



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació



Treball Final de Grau

Grau de Farmàcia

LA IMPORTÀNCIA FARMACOLÒGICA DELS RECEPTORS IMIDAZOLÍNICS I DELS SEUS L·LIGANDS

JOEL MUIXI FELIU

Àmbit principal: Química farmacèutica

Àmbits secundaris: Farmacologia terapèutica i Bioquímica i biologia molecular

Universitat de Barcelona

Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica

Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació

Barcelona, Juny 2025





Aquesta obra està subjecta a una llicència [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

Abreviatures

α_2 AR: Receptors α_2 -adrenèrgics

ACN: Acetonitril

AgOAc: Acetat de plata

AKT o PKB: *Protein kinase B*

BAX: *Bcl-2-associated X*

B-CK: *Brain creatine kinase*

CDK5: *Cyclin-dependent kinase 5*

CREB: *cAMP response element-binding*

K_{ATP}: Canals de potassi ATP-dependents

FXR: *Farnesoid X receptor*

GSK₃ β : *Glycogen synthase kinase 3 beta*

I₁-IR: Receptors imidazolíncics I₁

I₂-IR: Receptors imidazolíncics I₂

I₃-IR: Receptors imidazolíncics I₃

IR: Receptors imidazolíncics

IRAS: *Imidazoline Receptor Antisera-Selected*

MA: Malaltia d'Alzheimer

MAO: Monoaminoxidasa

Nrf2: *Nuclear erythroid 2-related factor 2*

RMN: Ressonància Magnètica Nuclear

RVLN: Medul·la Rostral Ventrolateral

SAMP8: *Senescence-Accelerated Mouse Prone 8*

sAPP: *Soluble Amyloid precursor protein*

Resum: La importància farmacològica dels receptors imidazolítics i dels seus lligands

En el context actual, on es requereix fomentar la investigació de noves dianes terapèutiques, es presenten els receptors imidazolítics (IR).

Objectius: Realitzar una cerca bibliogràfica sobre els IR per determinar la seva importància en farmacologia i del desenvolupament de lligands selectius d'aquests receptors.

Metodologia: Per a l'obtenció de la bibliografia s'ha emprat la base de dades SciFinder i, durant la part experimental, s'han utilitzat tècniques de laboratori per a la síntesi i la caracterització dels compostos.

Resultats i discussió: Els IR són una família heterogènia formada per tres subtipus de receptors, que es troben implicats en diferents patologies: els receptors imidazolítics I_1 (I_1 -IR) es relacionen amb el control de la tensió arterial; els I_2 -IR amb alteracions neurològiques i control del dolor; i finalment, els I_3 -IR en la secreció d'insulina i el control de la glucèmia. El seu estudi es basa en l'observació dels efectes fisiològics que provoca la seva activació mitjançant l'ús de lligands. Tant els I_1 -IR com els I_2 -IR són els grups més estudiats i disposen d'un nombre major de lligands sintetitzats, en canvi, els I_3 -IR el nombre de lligands és bastant més baix. En la part experimental del treball, s'ha dut a terme la síntesi de deu derivats d'una nova família d' α -iminofosfonats bicíclics.

Conclusió: La cerca realitzada ha permès justificar el gran potencial dels IR i s'ha demostrat la importància del desenvolupament de lligands selectius en el seu estudi. Finalment, gràcies al treball experimental, s'ha establert un protocol sintètic de composts doble α -iminofosfonats bicíclics.

Paraules clau: Receptors imidazolítics, receptors α_2 -adrenèrgics, lligands selectius, α -iminofosfonats bicíclics, doble cicloadició [3+2].

Abstract: The pharmacological importance of imidazoline receptors and their ligands

In the current context, where the investigation of new drug targets needs to be promoted, Imidazoline Receptors (IR) emerge as promising candidates.

Objectives: To conduct a bibliography review on IR, establish their relevance in pharmacology and explore the development of selective ligands for these receptors.

Methodology: The SciFinder database was used to collect bibliographic information about the receptors and their ligands. In the experimental section, various laboratory techniques were employed to synthesize and characterize new compounds.

Results and discussion: IR are a heterogeneous family categorized into three subtypes, each involved in different pathologies: Imidazoline receptor I_1 (I_1 -IR) are associated with arterial blood pressure regulation; I_2 -IR play a role in neurological disorders and pain management, and I_3 -IR are linked to insulin secretion and glucose level regulation. Their study relies on observing the physiological effects triggered by selective ligands activation. I_1 -IR and I_2 -IR are the most extensively studied, with a great number of ligands synthesized, while fewer ligands have been developed for I_3 -IR. In experimental phase, ten bicyclic α -iminophosphonates derivatives were synthesized.

Conclusion: The work highlights the significant potential of IR, and it demonstrates the importance of developing selective ligands for their study. Additionally, the experimental work established a synthetic protocol for novel double α -iminophosphonates compounds.

Key words: Imidazoline receptors, α_2 -adrenergic receptors, selective ligands, α -iminophosphonates, double [3+2] cycloaddition.

Integració en els diferents àmbits docents

Aquest treball dut a terme en el Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Terapèutica disposa com a àmbit docent principal la **química farmacèutica**, ja que l'objectiu d'aquest és la contribució al procés de desenvolupament de nous fàrmacs, en concret, en la investigació de noves dianes terapèutiques i en el disseny i síntesi de molècules que permetin la seva modulació amb la màxima eficàcia. Aquest procés també inclou la comprensió dels mecanismes de reacció per desenvolupar nous protocols sintètics amb el màxim rendiment.

Tanmateix, l'àmbit de la **farmacologia i terapèutica** també desenvolupa un rol important en el treball, sobretot en definir la implicació de les dianes en les diferents patologies i en l'estudi, mitjançant l'experimentació en diferents models cel·lulars i animals, dels efectes fisiològics que produeix la seva activació. A més a més, recau sobre aquest àmbit l'estudi dels compostos amb capacitat d'unir-se a la diana, per definir les seves propietats farmacològiques.

Finalment, l'àmbit de la **bioquímica i la biologia molecular** permeten la comprensió de les vies de senyalització cel·lulars i la interpretació de les desregulacions que es produeixen en els processos patològics. D'aquesta manera, poder connectar la correcció d'aquesta desregulació, mitjançant la modulació de la diana, amb l'efecte fisiològic que es produeix.

Contribució del treball a l'assoliment dels Objectius de Desenvolupament Sostenible

Aquest treball pretén contribuir a l'assoliment dels objectius “*Good Health and Well-Being*” ODS 3 i “*Industry, Innovation and Infrastructure*” ODS 9.

Les Nacions Unides plantegen, mitjançant l'aplicació de l'ODS 3 i sota la premissa de no deixar ningú enrere (*No one left behind*), que tots els individus puguin gaudir d'un bon estat de salut i benestar. No obstant això, la situació actual de la indústria farmacèutica es caracteritza per un escàs èxit en el procés d'aprovació de nous fàrmacs, fet que incrementa els costos de desenvolupament i dificulta l'assoliment d'una cobertura de salut mundial. Aquest treball pretén contribuir en la investigació de noves dianes que permetin l'obtenció d'eines terapèutiques amb la màxima qualitat, eficàcia, seguretat i accessibilitat per a tothom.

