportato, si evince come le p38 siano promettenti bersagli per diverse malattie come l'infiammazione [15], il cancro o il diabete [51].

Come già riportato sopra, nonostante la cospicua ricerca volta a progettare potenti inibitori di p38, nessun farmaco risulta ancora approvato per l'immissione in commercio a causa di problemi di tossicità [52].

(a) Attivazione di p38 MAPK in assenza di inibitore



(b) Attivazione di p38 MAPK ad opera di SB203580



(c) Attivazione di p38 MAPK ad opera di BIRB796

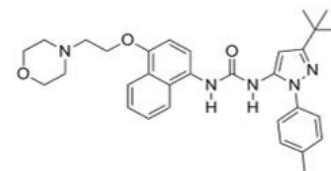
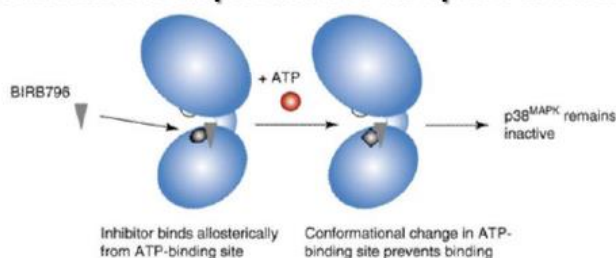


Figura 5. Attivazione e meccanismo di inibizione di p38 da parte di SB203580 e BIRB796:

- (a) attivazione di p38 attraverso fosforilazione del motivo TGY con l'ausilio di ATP e seguente cambiamento conformazionale che espone il sito di legame per il substrato;
- (b) inibizione classica ad opera di un piridinil-imidazolo (es. SB203580) che compete per il sito di legame dell'ATP;
- (c) inibizione mista (es. BIRB796) su siti distinti dell'enzima con cambiamento conformazionale nel sito di legame ATP e conseguente blocco [4].

La maggior parte di questi inibitori sono ATP-competitivi, ovvero sono stati progettati per adattarsi al sito di legame dell'ATP come il composto SB203580

(Figura 5); essi sono risultati altamente specifici per p38 e le sue diverse isoforme [53], dimostrandosi efficaci in ambito preclinico e manifestando buone proprietà farmacologiche. Altri inibitori, come il pirazolo BIRB796, sono invece inibitori allosterici (Figura 5).

Di estrema importanza sottolineare come questi si siano rivelati preziosi strumenti per comprendere i complessi e i differenti ruoli biologici e fisiopatologici dei membri della famiglia p38. Come già riportato, a livello clinico, tuttavia, diversi studi sono stati interrotti [37,54]: alcuni per assenza di efficacia, altri per il rapporto sfavorevole dose-tossicità dimostrata a livello neurologico, gastrointestinale e cardiovascolare [4]. Una possibile spiegazione delle difficoltà incontrate negli studi clinici può essere ricercata nell'elevata ridondanza funzionale attribuibile all'esistenza di differenti famiglie di proteine chinasi altamente imparentate [3] e nei meccanismi di regolazione e feedback a cui p38 partecipa [55].

Una precisazione riguarda la pubblicazione degli studi clinici e preclinici con tali inibitori: benché numerosi enti o aziende abbiano condotto sperimentazioni con tali inibitori, la percentuale di pubblicazione di questi studi risulta estremamente bassa. Ricercatori e studiosi asseriscono come anche risultati negativi dovrebbero essere presentati e pubblicati in modo da permettere un'evoluzione di quest'ambito di ricerca, con l'obiettivo di indirizzare l'attenzione sulla comprensione dei meccanismi di correlazione tra patologia e bersaglio biologico, avanzando sempre più nuove terapie potenzialmente promettenti [56].

Nell'ultimo decennio, è stata proposta una classificazione degli inibitori in studio secondo struttura chimica. Tra le categorie individuate si ricordano [8]:

- i derivati monociclici, suddivisi a loro volta in derivati pirazolici, imidazolici e bisammidici;

- le molecole con nucleo biciclico, tra le quali si annoverano naftil derivati, pirazolo-pirimidine, pirrolo-triazine, imidazo-pirazoli;
- i composti con scaffold tricyclico, in particolare i di-benzoannulenoni.

Uno dei più potenti e studiati inibitori risulta essere il già citato BIRB-796 (chiamato anche Doramapimod, naftil derivato, Figura 5c), che, poiché inibisce tutte le quattro isoforme, è considerato un pan-inibitore (valori IC_{50} di 38, 65, 200 e 520 nM rispettivamente per le isoforme α , β , γ , δ). Esso si è dimostrato in grado di inibire la produzione di $TNF\alpha$ in cellule stimulate da LPS ed è stato testato in diversi modelli in vivo per l'attività antinfiammatoria: ad esempio, in un modello murino di artrite indotta da collagene, alla dose di 30 mg/kg, BIRB-796 ha portato alla riduzione del 63% della patologia [57, 58]. Ad oggi, undici studi clinici su BIRB-796 sono stati portati a termine, [59] principalmente contro infiammazione e malattie autoimmuni come AR, psoriasi e Morbo di Crohn. Purtroppo, non è stata riportata alcuna efficacia clinica significativa; inoltre l'anello naftalenico sembra poter causare epatotossicità, aspetto per cui risultano avviati studi per lo sviluppo di derivati analoghi. Al momento quindi questo composto è utilizzato come tool farmacologico e non ha trovato applicazione clinica.

In Figura 6 sono riportate invece le disposizioni all'interno del sito catalitico di p38 MAPK di diversi inibitori recentemente riportati in letteratura con struttura rispettivamente pirazolica ($IC_{50} = 7$ nM), pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica ($IC_{50} = 109$ nM), di-benzoannulenonica (Skepinone - L) ($IC_{50} = 5$ nM).

In linea generale, dall'analisi dei dati di inibizione enzimatica, si può asserire come non esista un gruppo predominante in termini di potenza, mentre particolare importanza rivestono la presenza di diversi gruppi funzionali e l'orientamento dei composti in studio nel sito catalitico [8].

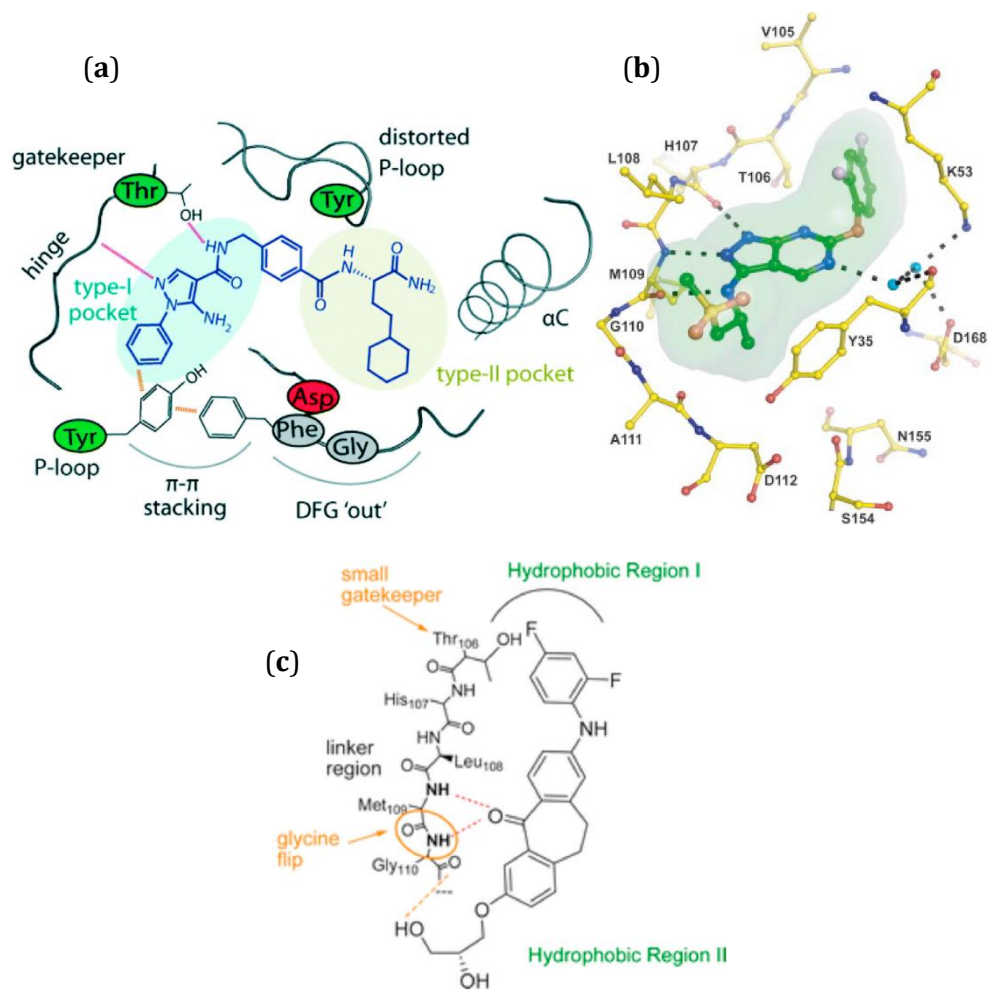


Figura 6. Disposizione nel sito catalitico di p38 di un inibitore a struttura:

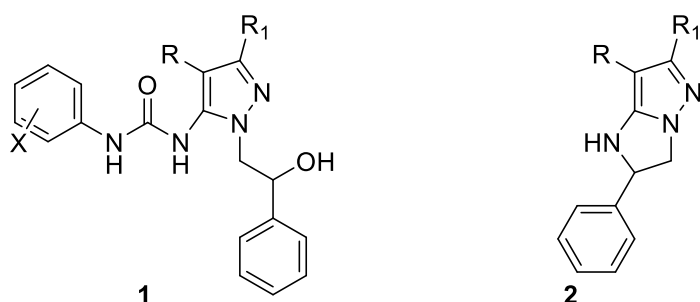
(a) pirazolica ($IC_{50} = 7 \text{ nM}$)

(b) pirazolo[3,4-*d*]pirimidinica ($IC_{50} = 109 \text{ nM}$)

(c) dibenzoannulenonica (Skepinone - L) ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$) [8].

2 Background della ricerca e progetto

In passato il gruppo di ricerca in cui ho svolto il presente progetto di tesi ha sintetizzato differenti composti a struttura pirazolica ed imidazo-pirazolica in grado di inibire la chemiotassi dei neutrofili interferendo a livello intracellulare con la fosforilazione di ERK 1/2, Akt e p38 [20, 60-63] e in grado di intervenire nel processo di angiogenesi, agendo sulla segnalazione a monte di MAPK e PI3K in cellule HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) stimulate da VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [64-66] (Figura 7, composti **1**, **2**).



R = H, COOEt, R₁ = H, COOEt, C(CH₃)₃

X = F, CF₃

1a: R = H, R₁ = COOEt, X = 4F

1b: R = H, R₁ = COOEt, X = 3CF₃

R = H, COOEt, CONH₂, CONR₂

R₁ = H, COOEt, C(CH₃)₃

Figura 7. Struttura dei composti **1** e **2** precedentemente sintetizzati.

I risultati di tali studi hanno evidenziato come alcune caratteristiche strutturali quali la tipologia, la posizione sul nucleo pirazolico o imidazo-pirazolico di un determinato sostituente e la perdita in flessibilità, riscontrata maggiormente nei derivati imidazo-pirazolici rispetto a quelli pirazolici, siano determinanti nell'aumento o diminuzione dei livelli di fosforilazione nei substrati precedentemente riportati e per la potenza degli inibitori.

Nello specifico, i composti con la più elevata attività nell'inibire la fosforilazione di p38 e ERK in cellule HUVEC stimulate da VEGF, si sono dimostrati essere i composti **1a** e **1b** (Figura 7), entrambi caratterizzati dalla presenza di un sostituito carbossietilico in posizione 3 o 6 rispettivamente sul nucleo pirazolico o imidazopirazolico, aspetto che ha suggerito come la posizione di tale gruppo sia di estrema importanza per l'attività biologica.

I composti **1a** e **1b** sono stati inoltre testati in qualità di inibitori dell'aggregazione piastrinica e della produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species) allo scopo di verificare se tali derivati potessero rappresentare una nuova strategia terapeutica per lo sviluppo di composti multi-target, in grado di bloccare i pathways delle MAPK e i due fenomeni descritti. I composti dimostrano tutti un'azione multipla, in particolare il composto **1b**, che mostra IC₅₀ sotto i 100 μM.

Sulla base di questi risultati e con l'obiettivo di stabilire il ruolo dei differenti sostituenti sui diversi pathways, è stata progettata, sintetizzata e valutata biologicamente un'ulteriore piccola libreria di composti (Figura 8, composti **3a-d**), oggetto di questo progetto di tesi, nella quale sono stati introdotti diversi gruppi ammidici, che, nei composti **2**, avevano mostrato una buona attività nell'inibire la chemiotassi dei neutrofili e l'angiogenesi [60-66].

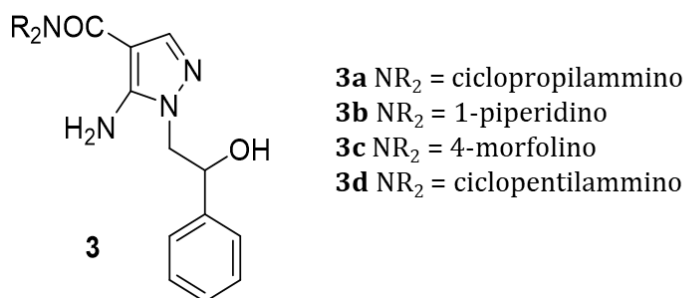


Figura 8. Nuovi composti progettati **3a-d**.

Questi composti, benché più corti e con gruppi ammidici ciclici, presentano comunque una somiglianza strutturale con i precedenti pirazoli pubblicati in letteratura recentemente riportati come buoni inibitori di p38 [63-64].