Pel que fa a “*Industry, innovation and Infrastructure*” ODS 9, un dels principals problemes que afronta el planeta són les elevades emissions de diòxid de carboni, estretament relacionades amb el sector industrial. Per fer front a aquesta problemàtica és essencial fomentar tecnologies sostenibles que permetin l'ús eficient dels recursos, per tal d'obtenir el màxim rendiment amb el menor cost ambiental. Seguint els principis de la química verda, les reaccions sintètiques d'aquest treball s'han realitzat en un reactor microones, el qual permet obtenir alts rendiments amb un menor temps i una baixa generació de residus. Així mateix, els pocs generats són correctament eliminats mitjançant el pla de gestió de residus de la Universitat de Barcelona.

Índex

1-	Introducció.....	1
1.1	- Història dels receptors imidazolínic (IR).....	1
2-	Objectius.....	3
3-	Metodologia	4
4-	Resultats i discussió	4
4.1	- 1a Part: Receptors imidazolínic (IR)	4
4.1.1	- Receptors imidazolínic I ₁ -IR.....	5
4.1.2	- Receptors imidazolínic I ₂ -IR.....	10
4.1.3	- Receptors imidazolínic I ₃ -IR.....	16
4.2	- 2a Part: Lligands dels IR	18
4.2.1	- Lligands dels I ₁ -IR	18
4.2.2	- Lligands dels I ₂ -IR	20
4.2.3	- Lligands dels I ₃ -IR	23
4.3	- 3a Part: Síntesi de nous lligands dels I ₂ -IR.....	24
4.3.1	- α-Iminofosfonats bicíclics	24
4.3.2	- Síntesi dels reactius	25
4.3.3	- Síntesi de bis α-iminofosfonats bicíclics	26
5-	Conclusions.....	28
6-	Bibliografia.....	29
	Annexos	36

1- Introducció

El percentatge de fàrmacs que superen les fases clíniques i aconseguixen l'aprovació per a la seva comercialització s'ha vist àmpliament reduït, donant explicació a l'augment del cost de desenvolupament d'un fàrmac en els últims anys.

Entre el 1990 i el 2005, a l'inici de la fase clínica I, les probabilitats d'aprovació d'un fàrmac eren aproximadament d'un 26%, és a dir, 1 de cada 4 compostos que entraven a fases clíniques aconseguia l'aprovació. Actualment, entre l'any 2018 i el 2022, aquest percentatge s'ha reduït fins al 10,8% i, només 1 de cada 10 compostos ho aconseguix.^{1,2} Això ha suposat un increment en el cost de desenvolupament per fàrmac, que ha passat d'1,2 bilions de dòlars entre 1985 i 2001, a 2,8 bilions entre 2018 i 2020.² Per tant, una reducció de més de la meitat de la taxa d'èxit concorda amb un augment de més del doble de cost de desenvolupament.

D'aquesta manera, es pot assumir que el fracàs en la indústria farmacèutica és una part inherent del procés. Així doncs, és clau la comprensió de les causes d'aquest per tal de millorar la situació i que el triomf no es consideri un esdeveniment tan rar en aquesta disciplina.

Segons dades d'estudis clínics, entre el 2010 i el 2017, les principals causes de fracàs van ser:³

- Falta d'eficàcia clínica, 40-50%.
- Toxicitat, 30%.
- Molècules amb poques propietats *drug-like*, 10-15%.
- Altres causes relacionades amb la comercialització i màrqueting, 10%.

S'observa que la falta d'eficàcia predomina sobre la resta, per tant, és lògic pensar que la indústria farmacèutica dediqui un gran esforç en la validació de noves dianes terapèutiques. La capacitat de descobrir noves dianes és clau per al desenvolupament farmacològic i per obtenir coneixement sobre els mecanismes de la malaltia, i així evitar una manca d'eficàcia a conseqüència de l'elecció de dianes amb poca capacitat de tractar la patologia.⁴

En el context de cerca de dianes terapèutiques prometedores, en aquest treball es presenten els receptors imidazolítics (IR).

1.1 - Història dels receptors imidazolítics (IR)

El descobriment dels IR està estretament relacionat amb la clonidina, actual fàrmac comercialitzat a Espanya per al tractament de la hipertensió i que disposa d'un anell d'imidazolina en la seva estructura. La clonidina va ser dissenyada i sintetitzada el 1960

per Boehringer Ingelheim Pharma com a descongestionant nasal, no obstant això, més endavant es van observar els seus efectes antihipertensius i bradicàrdics, ja que és capaç d'interaccionar amb els receptors α_2 -adrenèrgics (α_2 AR) centrals que provoquen una disminució perifèrica del sistema nerviós simpàtic.⁵

Malgrat els efectes antihipertensius, el seu ús actualment és bastant reduït, a causa dels seus efectes adversos: sedació, boca seca, impotència... els quals són provocats per la interacció amb els α_2 AR. En 1979, ja se'n tenia constància i, a partir d'aquell moment, la recerca es va centrar la investigació d'un segon lloc d'unió de la clonidina amb l'objectiu d'aïllar l'acció antihipertensiva fora dels efectes adversos.^{6,7}

En 1984, el grup del Dr. Bousquet va introduir per primer cop el concepte d'un lloc d'unió preferent d'estructures amb el nucli d'imidazolina, utilitzant microinjeccions de diferents molècules dins de la medul·la Rostral Ventrolateral (RVLM) de gats normotensos. Aquesta zona és coneguda per aglomerar neurones simpàtiques que actuen com a centre vasopressor. La injecció de clonidina provocava hipotensió, en canvi, l' α -metilnoradrenalina, que és altament selectiva pels α_2 AR, no causava el mateix efecte. No obstant això, la injecció d'altres compostos amb estructura d'imidazolina, com la cirazolina i l'ST 587, si provocaven una disminució de la tensió arterial, per tant, es va constatar l'existència d'un lloc d'unió d'imidazolines responsable dels efectes antihipertensius.⁸ L'experiment es troba representat en la **Figura 1**.

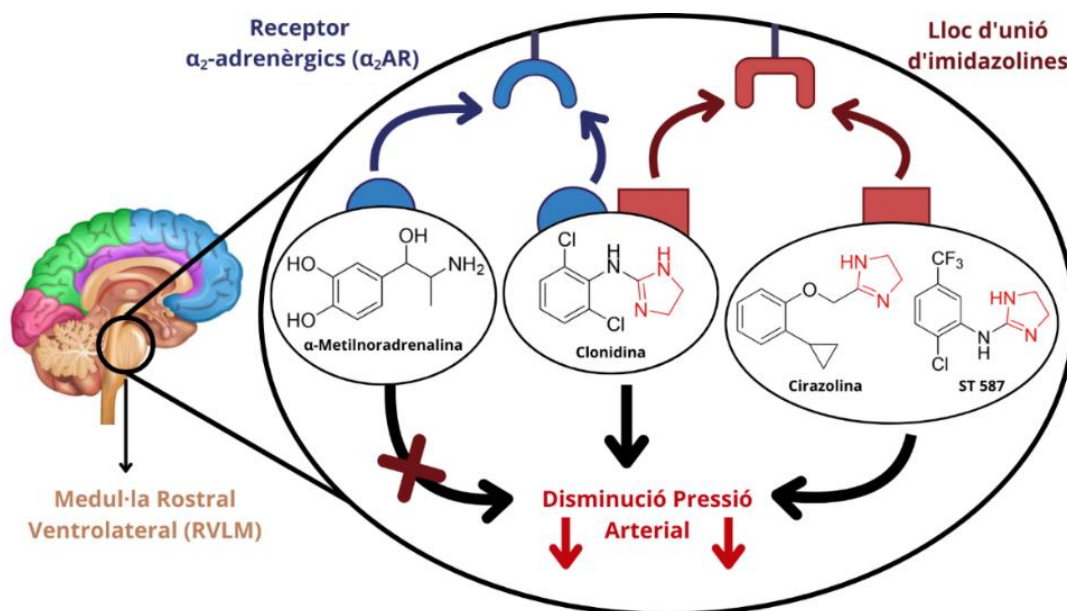


Figura 1: Representació de l'experiment del Dr. Bousquet que demostren l'existència d'un lloc d'unió d'imidazolines.⁸ En vermell s'indica l'anell d'imidazolina.

Així doncs, es va plantejar la síntesi de derivats de la clonidina amb una major afinitat pels IR i menor pels α_2 AR, fruit d'aquesta recerca apareix una segona generació de

compostos amb acció híbrida utilitzats en el tractament de la hipertensió, la moxonidina i la rilmenidina, dels quals se'n parlarà més endavant.

Amb la investigació de la nova família de receptors, es va descobrir la seva alta heterogeneïtat i, amb el temps, es van classificar en tres subtipus, els quals presentaven caracteritzacions bioquímiques, farmacològiques i funcionals totalment diferents.⁶

Malgrat el gran esforç aplicat en l'estudi dels IR, es continuen considerant estructuralment orfes. Ja que no s'ha pogut obtenir l'estructura de cap dels tres tipus de receptors. Això impedeix l'aproximació *Structure Based Drug Design*,⁹ és a dir, impedeix utilitzar l'estructura de la diana per dissenyar o seleccionar els millors lligands que hi puguin interaccionar. Per tant, s'ha hagut de recórrer a lligands ja coneguts de la diana, per usar la seva estructura com a punt d'inici per al desenvolupament de les noves molècules, el qual s'anomena *Ligand Based Drug Design*.⁹ Per aquest motiu, es remarca la importància del desenvolupament de nous lligands.

2- Objectius

Davant de la situació actual de la indústria farmacèutica, on es destaca la importància de la investigació de noves dianes terapèutiques, s'emmarca aquest treball de final de grau amb l'objectiu principal de realitzar un estudi bibliogràfic dels IR, la seva importància en farmacologia i del desenvolupament de lligands selectius d'aquests receptors.

Per obtenir una visió farmacològica completa i assolir l'objectiu principal es dividirà el treball en tres seccions diferents, on cada una disposarà del seu propi objectiu:

- 1a Part: Justificar la importància de la investigació dels IR i del seu ús com a diana terapèutica, mitjançant una cerca de la bibliografia més recent sobre les característiques dels receptors, la seva implicació en patologies i els efectes farmacològics derivats de la seva modulació.
- 2a Part: Explorar els lligands utilitzats fins a l'actualitat en l'estudi dels IR, centrant-se en la seva estructura, afinitat i selectivitat per a la diana. A més a més, justificar la importància del desenvolupament de nous lligands IR i valorar el seu impacte en la caracterització dels receptors.
- 3a Part: Treball experimental amb l'objectiu d'establir un protocol sintètic per a la síntesi de derivats d'una nova família d' α -iminofosfonats bicíclics amb selectivitat pels I₂-IR, i així contribuir en l'augment de l'arsenal de nous lligands IR.

3- Metodologia

En la major part de la realització d'aquest treball, corresponent a la 1a i 2a part, s'ha dut a terme una cerca bibliogràfica sobre l'última informació disponible dels IR. Mitjançant la base de dades *Scifinder*, escollida preferentment pel caràcter químic del treball, s'ha accedit al gran repertori d'articles científics i revisions sobre la temàtica a tractar.

Dins de les funcions que ofereix el motor de cerca d'*Scifinder*, principalment, s'ha usat l'apartat *References* per a l'estudi corresponent als IR i als seus lligands. No obstant això, també s'ha utilitzat l'apartat *Substances* per a la cerca d'un compost en concret i obtenir tota la bibliografia relacionada, en especial, durant la realització de la 2a part del treball.

Per obtenir el màxim nombre de resultats disponibles sobre cada tipus d'IR, s'han usat els termes "*imidazoline I₁ receptors*" OR "*imidazoline I₁ binding sites*" OR "*I₁-imidazoline*", que corresponen als més emprats per referir-se a aquestes entitats. Seguidament, per centrar la cerca sobre una patologia, un òrgan o un lligand en concret, s'ha emprat l'operador AND per creuar tots els resultats obtinguts amb el terme en específic. També mencionar, l'ús de revisions com a font de bibliografia i com a consulta de la informació més rellevant sobre la temàtica. Finalment, cal destacar, la consulta del material publicat i elaborat pel grup d'investigació en què es pretén contribuir durant l'elaboració d'aquest treball.

Pel que fa a la part experimental del treball, corresponent a la 3a part, ha estat necessari el domini de les tècniques del laboratori de química orgànica per a la síntesi, purificació i caracterització dels compostos. A més a més, de l'ús de diferent programari com ara el *MestreNova* per a la visualització i anàlisi dels espectres de Ressonància Magnètica Nuclear (RMN), i el *Chemdraw*, pel dibuix de les estructures dels compostos.

Finalment, per a la redacció del treball, s'ha usat el *Zotero* com a gestor bibliogràfic de la informació necessària per a la realització del treball i per a l'elaboració de la bibliografia.

4- Resultats i discussió

4.1 - 1a Part: Receptors imidazolínic (IR)

Originalment, els IR són descrits com llocs d'unió no adrenèrgics no sensibles a norepinefrina, però sí reconeguts pels lligands marcats radioactivament [³H]-clonidina, [³H]-*p*-aminoclonidina i [³H]-idazoxan.¹⁰ Més endavant, es va observar l'existència de diferents subtipus d'IR, els quals presentaven afinitats diferents per determinats ràdio lligands, es localitzaven en diversos llocs, tant a escala de l'organisme com a escala

cel·lular, i la seva modulació permetia induir efectes fisiopatològics totalment diferents. Els IR se subdivideixen en:

- Receptors imidazolítics I_1 (I_1 -IR): tenen una elevada afinitat per la [3 H]-clonidina, en canvi, presenten baixa afinitat pel [3 H]-idazoxan. Van ser els primers receptors a ser descrits i els que han estat objecte de més estudi. Funcionalment, s'han relacionat amb el sistema cardiovascular i el seu efecte simpàtic-inhibitori que permet disminuir la tensió arterial.
- Receptors imidazolítics I_2 (I_2 -IR): tenen una elevada afinitat pel [3 H]-idazoxan, tanmateix, presenten baixa afinitat per la [3 H]-clonidina i [3 H]-*p*-aminoclonidina. Es van descobrir a *posteriori* i ha resultat ser una família de receptors molt heterogènia. Es destaca la seva implicació en el control del dolor i en trastorns mentals.
- Receptors imidazolítics I_3 (I_3 -IR): són els més recents i desconeguts, per aquest motiu se'n disposa de molt poca informació. Es localitzen a les cèl·lules β -pancreàtiques i permeten regular la secreció d'insulina amb la seva activació.