3 Discussione

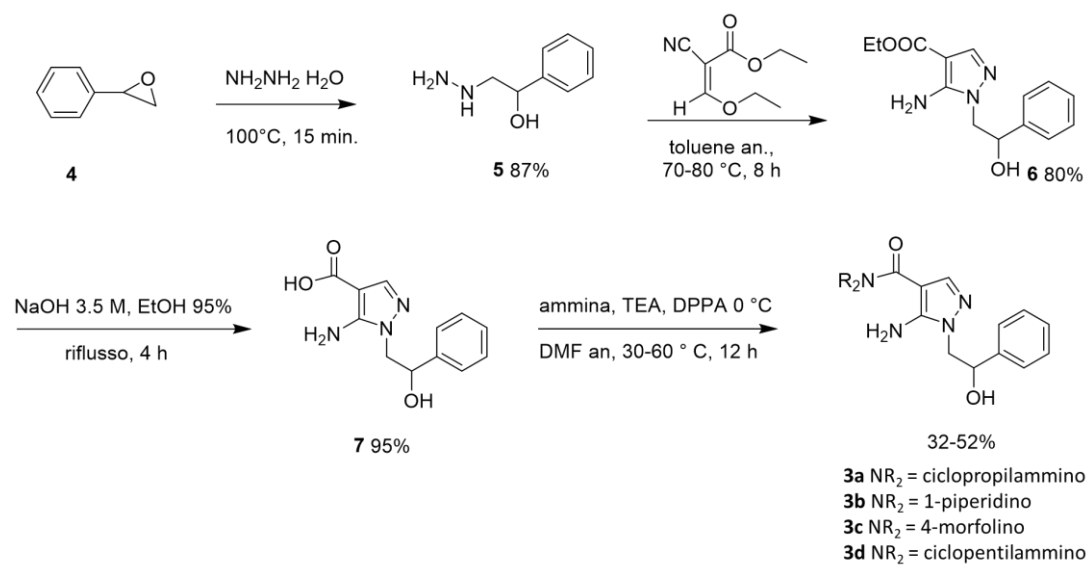
I composti **3a-d** sono stati preparati partendo dall'ossido di stirene. Trattando questo con idrazina monoidrata a 100 °C per 15 minuti, è stato ottenuto l'1-fenil-2-idrazinoetanolo che, reagendo con l'etossimetilencianoacetato di etile, fornisce il nucleo pirazolico.

In seguito, il gruppo carbossietilico del composto 5-ammino-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **6** è stato idrolizzato in una soluzione alcalina (NaOH 3.5 M) per ottenere il corrispondente derivato acido.

Infine sono stati preparati i composti in oggetto dalla reazione dell'acido 5-ammino-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilico **7** in

dimetilformammide anidra (DMF) con un eccesso dell'opportuna ammina in presenza di trietilammina anidra e difenilfosforil azide (DPPA). Per quest'ultimo reattivo, sono possibili numerose modalità di reazione, in relazione al tipo di co-reagente e alle condizioni di reazione [67]. In questo caso il riarrangiamento di Curtius non è stato osservato poiché l'accoppiamento dell'ammina in eccesso all'intermedio carbossi-difenilfosforazidato ha impedito la formazione della carbossi-azide.

Schema 1:



4 Parte sperimentale

Tutti i reagenti sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich s.r.l. (Milano).

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio BÜCHI M-560.

Gli spettri IR sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer 398, in KBr o CHCl_3 (per i solidi) o come film per gli oli.

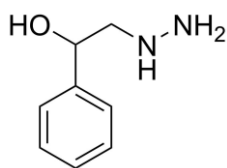
Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati registrati in CDCl_3 deuterato o DMSO deuterato con strumento Varian-Gemini 200 usando il tetrametilsilano (TMS) come standard interno; i valori di “chemical shifts” sono riportati in ppm e le J in Hz; i segnali sono stati caratterizzati come singoletti (s), doppietti (d), tripletti (t), come singoletti allargati (s all.) e multipletti (m).

Tutti i composti sono stati analizzati per C, H, N e S con un analizzatore elementare modello EA 110 della Fision-Instruments (Milano); i risultati analitici sono compresi nell'intervallo ± 0.4 rispetto ai valori teorici.

Per la purificazione dei prodotti mediante flash chromatography è stato utilizzato uno strumento Flash IsoleraOneBiotage, usando colonne SNAP ULTRA-HP SphereTM 25 μm .

Il procedere delle reazioni ed i prodotti isolati sono stati controllati mediante l'uso di TLC su Kieselgel 60 F254 (Merck) usando le opportune miscele eluenti.

Preparazione del 1-fenil-2-idrazinoetanolo 5.



Ad idrazina monoidrata (30 mL, 0,6 moli) scaldata a 100°C si aggiunge goccia a goccia ossido di stirene 4 (20 mL, 0,17 moli) mantenendo un leggero riflusso. Terminata l'aggiunta si agita ancora per 15 minuti a 100°C e si allontana sotto vuoto l'eccesso di idrazina.

Il residuo così ottenuto viene distillato con pompa ad olio. Si ottiene un liquido incolore che solidifica lentamente [68].

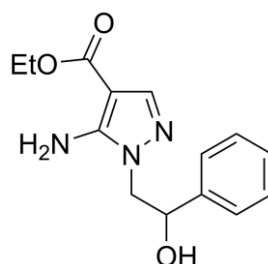
Formula molecolare: C₈H₁₂N₂O.

PM: 152,20.

Punto di ebollizione: 155°-158°C/0,6 mmHg.

Resa: 87%.

Preparazione del 5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1H-pirazolo-4-carbossilato di etile **6**.



Ad una soluzione di etossimetilencianoacetato di etile (3.38 g, 20 mmoli) in toluene anidro (20 mL) viene aggiunto l'1-fenil-2-idrazinoetano **5** (3.04 g, 20 mmoli). La soluzione così ottenuta viene scaldata a 70-80°C per 8 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente si svapora a circa metà volume e si lascia cristallizzare. Si ottiene un solido bianco che viene filtrato e ricristallizzato da toluene [60].

Formula molecolare: C₁₄H₁₇N₃O₃.

P.M.: 275.31.

Punto di fusione: 136°-137°C.

Resa: 80%.

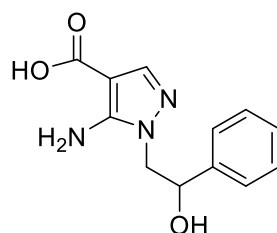
Analisi elementare per C₁₄H₁₇N₃O₃

	C%	H%	N%
Calcolato	61.08	6.22	15.26
Trovato	61.07	6.22	15.31

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.32 (t, J = 7.0, 3H, CH₃), 3.07 (s all., 1H, OH, scompare con D₂O), 4.00-4.25 (m, 4H, CH₂O + CH₂N), 4.8-5.13 (m, 1H, CHO), 5.30 (s all., 2H, NH₂, scompare con D₂O), 7.23-7.60 (m, 5H Ar), 7.78 (s, 1H, H₃).

IR (CHCl₃): 3425-3325 (NH₂), 3300-3000 (OH), 1687 (CO) cm⁻¹.

Preparazione dell'acido 5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilico 7.



Ad una soluzione di 5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1*H*-pirazolo-4-carbossilato di etile **6** (2.7 g, 10 mmol) in etanolo 96% (15 mL), viene aggiunta una soluzione 3.5 M di NaOH (10mL).

La miscela così ottenuta viene portata a riflusso per 4 ore, in seguito l'etanolo viene indotto all'evaporazione in condizioni di ridotta pressione. Si acidifica con HCl 6 N; il precipitato solido di colore bianco viene quindi raccolto per filtrazione e lavato con acqua. Il prodotto grezzo subisce in seguito una ricristallizzazione in etanolo assoluto, originando un composto dall'aspetto bianco solido.