4.1.1 - Receptors imidazolítics I_1 -IR

Històricament, malgrat no ser el radiolligand amb més especificitat pel receptor, s'ha utilitzat la clonidina com a marcador diferenciador dels I_1 -IR i distingir-los de la resta de subtipus de IR. Més endavant a la definició s'hi va afegir el requisit de ser antagonitzat per l'efaroxan.⁶

Des d'un inici es va constatar el bulb raquidi, concretament la RVLM, com a principal localització dels I_1 -IR, no obstant això, estudis posteriors han demostrat la seva presència en ronyó, plaquetes, cèl·lules cromafins de la glàndula adrenal, fetge, cor i estómac. En l'àmbit cel·lular, els receptors s'expressen a la membrana plasmàtica, principalment en terminals presinàptics.⁶

Es va establir la proteïna humana *Imidazoline Receptor Antisera-Selected* (IRAS) o, en ratolins nischarin, com a part essencial del receptor tant per a la unió amb els lligands imidazolítics com per iniciar la cascada de senyalització. Es va demostrar que el tractament amb oligonucleòtids antisentit dirigits al gen IRAS disminueix l'expressió de I_1 -IR i, que la immunoreactivitat de la proteïna també disminueix paral·lelament en minvar la densitat dels receptors.¹¹ Malgrat això, experiments recents usant lligands més selectius pels I_1 -IR i animals transgènics que no expressen la proteïna han demostrat que l'activació del receptor no es veu afectada per l'absència de IRAS, deixant la hipòtesi que IRAS es tracti d'un cofactor de baixa afinitat que contribueix a assolir una resposta

màxima als lligands poc selectius.¹² Tal com es pot observar, actualment encara no existeix un consens sobre l'estructura dels receptors.

Respecte a la farmacologia dels receptors, l'enfocament principal s'ha dirigit cap al tractament de la hipertensió i d'altres alteracions del sistema cardiovascular, tot i això, altres comorbiditats podrien beneficiar-se de la modulació d'aquesta diana com: la síndrome metabòlica,¹³ l'esteatosi hepàtica,¹⁴ la diabetis,¹⁵ el dolor¹⁶ i la disfunció renal.¹⁷ A continuació es realitzarà un repàs de cada una de les aplicacions mencionades.

Alteracions del sistema cardiovascular

Des d'un inici, l'acció antihipertensiva ha estat la més estudiada i és l'única indicació que disposa de fàrmacs aprovats. Com ja s'ha comentat, el concepte dels I₁-IR naix a través de l'intent de separar el component antihipertensiu dels efectes adversos associats a l'activació dels α_2 AR. Malgrat que inicialment es cregués possible, el paper dels α_2 AR en la hipertensió està molt lligat als I₁-IR.

En Espanya, en l'arsenal terapèutic per al tractament de la hipertensió, estan disponibles dos fàrmacs d'acció central: la clonidina, principalment d'acció sobre els α_2 AR i la moxonidina, fonamentalment sobre els I₁-IR. La rilmenidina, un altre lligand d'acció sobre els I₁-IR, no es troba comercialitzat a Espanya, però sí en altres països com França, Portugal i Romania. Actualment, aquests fàrmacs, tot i demostrar ser eficaços i segurs, es posicionen de les últimes opcions en el tractament antihipertensiu. No obstant això, s'està reconsiderant el seu paper en la teràpia de les formes d'hipertensió amb un predomini del to simpàtic, com ara: l'associada amb l'obesitat, diabetis, insuficiència renal crònica...¹⁸ per exemple, en l'assaig clínic MARRIAGE¹⁹ dut a terme el 2024, es demostra l'equivalència en seguretat i eficàcia entre la monoteràpia de moxonidina i ramipril en el tractament de la hipertensió en pacients amb sobrepès i diabetis. Així mateix, la combinació dels dos fàrmacs ofereix un major control de la pressió arterial sense alterar els paràmetres metabòlics.

Tal com es mostra en la **Figura 2**, la hipòtesi actual afirma que els I₁-IR es troben en una posició superior en la cascada de senyalització. Quan es produeix l'activació del I₁-IR, té lloc un augment de catecolamines en la RVLM que provoca l'activació dels α_2 AR, amb la consegüent depressió de les neurones presinàptiques i la disminució del to simpàtic.²⁰ Això permet explicar per què s'aboleix l'acció antihipertensiva dels I₁-IR en animals genèticament modificats que no expressen el α_2 AR o amb l'ús d'altres dosis d'antagonistes α_2 AR selectius.

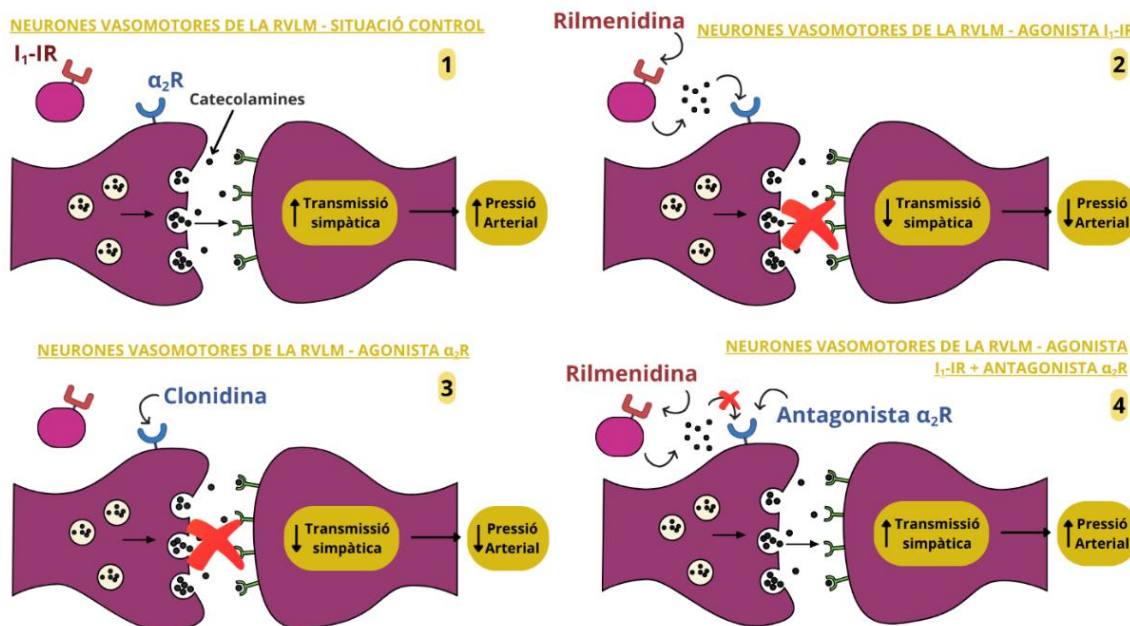


Figura 2: Mecanisme d'acció antihipertensiva proposat per als I_1 -IR.

A més a més de l'acció antihipertensiva, han demostrat exercir un control beneficiós en altres patologies relacionades amb el sistema cardiovascular com són les següents:

- **Hemorràgia intracranial**

La seva acció pot anar més enllà de la disminució de la pressió arterial. Ja que han demostrat produir efectes neuroprotectors i preservar la funció cerebral mitjançant accions antiinflamatòries, prevenció de l'apoptosi, prevenció de l'edema cerebral i reducció de l'excitotoxicitat causada per excés de neurotransmissors excitadors.²¹

- **Arrítmies cardíques**

La modulació dels I_1 -IR centrals produeix efectes antiarrítmics gràcies a l'obertura de canals de potassi ATP-dependents (K_{ATP}) i al tancament dels canals mitocondrials mPTP, de forma conjunta promouen la protecció dels cardiomiòcits. El mecanisme implica la participació d'una proteïna G i de la via de senyalització de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), *protein kinase B* (PKB o AKT) i *glycogen synthase kinase 3 beta* (GSK $_3$ β), on la inhibició de la GSK $_3$ β permet l'obertura i el tancament dels canals anteriors.²²

- **Hipertròfia cardíaca**

A més a més de la reducció de la pressió arterial i de la freqüència cardíaca que provoca l'activació dels I_1 -IR centrals, es planteja l'existència de I_1 -IR en el múscul cardíac, tant en cardiomiòcits com en fibroblasts. La modulació d'aquests receptors cardíacs, a banda de disminuir la concentració de citokines proinflamatòries que promouen la hipertròfia i l'apoptosi dels cardiomiòcits, permet induir canvis en la supervivència i mort cel·lular

mitjançant una acció selectiva. En el cas dels fibroblasts, es promou la mort cel·lular i, en el cas dels cardiomiòcits, la supervivència. D'aquesta manera, s'influeix en la dinàmica de la matriu extracel·lular i el remodelatge cardíac.²³

- **Alteracions vasculars de la síndrome metabòlica**

Sobretot tenen lloc a escala de capil·lars cerebrals i es manifesten en forma de disfunció endotelial, augment de l'estrès oxidatiu, inflamació i reducció de la perfusió vascular. Aquestes alteracions en la microcirculació del cervell, juntament amb la resistència a la insulina, es troben involucrades en el desenvolupament de malalties neurodegeneratives.²⁴ Els I₁-IR permeten recuperar la funcionalitat vascular en reduir el to simpàtic i en influir directament en la patogènia de la síndrome metabòlica, aspecte que s'explicarà en més detall a continuació.

Síndrome metabòlica

La dislipèmia, hipertensió, hiperglucèmia, resistència a la insulina i obesitat visceral són factors de risc que formen part dels criteris diagnòstics de la síndrome metabòlica.²⁵ En l'apartat anterior s'ha comentat el paper dels I₁-IR en el control de la hipertensió, tanmateix, els receptors permeten exercir un rol beneficiós sobre els altres factors de risc i, d'aquesta manera, desenvolupar un control complet d'aquesta síndrome.

Per una banda, l'activació dels I₁-IR permet revertir un augment constant del to simpàtic, el qual es considera un promotor del desenvolupament de l'obesitat. Estimulacions adrenèrgiques perllongades poden induir la dessensibilització dels receptors beta-adrenèrgics, disminuir el consum d'energia i augmentar el consum d'aliments, provocant un increment del teixit adipós i de la resistència a la insulina.²⁴

Per altra banda, fora de la seva activació central i independentment dels efectes simpàtic-inhibitoris, els I₁-IR es troben involucrats directament en la sensibilitat de la insulina, ja que estimulen la fosforilació de l'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) en els hepatòcits i produeixen un augment en la secreció d'adiponectina.¹⁵ A més a més, l'acció directa sobre els hepatòcits permet millorar el metabolisme dels carbohidrats, reduir la lipogènesis i millorar el perfil lipídic.²⁶

Esteatosi hepàtica

Malgrat ser una patologia amb una incidència bastant alta, el tractament de l'esteatosi actual és bastant insatisfactori. Així mateix, es tracta d'una malaltia que sense el tractament adequat pot arribar a desencadenar cirrosi o càncer.²⁷

S'han descrit dues vies mitjançant les quals els I₁-IR influeixen en la patogènia:

- Via del *Nuclear erythroid 2-related factor 2* (Nrf2): Els receptors augmenten l'activitat d'aquest factor de transcripció, el qual ja és considerat una diana amb gran potencial per al tractament de la malaltia gràcies a la inducció de la transcripció de gens antioxidants i antifibròtics. A més a més, el *Knockout* de I₁-IR o de Nrf2 impedeix aquest efecte, per tant, permet confirmar aquesta relació.²⁷
- Via de p-38: S'incrementa l'expressió del *farnesoid X receptor* (FXR) a conseqüència de l'activació de p-38. FXR és un receptor d'hormona nuclear que permet regular l'homeòstasi lipídica a través del control del catabolisme del colesterol a àcids biliars.¹⁴

Ambdues vies han sigut incrementades gràcies al tractament amb lligands selectius dels I₁-IR, i han suposat una millora en models cel·lulars i murins d'esteatosi hepàtica.

Insuficiència renal

La insuficiència renal es caracteritza per una disminució del filtratge glomerular i la manca de producció d'orina, produint una acumulació de substàncies de rebuig a la sang i excés de líquids.

L'activació dels I₁-IR renals és capaç d'augmentar la seva funció, reduir l'estrès oxidatiu, augmentar els mecanismes antiinflamatoris i disminuir l'apoptosi. Per tant, es tradueix en una preservació de la funció, una protecció davant dels possibles danys i una prevenció de la fibrosi renal.¹⁷

Per una banda, l'augment de la funció renal té lloc a través de l'estimulació de la fosfolipasa C, que culmina amb la generació de prostaglandines antiinflamatòries i la vasodilatació de l'arteriola aferent del ronyó, augmentant la pressió intraglomerular i, conseqüentment, el filtratge. Per l'altra banda, ocasionen un increment en l'excreció de sodi, tant a causa de la disminució del to simpàtic per l'activació dels receptors centrals, com per l'acció directa en els ronyons en inhibir la bomba de Na/H⁺. A més a més, s'ha observat un augment en la secreció de Pèptid natriürètic Auricular (ANP) derivada de la modulació dels I₁-IR cardíacs, que també contribueix en l'augment de la diüresi i la natriuresi.^{28,29}

Dolor neuropàtic

Aquest tipus de dolor en alguns casos és induït per l'acció de fàrmacs neurotòxics, sent la gran majoria antineoplàstics. Alguns d'ells, com l'oxaliplatí, són molt usats en quimioteràpia i en moltes ocasions s'ha de restringir el seu ús gràcies a aquest efecte advers. Actualment, no existeixen opcions terapèutiques per evitar l'aparició d'aquest

efecte, ja que la terapèutica analgèsica no és massa satisfactòria i presenta molts efectes adversos.

Un cop més, els I₁-IR han demostrat ser una diana adequada per aquest problema. L'administració repetida de lligands selectius permet prevenir els canvis en la població de les cèl·lules de la glia i dels d'astròcits en el sistema nerviós, fet que facilita el procés nociceptiu, la hipersensibilitat i la persistència del dolor. Així mateix, els I₁-IR inhibeixen la via de senyalització de factors de creixement del nervi, coneguts com uns potents inductors del dolor; i bloquegen el canal de Ca²⁺ voltatge dependent, molt relacionat amb la nocicepció.¹⁶

Un aspecte important a considerar és la possible interacció amb l'efecte antineoplàstic, ja que un dels efectes que s'ha mencionat de l'activació dels I₁-IR és la reducció de l'apoptosi. No obstant això, s'ha observat que no hi ha un augment en la supervivència de les cèl·lules tumorals en l'administració concomitant.¹⁶

Els I₁-IR han demostrat exercir un rol beneficiós en models cel·lulars i animals de les anteriors patologies, corroborant en tots els casos que els efectes són mediatos per l'activació dels mateixos receptors, gràcies a l'ús d'antagonistes selectius I₁-IR o de models genèticament modificats que no expressen el receptor. Per tant, es remarca la importància i funcionalitat dels I₁-IR com a una possible nova diana terapèutica.

4.1.2 - Receptors imidazolítics I₂-IR

Com ja s'ha mencionat anteriorment, des d'un inici s'ha usat el [³H]-idazoxan com a ràdio lligand emprat per a la classificació d'aquests receptors malgrat no disposar d'una excel·lent selectivitat, ja que també s'uneix als α₂AR. A més a més, aquests receptors es caracteritzen per la seva gran heterogeneïtat, fins al punt de no referir-se a una entitat molecular específica.