Formula molecolare: C₁₂H₁₃N₃O₃.

P.M.: 247.26.

Punto di fusione: 180-182 °C (dec).

Resa: (2.34 g, 95%).

Analisi elementare per C₁₂H₁₃N₃O₃

	C%	H%	N%
Calcolato	58.29	5.30	16.99
Trovato	58.15	5.20	16.86

¹H NMR ((CD₃)₂SO): δ 3.92-4.25 (m, 2H, CH₂N), 4.91-5.03 (m, 1H, CHOH), 5.68-5.76 (m, 1H, OH, scompare con D₂O), 6.03-6.13 (s all., 2H, NH₂, scompare con D₂O), 7.23-

7.44 (m, 5H Ar), 7.45 (s, 1H, H-3), 11.50-12.00 (s all., 1H, COOH, scompare con D₂O).

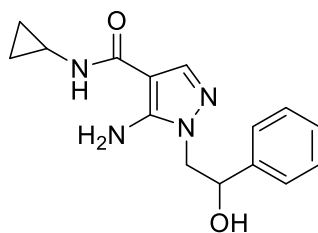
IR (KBr) cm⁻¹: 3385-3280 (NH₂), 3250-2800 (COOH + OH), 1650 (CO).

Preparazione generale delle ammidi 3a-d.

Ad una soluzione del composto **7** (10 mmol) in DMF anidra (10 mL), si aggiungono lentamente a 0 °C l'opportuna ammina (20 mmol), trietilammina (2 mL) e DPPA (3.4 g, 12 mmol).

La miscela viene così riscaldata a 30 – 60 °C per 12 h. Dopo raffreddamento, si addiziona acqua ghiacciata (200 mL) e la soluzione così ottenuta viene resa acida con l'aggiunta di HCl 1 M. I solidi grezzi ottenuti vengono in seguito filtrati, lavati con acqua e, se necessario, purificati attraverso cromatografia su gel di silice (utilizzando in qualità di eluente una miscela CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1). I solidi bianchi ottenuti sono infine ricristallizzati con etanolo assoluto.

5-ammino-N-ciclopropil-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1H-pirazolo-4-carbossammide 3a



Solido giallo chiaro.

Formula molecolare: C₁₅H₁₈N₄O₂.

P.M.: 286.34.

Punto di fusione: 171-172 °C.

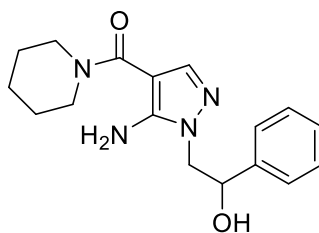
Resa: 52 %.

Analisi elementare per C₁₅H₁₈N₄O₂

	C%	H%	N%
Calcolato	62.92	6.34	19.57
Trovato	62.26	5.88	19.07

¹H-NMR (CDCl₃): δ 3.10-3.20 (m, 4H, 2CH₂ cicloprop.), 3.84-4.10 (m, 3H, CH₂N piraz. + CHNH), 4.81-4.97 (m, 1H, CHOH), 5.64-5.70 (m, 1H, OH, scompare con D₂O), 6.04 (s all., 2H, NH₂, scompare con D₂O), 7.18-7.42 (m, 6H, 5Ar + H-3), 11.70 (s all., 1H, NH, scompare con D₂O).

(5-ammino-1-(2-feniletil-2-idrossi)-1H-pirazol-4-il)(piperidin-1-il)metanone 3b



Solido rosa pallido.

Formula molecolare: C₁₇H₂₂N₄O₂.

P.M.: 314.39.

Punto di fusione: 166-167 °C.

Resa: 50 %.

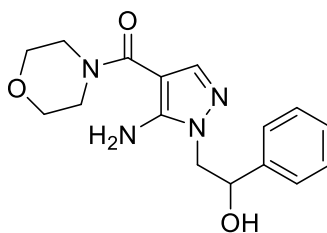
Analisi elementare per C₁₇H₂₂N₄O₂

	C%	H%	N%
Calcolato	64.95	7.05	17.82
Trovato	64.65	6.96	18.08

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.30-1.60 (m, 6H, 3CH₂ pip.), 3.20-3.30 and 3.40-3.60 (2m, 4H, 2CH₂N pip.), 3.80-4.06 (m, 2H, CH₂N piraz.), 4.82-4.96 (m, 1H, CHOH), 5.66 (s all., 1H, OH, scompare con D₂O), 5.90 (s all., 2H, NH₂, scompare con D₂O), 7.18-7.48 (m, 6H, 5Ar + H-3).

(5-ammino-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1H-pirazol-4-yl)(morfolino)metanone

3c



Solido bianco.

Formula molecolare: C₁₆H₂₀N₄O₃.

P.M.: 316.36.

Punto di fusione: 135-137 °C.

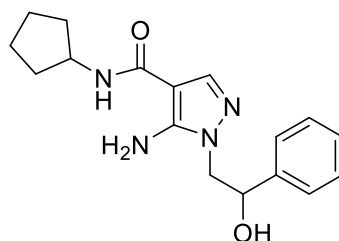
Resa: 37 %.

Analisi elementare per C₁₆H₂₀N₄O₃

	C%	H%	N%
Calcolato	60.75	6.37	17.71
Trovato	60.88	6.31	17.76

¹H-NMR (CDCl₃): δ 2.98-3.20 (m, 2H, CH₂N morf.), 3.30-3.41 (m, 2H, CH₂N morf.), 3.42-3.52 (m, 4H, 2CH₂O morf.), 3.83-4.17 (m, 2H, CH₂N piraz.), 4.81-5.00 (m, 1H, CHOH), 5.70 (s all., 1H, OH, scompare con D₂O), 6.00 (s all., 2H, NH₂, scompare con D₂O), 7.00-7.50 (m, 6H, 5Ar + H-3).

5-ammino-N-ciclopentil-1-(2-fenilettil-2-idrossi)-1H-pirazolo-4-carbossammide 3d



Solido avorio.

Formula molecolare: C₁₇H₂₂N₄O₂.

P.M.: 314.39.

Punto di fusione: 169-170 °C.

Resa: 32 %.

Analisi elementare per C₁₇H₂₂N₄O₂

	C%	H%	N%
Calcolato	64.95	7.05	17.82
Trovato	64.61	6.96	17.53

¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.70-0.81 (m, 4H, 2CH₂ ciclopent.), 1.82-2.09 (m, 4H, 2CH₂ ciclopent.), 4.00-4.22 (m, 3H, CH₂N piraz. + CHNH), 4.50-4.60 (m, 1H, CHOH), 5.00 (s all., 2H, NH₂, scompare con D₂O), 7.12–7.38 and 7.40-7.70 (2m, 6H, 5Ar + H-3), 8.08 (s all., 1H, NH scompare con D₂O).

5 Valutazione biologica

I composti sono stati testati allo scopo di valutare la loro capacità di inibire l'aggregazione piastrinica, la produzione di ROS e la fosforilazione di p38 su piastrine umane in quanto modello biologico veloce e con costi contenuti per lo screening di agenti antinfiammatori e antitumorali/antiaggreganti.

È da tempo dimostrato come le piastrine umane contengano ERK 1/2 e p38 i cui pathways vengono attivati in risposta ad agonisti quali la trombina. Sakurai et al. [69] e Borst et al. [70] hanno riportato in letteratura come, sia l'attivazione/aggregazione piastrinica, sia la formazione di trombi, siano modulati dalla via di segnalazione di p38. Diversi composti, tra i quali vengono annoverati principalmente prodotti naturali, sono stati recentemente segnalati in qualità di inibitori di p38 e dell'aggregazione piastrinica [71, 72]. Di conseguenza, la produzione di ROS e l'inibizione della fosforilazione di p38, essendo correlati entrambi all'aggregazione piastrinica umana, si è pensato potessero rappresentare un buon modello biologico per testare nuovi composti come potenziali farmaci antinfiammatori e antitumorali. Sono stati pertanto testati su piastrine umane i composti precedenti **1a** e **1b** per verificare la loro attività inibitoria sull'aggregazione piastrinica umana, sulla produzione di ROS e sulla fosforilazione di p38. I composti hanno mostrato attività multipla con valori di IC₅₀ inferiori a 100 μM verso i tre parametri testati. Questi nuovi risultati, insieme ai precedenti già ottenuti, confermano che tali derivati potrebbero rappresentare interessanti composti guida per la sintesi di nuovi composti multitarget, in grado di interferire con diversi meccanismi di segnalazione intracellulare coinvolti nell'infiammazione e nella progressione del cancro.

In tabella 1 sono riportati i valori di IC₅₀ dell'aggregazione piastrinica, della produzione di ROS e dell'inibizione della fosforilazione di p38 in piastrine umane stimulate da trombina.

Tabella 1. Valori di IC₅₀ ($\mu\text{M}\pm\text{SD}$) relativi all'inibizione dell'aggregazione piastrinica, della produzione di ROS e della fosforilazione di p38 in piastrine umane dei composti **3a-d**.

Composto	Aggregazione piastrinica (IC₅₀ $\mu\text{M}\pm\text{SD}$)	Produzione di ROS (IC₅₀ $\mu\text{M}\pm\text{SD}$)	Inib. Fosforilazione p38 (IC₅₀ $\mu\text{M}\pm\text{SD}$)
3a	83.89 \pm 3.36	74.86 \pm 6.18	95.73 \pm 4.31
3b	124.12 \pm 6.56	150.87 \pm 0.38	135.34 \pm 10.47
3c	99.07 \pm 1.60	71.53 \pm 8.65	105.20 \pm 8.45
3d	146.77 \pm 17.27	158.96 \pm 6.09	171.10 \pm 17.21

5.1 Raccolta del sangue e procedure di preparazione

Le piastrine sono state ottenute da sangue venoso, prelevato da volontari sani del “Centro Trasfusionale, Ospedale San Martino” di Genova: il sangue è stato raccolto in soluzione acquosa anticoagulante di citrato trisodico 130 mM (9:1), i donatori hanno dichiarato di non aver assunto farmaci in grado di interferire con la funzione piastrinica nelle due settimane precedenti il prelievo ed hanno fornito il loro consenso informato.

Nel dettaglio, le piastrine lavate sono state preparate centrifugando il sangue prelevato a 100xg per 20 minuti. Il plasma ricco di piastrine, così ottenuto dalla precedente procedura, è stato quindi centrifugato a 1100xg per 15 minuti. Il pellet è stato lavato una volta con una soluzione ACD a pH 5,2 (citrato trisodico 75 mM, acido citrico 42 mM e glucosio 136 mM), centrifugato a 1100xg per 15 minuti e quindi risospeso in tampone Hepes a pH 7,4 (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 10 mM glucosio, 10 mM HEPES).

5.2 Materiali

Gli standard a peso molecolare noto per elettroforesi Colorburst™, la 2',7'-diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA) e la trombina utilizzata sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich/Merck Millipore. L'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano anti-p-p38MAPK e l'anticorpo anti-β-actina sono stati acquistati dalla Santa Cruz Biotechnology, USA. Il sistema ECL® è stato ottenuto da GE Healthcare, USA; le membrane di nitrocellulosa (dimensione dei pori pari a 0.45 μm) da Bio-Rad Laboratories, USA.

5.3 Valutazione dell'inibizione dell'aggregazione piastrinica

L'aggregazione piastrinica è stata valutata mediante l'aggregometro BIOData mediante il metodo turbidimetrico di Born [73], quantificando la trasmittanza ottenuta dopo 6 minuti a 37°C.

Le piastrine lavate ($3.0 \times 10^8/\text{mL}$) sono state pre-incubate con soluzione salina o con i composti in esame per 3 minuti a 37°C e successivamente stimulate con trombina 0.1 U/mL.

5.4 Valutazione dell'inibizione della produzione di ROS

Dal momento che la formazione di ROS è considerata marker dello stato ossidativo cellulare, l'attività antiossidante dei composti oggetto del presente progetto di tesi, è stata valutata quantificando la loro capacità di inibire la formazione di ROS indotti da trombina. La produzione di questi è stata misurata mediante la formazione intracellulare di 2',7'-diclorofluoresceina (DCF). Le piastrine lavate ($1.0 \times 10^8/\text{mL}$) sono state pre-incubate con soluzione salina o con i composti in esame in presenza di DCFH-DA, che, diffondendo rapidamente attraverso la membrana dopo assorbimento cellulare e risultando substrato di alcune esterasi, è trasformato in 2',7'-diclorodidrossifluoresceina (DCFH) e intrappolato all'interno della cellula. DCFH è quindi ossidato dai ROS prodotti durante l'attivazione piastrinica a formare il composto altamente fluorescente DCF.

In breve, dopo la pre-incubazione di 15 minuti a 37°C, i campioni sono stati stimolati con trombina 0.1 U/mL a 37°C. L'incubazione è stata bloccata dopo 15 minuti ponendo i campioni in ghiaccio e, immediatamente dopo, i campioni sono stati saggiati al citofluorimetro Guava easyCyte di Merck Millipore Bioscience.

5.5 Valutazione dell'inibizione della fosforilazione di p38

Le piastrine lavate (1.0×10^9 /mL), pre-incubate con soluzione salina o con i composti in esame, sono state stimolate con 0.1 U/mL di trombina per 5 minuti. L'incubazione è stata bloccata con l'aggiunta di tampone riducente 2×Laemmli-SDS. I campioni, denaturati per 5 minuti a 100°C, sono stati separati con 5-10% SDS-PAGE e trasferiti su membrane di nitrocellulosa mediante Western Blotting. La corsa elettroforetica è stata effettuata in presenza di marker di peso molecolare Colorburst™. Il blot è stato bloccato in 5% BSA in TBST (Tris tampone salino, pH 7.6, contenente 10 mM Tris, 150 mM NaCl, e 0.1% Tween 20) a 37°C per 30 minuti, e incubato per la notte a 4°C in presenza di anticorpi anti-p-p38MAPK (diluizione 1:1000). In seguito, le membrane sono state accuratamente lavate e incubate per 60 minuti a temperatura ambiente in presenza di anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano. Dopo ulteriori accurati lavaggi, i blot sono stati sviluppati mediante il sistema ECL®. Le membrane di nitrocellulose sono state poi strippate con tampone 62.5 mM Tris/HCl (pH 6.7), 2% SDS, 100 μM β-mercaptoetanolo per 30 minuti a 50 °C e incubate nuovamente con anticorpo anti-β-actina per tutta la notte a 4 °C. L'intensità delle bande è stata direttamente quantificata utilizzando il pacchetto software di Bio-Rad Chemi-Doc.