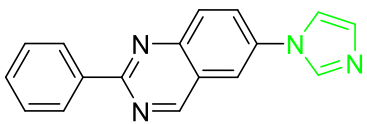
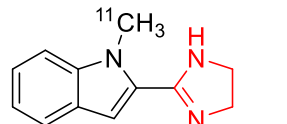
La seva expressió, igual que els I₁-IR, també s'ubica en el SNC, però majoritàriament en astròcits i cèl·lules de la glia. Així mateix, també s'han trobat en ronyons, fetge, colon, placenta, uretra, pròstata, medul·la adrenal, cossos caròtides, plaquetes, pàncrees i cèl·lules del múscul llis vascular. En canvi a escala cel·lular, es localitzen en la membrana externa dels mitocondris.⁶

L'estratègia emprada per estudiar els IR es fonamenta en l'observació dels efectes fisiològics que produeix l'administració de lligands selectius. No obstant això, al produir efectes psicoactius, els lligands I₂-IR disposen de la capacitat de presentar estímuls discriminatius, això permet entrenar éssers vius a reconèixer els estímuls provocats pels lligands I₂-IR quan se'ls administra una altra substància amb un mecanisme d'acció

similar. D'aquesta manera, s'observa com substàncies que incrementen la noradrenalina, dopamina i serotonina en l'espai sinàptic, aconseguixen substituir el tractament amb els agonistes I₂-IR, indicant la implicació d'aquests neurotransmissors en el mecanisme d'acció dels receptors.³⁰

Des d'un inici ha quedat constatat el paper dels I₂-IR com a inhibidors de l'enzim monoamino oxidasa (MAO), a l'unir-se en un lloc al·lostèric de l'enzim.³¹ Tanmateix, no es tracta de l'única proteïna d'unió, ja que mitjançant assaigs immunoquímics s'ha aconseguit aïllar varies estructures proteïques unides als receptors, la gran majoria de les quals se'n desconeix la identitat. Únicament s'ha determinat una d'elles, una proteïna de 45 kDa que es relaciona amb la *brain creatine kinase* (B-CK).³² Ambdues proteïnes d'unió mencionades estan implicades en l'alliberament de neurotransmissors, concordant amb els resultats obtinguts amb els estímuls discriminatius.

Fins a l'actualitat, s'ha descobert la implicació dels I₂-IR en molts processos fisiològics, la cerca s'ha centrat en gran manera en el camp del dolor³³ i les malalties neurodegeneratives, com la Malaltia d'Alzheimer (MA)³⁴ i de Parkinson.³⁵ Fruit d'aquesta investigació s'han desenvolupat dues molècules que es troben en fases clíniques, CR4056 (**Taula 1**) que es tracta del lligand *First-in-class* i es troba en fase II per al tractament oral de l'osteoartritis de genoll i dolor dental; i ¹¹C-BU99008 (**Taula 1**) en fase I per al diagnòstic PET de malalties neurodegeneratives. També cal mencionar, els prometedors resultats obtinguts en altres àmbits com en tumors glials³⁶ i depressió,^{37,38} on s'ha observat l'alteració dels receptors.

Lligand	CR4056	¹¹ C-BU99008
Fase d'investigació	Fase clínica II	Fase clínica I
Indicació	Osteoartritis de genoll i dolor dental	Ràdio-traçador PET dels I ₂ -IR
Desenvolupament	Rottapharm Biotech	Imperial College London i GlaxoSmithKline
Estructura		

Taula 1: Lligands I₂-IR en fase clínica. Indicació, estructura i desenvolupament. En vermell s'indica l'estructura imidazolílica i en verd l'anell imidazole.

Tractament del dolor

En el Global Burden of Disease Study 2016, es va destacar el dolor i les malalties relacionades amb ell com la causa principal de discapacitat. Es calcula, en el cas del dolor

d'esquena baixa i de la migranya, uns 57,6 i 45,1 milions d'anys de vida perduts per culpa de discapacitat, xifres superiors de les obtingudes en càncer, depressió, diabetis i MA.³⁹

El coneixement sobre la neurobiologia del dolor ha anat augmentant en aquests últims anys, tot i això, l'obtenció de nous i millors analgèsics no ha seguit la mateixa tendència.³³ Aquesta càrrega social-econòmica i manca d'arsenal terapèutic impliquen la necessitat de continuar estudiant la complexa via del dolor i identificar noves dianes que permetin el seu tractament.

Perquè una molècula sigui considerada analgèsica ha de complir almenys un dels tres requisits següents:³³

- 1) **Posseir propietats analgèsiques** per ella mateixa.
- 2) Actuar com a coadjuvant, **augmentant l'activitat d'altres molècules analgèsiques** o millorant la seva farmacocinètica.
- 3) **Disminuir els efectes adversos** d'altres analgèsics.

Es proposa que **el comportament analgèsic (1)** té lloc gràcies a la inhibició de l'enzim MAO per la unió dels lligands en el lloc al·lostèric, això produeix una disminució del metabolisme dels neurotransmissors monoaminèrgics i provoca un augment de les seves concentracions sinàptiques. Així doncs, la interacció dels neurotransmissors amb els seus receptors corresponents condueix a l'activació de les vies descendents del dolor i a la seva reducció.³⁰ Aquest mecanisme es troba representat en la **Figura 3**.

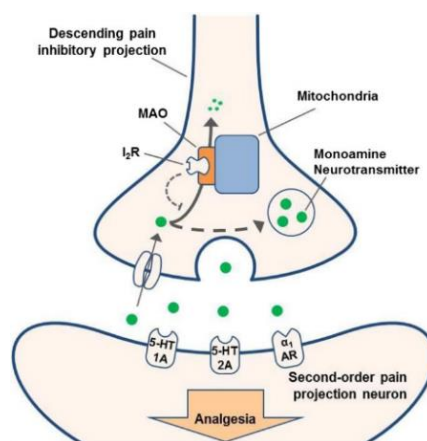


Figura 3: Extret de "Diagram describing the probable mechanism of action of I₂ receptor agonists."³⁰

Els lligands selectius dels I₂-IR són efectius per reduir el dolor crònic, en especial aquell induït per un estímul químic. S'han obtingut resultats positius en models de rata d'inflamació i dolor neuropàtic, oferint un control tant del component afectiu com sensitiv del dolor.⁴⁰ Així mateix, sembla no provocar un abús en models animals de rata, inclús en aquells que tenen dolor i la seva reducció podria suposar un poderós reforç negatiu.⁴¹ Pel que fa al dolor agut, la seva eficàcia es redueix considerablement, únicament sent capaços de reduir estímuls de baixa intensitat.⁴²

El dolor crònic normalment es manté durant més de tres mesos i implica administrar diverses dosis d'analgèsic, la qual cosa pot comportar tolerància i pèrdua de l'efecte. No obstant això, els lligands I₂-IR han mostrat poca tendència a desenvolupar-la.⁴⁰

Amb l'objectiu de millorar el tractament del dolor agut, s'ha plantejat la combinació dels lligands I₂-IR amb opioïdes, per tal d'oferir un control total del dolor. Actualment, els opioïdes són els analgèsics més efectius, però el seu ús en clínica és molt limitat a causa del gran nombre d'efectes adversos que presenten, com el restrenyiment, dependència física, abús i depressió respiratòria.⁴⁰ En models animals, s'ha observat un component sinèrgic en aquesta combinació, on s'aconsegueix **augmentar el potencial analgèsic dels opioïdes (2) i reduir els seus efectes adversos (3)**, com ara: bloquejant la hipertèrmia induïda per morfina, atenuant el desenvolupament de tolerància i els símptomes de dependència i abús.⁴³

Així doncs, els lligands I₂-IR no només compleixen un dels tres requisits necessaris per considerar-se analgèsics, sinó que els compleixen tots tres. Aquest fet, sumat a la poca predisposició a desenvolupar tolerància i abús, els concedeix un enorme potencial com a eina terapèutica per al tractament del dolor, el qual es veu reflectit amb l'arribada del lligand CR4056 a fase clínica.

CR4056 és un compost agonista, reversible i específic dels I₂-IR que, com s'ha mencionat anteriorment, es troba en fase II per al tractament oral de l'osteoartritis de genoll i dolor dental. Ha demostrat una potent activitat dosi-resposta en diferents models animals, una bona seguretat, tolerabilitat i capacitat d'assolir nivells plasmàtics acceptables en fase I. Fins al moment, els resultats de fase II continuen aportant evidència clínica de rellevància i seguretat.⁴⁴

Tanmateix, tot i no haver-se provat en fase clínica, la sinergia amb opioïdes⁴⁵ i el tractament del dolor neuropàtic⁴⁶ s'han assajat en models animals obtenint resultats molt favorables. En aquest últim estudi, CR4056 ha demostrat reduir l'al·lodínia mecànica causada pel fàrmac borteomib, la qual és difícilment controlable amb els analgèsics actuals.⁴⁶

Trastorns del sistema nerviós central

L'expressió dels I₂-IRs s'ha vist alterada en nombroses patologies relacionades amb el SNC. En el cas dels tumors glials, els quals constitueixen el grup més important de tumors cerebrals en humans, la densitat dels receptors augmenta en els malalts. Així doncs, en funció de l'augment, es permet la seva classificació de manera que a major expressió major malignitat. Això permetria el diagnòstic i la classificació exacta del tumor, per tal d'escollir la millor opció terapèutica.³⁶

De la mateixa forma que en els gliomes, l'expressió dels receptors també es troba augmentada en depressió⁴⁷ i malalties neurodegeneratives, com el Parkinson⁴⁸ i la MA.³⁴

La investigació en aquest camp ha permès desenvolupar un ràdio lligand que aprofités aquesta característica per al diagnòstic de les malalties neurodegeneratives esmentades. Com s'ha mencionat anteriorment, el compost ^{11}C -BU99008 es troba en fases clíniques i disposa d'una selectivitat pels I_2 -IR molt elevada, que permet mapar la localització i la densitat dels receptors a través del seu ús en tècnica PET.⁴⁹

La seva quantificació pot servir com a marcador indirecte de la microglia reactiva, a causa de l'augment de l'expressió dels receptors que es presenta. Aquest increment té un paper clau en les etapes primerenques de les malalties, a conseqüència dels mecanismes compensadors neuroprotectors i la regulació a l'alça de molècules proinflamàtores. És important destacar que aquest fet és previ a l'inici de la pèrdua cognitiva, cosa que permet el diagnòstic precoç de la patologia.^{35,50}

Més enllà del seu ús com a eina de diagnòstic, l'experimentació recent ha demostrat l'impacte positiu dels agonistes selectius I_2 -IR en el tractament de la MA i la depressió, que els constitueixen com a possibles dianes per al seu tractament.

Malaltia d'Alzheimer (MA)

Segons dades de l'OMS, cada any hi ha aproximadament 10 milions de casos nous de demència, dels quals el 60-70% es manifesten en forma de MA.⁵¹ Així mateix, tenint en compte l'envelliment de la població, la prevalença d'aquesta patologia anirà a l'alça en els pròxims anys.⁵² Actualment, és considerada incurable i la terapèutica disponible se centra únicament a pal·liar la simptomatologia.⁵³ Tots aquests aspectes comentats atribueixen a la MA un enorme pes en la nostra societat i la converteix en una necessitat mèdica no coberta.

S'ha observat que els I_2 -IR augmenten en proporció gràcies a l'envelliment i a la MA.⁵⁴ A més a més, la seva modulació té efectes en el comportament i la cognició, mostrant un augment de l'activitat locomotora, memòria, capacitat d'aprenentatge i un efecte ansiolític. Els seus efectes neuroprotectors han sigut comprovats en diferents línies cel·lulars i en models animals molt usats en la investigació de la MA, com els ratolins 5xFAD i *Senescence-Accelerated Mouse Prone 8* (SAMP8), on s'han observat els següents canvis:^{55,56}

- Inflamació neuronal: la reducció de *Glial fibrillary acid protein* (GFAP) indica un bon control en l'ambient inflamatori i l'astroglíosis, acompanyat d'una menor quantitat de citokines proinflamàtores com: IL-6, IL-18 i IL-1 β .
- Plaques de β -amiloide: històricament, juntament amb la proteïna tau constitueixen els principals *hallmarks* de la patologia. La seva reducció és gràcies

a modificacions en la via del *soluble Amyloid precursor protein* (sAPP), on es redueix la via considerada amiloidogènica, sAPP β , i augmenta la descrita com a neuroprotectora, sAPP α .

- Proteïna tau hiperfosforilada: a conseqüència d'una disminució de l'activitat de la *Cyclin-dependent kinase 5* (CDK5) i de la via de l'AKT-GSK β , ja que ambdues permeten la fosforilació de la proteïna.
- Estrès oxidatiu: té lloc un augment de la defensa antioxidant en incrementar l'expressió del gen *Heme oxygenase 1* (Hmox1).
- Plasticitat neuronal: Augment dels nivells de la forma fosforilada del *cAMP response element-binding* (CREB), factor de transcripció que incrementa l'expressió d'una proteïna molt important per al creixement neuronal i la plasticitat, el *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF).
- Apoptosi: Reducció de *Fas-associated protein with death domain* (FADD), caspasa 3 i *Bcl-2-associated X* (BAX), les quals es tracten de factors proapoptòtics.
- Neurotoxicitat: Es disminueix l'activitat de Calpain, proteïna que permet convertir la proteïna p35 a la seva forma activa p25, la qual provoca una activació aberrant de CDK5 i neurotoxicitat.

Alguns dels efectes anteriors tenen com un punt inicial comú, la inhibició de la Calcineurina. Es tracta d'una fosfatasa serina/treonina dependent de calci, que en adults sans es troba de forma elevada en neurones i baixa en cèl·lules de la glia. S'ha observat que la seva desregulació implica pèrdua cognitiva i, en pacients de MA, el seu senyal es troba augmentat. Aquesta hiperactivitat patològica és inhibida pel tractament amb lligands I₂-IR, provocant la disminució de l'activitat de GSK β , l'augment de la forma activa de CREB, la disminució de BAX i caspasa 3 i una disminució de la forma activa de *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT), factor de transcripció que en una activació contínua pot causar distròfia neuronal, pèrdua d'espines dendrítiques i acumulació de β -amiloide en estimular la via amiloidogènica.⁵⁶

Depressió

La modulació dels I₂-IR s'ha provat en múltiples assaigs emprats per a la comprovació de l'acció antidepressiva, un dels més comuns és el test de natació forçada (FST). En aquest assaig s'observa el temps que els animals romanen immòbils quan són alliberats en un medi aquàtic i el que tarden a intentar sortir d'aquest. Alguns lligands utilitzats han permès reduir significativament aquest temps d'immobilització i, a més a més, el seu efecte desapareix quan els animals són tractats prèviament amb un antagonista dels I₂-IR, demostrant la participació dels receptors en l'efecte antidepressiu.³⁸