5.6 Calcolo del valore IC₅₀

I valori di IC₅₀, ovvero la concentrazione molare del composto che fornisce un'inibizione pari al 50% della massima aggregazione indotta, sono stati calcolati mediante percentuale di inibizione della massima aggregazione riscontrata in presenza del composto oggetto di test rispetto a quella misurata in un campione di controllo contenente soluzione salina, effettuato nelle stesse condizioni.

6 Conclusioni

Dai dati biologici precedentemente riportati si evidenzia come tutti i nuovi composti **3a-d** siano in grado sia di bloccare l'aggregazione piastrinica e la produzione di ROS, sia di inibire la fosforilazione di p38 in piastrine umane, seppure con potenza diversa.

In particolare, il composto più interessante risulta **3a**, caratterizzato da un sostituente ammidico piccolo e ciclico (nel dettaglio un sostituente ciclopropilammidico). **3a** infatti presenta valori di IC₅₀ pari a 84, 74 e 95 µM nell'inibizione dell'aggregazione piastrinica, della produzione di ROS e della fosforilazione di p38.

La presenza sul gruppo ammidico di ammine secondarie cicliche, ma più ingombrate (come per il composto **3d**) porta ad un calo di attività (IC₅₀ = 99, 71 e 102 µM). **3d**, infatti, risulta il composto meno attivo della serie.

Al contrario la presenza in posizione 4 di ammidi terziarie (come per **3b** e **3c**), prive quindi di un NH eventualmente in grado di formare legami idrogeno, ha dato risultati discordanti; infatti, mentre il composto **3c** (morfolino derivato) mantiene ancora un'attività paragonabile a **3a**, il piperidino derivato **3b** risulta meno attivo.

Possiamo quindi concludere che lo scaffold pirazolico, opportunamente sostituito con gruppi ammidici in posizione 4, si conferma come interessante per la progettazione di nuovi composti ad attività duale, in grado cioè di bloccare differenti pathways intracellulari (ovvero quello collegato all'inibizione dei ROS e quello collegato all'inibizione della fosforilazione di p38) coinvolti sia nell'infiammazione sia nel cancro.

Ulteriori indagini farmacologiche saranno condotte allo scopo di verificare se

queste attività riscontrate nelle piastrine verranno mantenute anche a livello cellulare, in particolare in cellule HUVEC, allo scopo di identificare se questi nuovi composti possano avere anche un'azione anti-angiogenica come i precedenti derivati pirazolici già sintetizzati dal gruppo di ricerca.

7 Bibliografia

- [1] Cuadrado A., Nebreda A.R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.*, **2010**, *429*, 403-417.
- [2] Cargnello M., Roux P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, **2012**, *75*, 50-83.
- [3] Cuenda A., Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, *1773*, 1358-1375.
- [4] Coulthard L.R., White D.E., Jones D.L., McDermott M.F., Burchill S. A. p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutic. *Trends Mol. Med.*, **2009**, *15*, 369-379.
- [5] Laufer S.A., Hauser D. R., Domeyer D. M., Kinkel K., Liedtke A. J. Design, synthesis, and biological evaluation of novel Tri-and tetrasubstituted imidazoles as highly potent and specific ATPmimetic inhibitors of p38 MAP kinase: focus on optimized interactions with the enzyme's surface-exposed front region. *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 4122-4149.
- [6] Wang Z., Harkins P.C., Ulevitch R.J., Han J., Cobb M.H., Goldsmith E.J., The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 2327-2332.
- [7] Gangwal R.P., Bhadauriya A., Damre M.V., Dhoke G.V., Sangamwar A.T. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibitors: a review on pharmacophore mapping and QSAR studies. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2013**, *13*, 1015-1035.

- [8] Madkour M.M., Anbar H.S., El-Gamal M.I. Current status and future prospects of p38 α /MAPK14 kinase and its inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2021**, *213*, 113216.
- [9] Bradley J., Pober J. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs). *Oncogene*, **2001**, *20*, 6482–6491.
- [10] Chakravarty S., Dugar S., Scios Inc., Chapter 18. Inhibitors of p38 α MAP kinase. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, **2002**, *37*, 177-186.
- [11] Tobiume K., Matsuzawa A., Takahashi T., Nishitoh H., Morita K., Takeda K., Minowa O., Miyazono K., Noda T., Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.*, **2001**, *2*, 222-228.
- [12] Murphy L.O., Blenis J. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem. Sci.*, **2006**, *31*, 268-75.
- [13] Roulston A., Reinhard C., Amiri P., Williams L.T. Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 10232-10239.
- [14] Owens D.M., Keyse S.M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, **2007**, *26*, 3203-3213.
- [15] Zarubin T., Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*, **2005**, *15*, 11–18.
- [16] Kumar S., Boehm J., Lee J.C. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2003**, *2*, 717-726.

- [17] Bachstetter A.D., Van Eldik. The p38 map kinase family as regulators of proinflammatory cytokine production in degenerative diseases of the CNS. *Aging Dis.*, **2010**, *1*, 199-211.
- [18] Arbabi S., Rosengart M.R., Garcia I., Jelacic S., Maier R.V. Priming interleukin 8 production: role of platelet-activating factor and p38. *Arch. Surg.*, **1999**, *134*, 1348-1353.
- [19] Matsumoto K., Hashimoto S., Gon Y., Nakayama T., Horie T. Proinflammatory cytokine-induced and chemical mediator-induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **1998**, *101*, 825-831.
- [20] Selvatici R., Brullo C., Bruno O., Spisani S. Differential inhibition of signaling pathways by two new imidazo-pyrazoles molecules in fMLF-OMe- and IL8-stimulated human neutrophil. *Eur. J. Pharmacol.*, **2013**, *718*, 428-434.
- [21] Korb A., Tohidast-Akrad M., Cetin E., Axmann R., Smolen J., Schett G. Differential tissue expression and activation of p38 MAPK alpha, beta, gamma, and delta isoforms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **2006**, *54*, 2745-2756.
- [22] Zwerina J., Hayer S., Redlich K., Bobacz K., Kollias G., Smolen J.S., Schett G. Activation of p38 MAPK is a key step in tumor necrosis factor-mediated inflammatory bone destruction. *Arthritis Rheum.*, **2006**, *54*, 463-472.
- [23] Medicherla S., Ma J.Y., Mangadu R., Jiang Y., Zhao J.J., Almirez R., Kerr I., Stebbins E.G., O'Young G., Kapoun A.M., Luedtke G., Chakravarty S., Dugar S., Genant H.K., Protter A.A. A selective p38 alpha mitogen-activated protein kinase inhibitor reverses cartilage and bone destruction in mice with collagen-induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, *318*, 132-141.