Seguint la mateixa sistemàtica que en el tractament del dolor, els efectes antidepressius causats per l'administració dels lligands I₂-IR deriven de l'augment de noradrenalina, dopamina i serotonina, ja que s'ha confirmat la implicació d'aquests neurotransmissors mitjançant l'ús d'antagonistes selectius del receptor de cada un.³⁷ Tanmateix, en el cas dels efectes antidepressius tenen lloc mitjançant la interacció amb els I₂-IR units a la B-CK i no a la MAO, tal com passava en el cas dels efectes analgèsics.^{32,57}

Efecte hipotèrmic

L'administració de lligands I₂-IR pot causar una disminució de la temperatura corporal de forma dosi dependent i s'han observat disminucions de fins 3,5 °C.⁵⁸ Aquesta disminució, per lleugera que sigui, pot tenir un efecte protector en isquèmia cerebral, ictus i traumes cerebrals. Per tant, algunes de les accions neuroprotectores que ofereixen els lligands poden estar relacionades amb la disminució de la temperatura.⁵⁹

A diferència dels efectes antidepressius i els analgèsics, la disminució de la temperatura sembla no involucrar la via noradrenèrgica, serotoninèrgica ni dopaminèrgica.³⁰

En resum, s'han obtingut resultats prometedors en molts models de patologies diferents, constatant la gran funcionalitat que pot representar la modulació d'aquesta diana. Malgrat això, existeix una gran variabilitat dels efectes observats en funció del model i del lligand emprat. Per exemple, el lligand LSL60101 o [2-(2-benzofuranil)imidazol], ha sigut objecte d'estudis per comprovar el seu potencial en el tractament del dolor⁶⁰ i de la MA,⁶¹ obtenint resultats molt positius, en canvi, ha resultat incapaç d'exercir cap efecte antidepressiu.⁶² La principal explicació d'aquest fenomen és la gran heterogeneïtat de la família de receptors, ja que s'han trobat fins a 4 proteïnes potencials a les quals podrien estar units.⁵⁷ D'aquesta manera, cada receptor podria reconèixer petites variacions en l'estructura química dels lligands, presentant diferents afinitats per cada un d'ells i desenvolupant efectes fisiològics diferents.⁶² Per tant, es recalca la importància de la investigació en el camp dels I₂-IR amb l'objectiu de determinar l'estructura de cada un dels subtipus, així elaborar lligands selectius que aconseguixin interaccionar específicament en cada un d'ells i desenvolupar l'efecte desitjat.

4.1.3 - Receptors imidazolítics I₃-IR

Els I₃-IR són el tipus de IR que s'han descobert més recentment, però s'han realitzat molt pocs avenços en la seva investigació durant les passades dues dècades. Principalment, la seva expressió es troba en les cèl·lules β pancreàtiques, on es troben associats a canals K_{ATP}.⁶³ L'activació dels receptors ocasiona el tancament dels K_{ATP} de les cèl·lules β

pancreàtiques, provocant una despolarització que procedeix amb l'entrada de calci, la secreció d'insulina i la reducció de glucosa en sang.³¹

A més del seu paper en el control de la glucèmia, s'han observat efectes protectors davant del dany pancreàtic relacionats amb un efecte antiapoptòtic. La modulació dels receptors produeix una reducció en la senyalització proapoptòtica cel·lular, com la disminució de la caspasa 3 i la inhibició de BAD per fosforilació. En un experiment amb cultius de cèl·lules β , l'administració d'agmatina, un compost amb capacitat d'interaccionar amb els I_3 -IR, permet evitar que el 63,4% de la població del cultiu iniciï l'apoptosi després del tractament amb un compost generador d'espècies reactives d'oxigen, l'STZ. A més a més, el tractament amb KU14R, utilitzat en els estudis com un antagonista dels I_3 -IR, bloqueja aquest efecte i confirma la implicació dels receptors en la protecció cel·lular.⁶⁴

Malgrat disposar de poca informació, els I_3 -IR presenten un especial interès gràcies al seu paper en la secreció d'insulina, així doncs permeten l'accés a noves eines terapèutiques per al control de la glucèmia a través d'una nova diana. Tanmateix, es requereix una major investigació amb l'objectiu de profunditzar la relació entre els receptors i la secreció d'insulina i l'obtenció de nous lligands selectius que permetin continuar estudiant la seva funcionalitat.

En resum, els IR constitueixen una família heterogènia de receptors que s'organitza en tres grups diferenciats, amb una localització molt dispersa en l'organisme i desenvolupant un rol important en el tractament de diverses patologies. En la **Figura 4** s'ha realitzat un recopilatori dels principals òrgans on s'expressen els receptors i les accions que duen a terme.

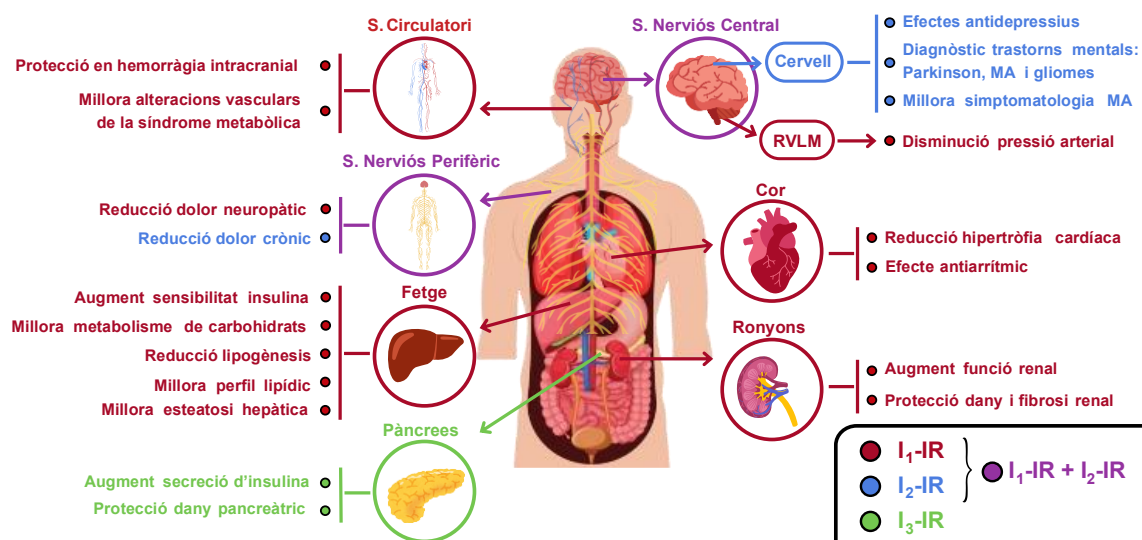


Figura 4: IR: Localització i principals efectes fisiopatològics observats.

4.2 - 2a Part: Lligands dels IR

4.2.1 – Lligands dels I₁-IR

Com ja s'ha mencionat anteriorment, malgrat la poca selectivitat que presenten pels receptors, la clonidina i l'efaroxan han sigut molt emprats com a marcadors dels I₁-IR. Així doncs, la manca de lligands selectius ha obligat a desenvolupar estratègies d'emascarament, mitjançant antagonistes α_2 AR, per a l'estudi dels I₁-IR.⁶ Per aquest motiu, el desenvolupament de nous lligands està estretament relacionat amb l'obtenció de nou coneixement sobre els receptors. A continuació es realitza un repàs dels dos lligands més importants per a l'estudi dels I₁-IR, la clonidina