- [24] Diarra D., Stolina M., Polzer K., Zwerina J., Ominsky M.S., Dwyer D., Korb A., Smolen J., Hoffmann M., Scheinecker C., van der Heide D., Landewe R., Lacey D., Richards W.G., Schett G. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.*, **2007**, *13*, 156-163.
- [25] Okuma-Yoshioka C., Seto H., Kadono Y., Hikita A., Oshima Y., Kurosawa H., Nakamura K., Tanaka S. Tumor necrosis factor- α inhibits chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts through p38 mitogen activating protein kinase pathways. *Mod. Rheumatol.*, **2008**, *18*, 366-378.
- [26] Zer C., Sachs G., Shin J.M. Identification of genomic targets downstream of p38 mitogen-activated protein kinase pathway mediating tumor necrosis factor- α signaling. *Physiol. Genomics*, **2007**, *31*, 343-351.
- [27] Bantel H., Schmitz M.L., Raible A., Gregor, M., Schulze-Osthoff, K. Critical role of nuclear factor- κ B and stress-activated protein kinases in steroid unresponsiveness. *FASEB J.*, **2002**, *16*, 1-19.
- [28] Yu X.J., Li C.Y., Dai H.Y., Cai D.X., Wang K.Y., Xu Y.H., Chen L.M., Zhou C.L. Expression and localization of the activated mitogen-activated protein kinase in lesional psoriatic skin. *Exp. Mol. Pathol.*, **2007**, *83*, 413-418.
- [29] Johansen C., Kragballe K., Westergaard M., Henningsen J., Kristiansen K., Iversen L. The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.*, **2005**, *152*, 37-42.
- [30] Ip WK, Wong CK, Lam CW. Interleukin (IL)-4 and IL-13 up-regulate monocyte chemoattractant protein-1 expression in human bronchial epithelial cells: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Janus kinase-2 but not c-Jun NH2-terminal kinase 1/2 signalling pathways. *Clin. Exp. Immunol.*, **2006**, *145*, 162-172.

- [31] Stassen M., Klein M., Becker M., Bopp T., Neudörfl C., Richter C., Heib V., Klein-Hessling S., Serfling E., Schild H., Schmitt E. p38 MAP kinase drives the expression of mast cell-derived IL-9 via activation of the transcription factor GATA-1. *Mol. Immunol.*, **2007**, *44*, 926-933.
- [32] Gorska M.M., Liang Q., Stafford S.J., Goplen N., Dharajiya N, Guo L., Sur S., Gaestel M., Alam R. MK2 controls the level of negative feedback in the NF-kappaB pathway and is essential for vascular permeability and airway inflammation. *J. Exp. Med.*, **2007**, *204*, 1637-1652.
- [33] Renda T., Baraldo S., Pelaia G., Bazzan E., Turato G., Papi A., Maestrelli P., Maselli R., Vatrella A., Fabbri L.M., Zuin R., Marsico S.A., Saetta M. Increased activation of p38 MAPK in COPD. *Eur. Respir. J.*, **2008**, *31*, 62-69.
- [34] Cheng F., Twardowski L., Fehr S., Aner C., Schaeffeler E., Joos T., Knorpp T., Dorweiler B., Laufer S., Schwab M., Torzewski M. Selective p38 α MAP kinase/MAPK14 inhibition in enzymatically modified LDL-stimulated human monocytes: implications for atherosclerosis. *FASEB J.*, **2017**, *31*, 674-686.
- [35] Gupta J., Nebreda A.R. Roles of p38 α mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. *FEBS J.*, **2015**, *282*, 1841-1857.
- [36] Zheng T., Zhang B., Chen C., Ma J., Meng D., Huang J., Hu R., Liu X., Otsu K., Liu A.C., Li H., Yin Z., Huang G. Protein kinase p38 α signaling in dendritic cells regulates colon inflammation and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2018**, *115*, 12313-12322.
- [37] Cohen P. Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **2009**, *21*(2), 317-324.

- [38] <https://www.epicentro.iss.it/cardiovascolare> (ultimo accesso: “Aprile 2021”)
- [39] Bassi R., Heads R., Marber M.S., Clark J.E. Targeting p38-MAPK in the ischaemic heart: kill or cure? *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2008**, *8*, 141-146.
- [40] Muslin A.J. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin. Sci. (Lond)*, **2008**, *115*, 203-218.
- [41] Rahaman S.O., Lennon D.J., Febbraio M., Podrez E.A., Hazen S.L., Silverstein R.L. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab.*, **2006**, *4*, 211-221.
- [42] Grimes J.M., Grimes K.V. p38 MAPK inhibition: A promising therapeutic approach for COVID-19. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **2020**, *144*, 63-65.
- [43] Park J.K., Fischer R., Dechend R., Shagdarsuren E., Gapeljuk A., Wellner M., Meiners S., Gratze P., Al-Saadi N., Feldt S., Fiebeler A., Madwed J.B., Schirdewan A., Haller H., Luft F.C., Muller D.N. p38 Mitogen-activated protein kinase inhibition ameliorates angiotensin II-Induced Target Organ Damage. *Hypertens. Am.Heart Assoc.*, **2007**, *9*, 481-489.
- [44] Yu X., Cui L., Hou F., Liu X., Wang Y., Wen Y., Chi C., Li C., Liu R., Yin C. Angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7)-Mas axis prevents pancreatic acinar cell inflammatory response via inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase/nuclear factor- κ B pathway. *Int. J. Mol. Med.*, **2018**, *41*, 409-420.
- [45] Gheblawi M., Wang K., Viveiros A., Nguyen Q., Zhong J.C., Turner A.J., Raizada M.K., Grant M.B., Oudit G.Y. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res.*, **2020**, *126*, 1456-1474.

- [46] Kopecky-Bromberg S.A., Martinez-Sobrido L., Palese P. 7a protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus inhibits cellular protein synthesis and activates p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Virol.*, **2006**, *80*, 785-793.
- [47] Börgeling Y., Schmolke M., Viemann D., Nordhoff C., Roth J., Ludwig S. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase impairs influenza virus-induced primary and secondary host gene responses and protects mice from lethal H5N1 infection. *J. Biol. Chem.*, **2014**, *289*, 13-27.
- [48] Jimenez-Guardeño J.M., Nieto-Torres J.L., DeDiego M.L., Regla-Nava J.A., Fernandez-Delgado R., Castaño-Rodríguez C., Enjuanes L. The PDZ-binding motif of severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein is a determinant of viral pathogenesis. *PLoS Pathogens*, **2014**, *10*, 1004320.
- [49] Ma Q., Pan W., Li R., Liu B., Li C., Xie Y., Wang Z., Zhao J., Jiang H., Huang J., Shi Y., Dai J., Zheng K., Li X., Yang Z. Liu Shen capsule shows antiviral and anti-inflammatory abilities against novel coronavirus SARS-CoV-2 via suppression of NF- κ B signaling pathway. *Pharmacol. Res.*, **2020**, *158*, 104850.
- [50] Barbour A.M., Sarov-Blat L., Cai G., Fossler M.J., Sprecher D.L., Graggaber J., McGeoch A.T., Maison J., Cheriyan J. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of losmapimod following a single intravenous or oral dose in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2013**, *76*, 99-106.
- [51] Wang S., Ding L., Ji H., Xu Z., Liu Q., Zheng Y. The Role of p38 MAPK in the Development of Diabetic Cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, *17*, 1037.
- [52] Astolfi A., Iraci N., Sabatini S., Barreca M.L., Cecchetti V. p38 α MAPK and Type I Inhibitors: Binding Site Analysis and Use of Target Ensembles in Virtual Screening. *Molecules*, **2015**, *20*, 15842-15861.

- [53] Bain J., Plater L., Elliott M., Shpiro N., Hastie C.J., McLauchlan H., Klevernic I., Arthur J.S., Alessi D.R., Cohen P. The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.*, **2007**, *408*, 297-315.
- [54] Schindler J.F., Monahan J.B., Smith W.G. p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *J. Dent. Res.*, **2007**, *86*, 800-811.
- [55] Krishna M., Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, *65*, 3525-3544.
- [56] Genovese M.C. Inhibition of p38: has the fat lady sung? *Arthritis Rheum.*, **2009**, *60*, 317-320.
- [57] Pargellis C., Tong L., Churchill L., Cirillo P.F., Gilmore T., Graham A.G., Grob P.M., Hickey E.R., Moss N., Pav S., Regan J. Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat. Struct. Biol.*, **2002**, *9*, 268-272.
- [58] Regan J., Breitfelder S., Cirillo P., Gilmore T., Graham A.G., Hickey E., Klaus B., Madwed J., Moriak M., Moss N., Pargellis C., Pav S., Proto A., Swinamer A., Tong L., Torcellini C. Pyrazole urea-based inhibitors of p38 MAP kinase: from lead compound to clinical candidate. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2994-3008.
- [59] <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=birb+796&term=&cntry=&state=&city=&dist> (ultimo accesso: "Maggio 2021")
- [60] Bruno O., Brullo C., Bondavalli F., Schenone S., Ranise A., Arduino N., Bertolotto M.B., Montecucco F., Ottonello L., Dallegri F., Tognolini M., Ballabeni V., Bertoni S., Barocelli E. Synthesis and biological evaluation of N-pyrazolyl-N'-alkyl/benzyl/phenylureas: a new class of potent inhibitors of interleukin 8-induced neutrophil chemotaxis. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 3618-3626.

- [61] Bruno O., Brullo C., Bondavalli F., Ranise A., Schenone S., Falzarano M.S., Varani K., Spisani S. 2-Phenyl-2,3-dihydro-1*H*-imidazo[1,2-*b*]pyrazole derivatives: new potent inhibitors of fMLP-OMe-induced neutrophil chemotaxis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 3696-3701.
- [62] Bruno O., Brullo C., Bondavalli F., Schenone S., Spisani S., Falzarano M.S., Varani K., Barocelli E., Ballabeni V., Giorgio C., Tognolini M. 1-Methyl and 1-(2-hydroxyalkyl)-5-(3-alkyl/cycloalkyl/phenyl/naphthylureido)-1*H*-pyrazole-4-carboxylic acid ethyl esters as potent human neutrophil chemotaxis inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 3379-3387;
- [63] Brullo C., Spisani S., Selvatici, R., Bruno O. N-Aryl-2-phenyl-2,3-dihydroimidazo[1,2-*b*]pyrazole-1-carboxamides 7-substituted strongly inhibiting both fMLP-OMe- and IL-8-induced human neutrophil chemotaxis. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *47*, 573-579.
- [64] Meta E., Brullo C., Sidibe A., Imhof B.A., Bruno O. Design, synthesis and biological evaluation of new pyrazolyl-ureas and imidazopyrazolecarboxamides able to interfere with MAPK and PI3K upstream signalling involved in the angiogenesis. *Eur. J. Med. Chem.*, **2017**, *133*, 24-35;
- [65] Meta E., Imhof B.A., Roprazb P., Fish R.J., Brullo C., Bruno O., Sidibé A. The pyrazolyl-urea GeGe3 inhibits tumor angiogenesis and reveals dystrophin myotonic protein kinase (DMPK)1 as a novel angiogenesis target. *Oncotarget*, **2017**, *8*, 108195-108212.
- [66] Marengo B., Meta E., Brullo C., De Ciucis C., Colla R., Speciale A., Garbarino O., Bruno O., Domenicotti C. Biological evaluation of pyrazolyl-urea and dihydro-

imidazo-pyrazolyl-urea derivatives as potential anti-angiogenetic agents in the treatment of neuroblastoma. *Oncotarget*, **2020**, *11*, 3459-3472.

- [67] Shioiri T., Ninomiya K., Yamada S. Diphenylphosphoryl azide. A new convenient reagent for a modified Curtius reaction and for the peptide synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 6203-6205.
- [68] Schenone S., Bruno O., Fossa P., Ranise A., Menozzi G., Mosti L., Bondavalli F., Martini C., Trincavelli L. Synthesis and biological data of 4-amino-1-(2-chloro-2-phenylethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylic acid ethyl esters, a new series of A1-adenosine receptor (A1AR) ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 2529-2531.
- [69] Sakurai K., Matsuo Y., Sudo T., Takuwa Y., Kimura S., Kasuya Y. Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Thrombus Formation. *J. Recept. Sig. Transd.*, **2004**, *24*, 283-296.
- [70] Borst O., Walker B., Muenzer P., Russo A., Schmid E., Faggio C., Bigalke B., Laufer S., Gawaz M., Lang F. Skepinone-705 L. A Novel Potent and Highly Selective Inhibitor of p38 MAP Kinase, Effectively Impairs Platelet Activation and Thrombus Formation. *Cell. Physiol. Biochem.*, **2013**, *31*, 914-924.
- [71] Kuliopulos A., Mohanlal R., Covic L. Effect of selective inhibition of the p38 MAP kinase pathway on platelet aggregation. *Thromb. Haemost.*, **2004**, *92*, 1387-1393.
- [72] Song F., Zuo X., Zhao Y., Li Q., Tian Z., Yang Y. Betanin-enriched red beet extract attenuated platelet activation and aggregation by suppressing Akt and P38 Mitogen-activated protein kinases phosphorylation. *J. Funct. Foods*, **2019**, *61*, 103491.

[73] Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, **1962**, 194, 927–929.

8 Acronimi e Abbreviazioni

Acronimo	Descrizione
ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
AKT	Protein kinase B
ATF1	Activating Transcription Factor 1
BPCO	BroncoPneumopatia Cronico Ostruttiva
COVID-19	COrona Vlrus Disease-19
COX-2	Ciclossigenasi-2
DCF	Dichlorofluorescein
DCFH	Dichloro-dihydro-fluorescein
DCFH-DA	Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate
DMF	Dimethylformamide
DPPA	Diphenylphosphorylazide
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinases
HSP-70	Heat Shock Protein 70
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IL	Interleukine
JNK	c-Jun N-terminal Kinases
LPS	Lipopolisaccaride
MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MICI	Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali
NLK	Nemo-Like Kinases
p38 MAPK	p38 Mitogen-Activated Protein Kinases
PAF	Platelet Activating Factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PIC	ProInflammatory Cytokine
PK	Protein Kinases
PP2C	Protein Phosphatase 2C
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
ROS	Reactive Oxygen Species
SAPK	Stress-Activated Protein Kinases
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome-CoronaVirus-2
TNF α	Tumor Necrosis Factor
TRAF	TNF- Receptor Associated Factors
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor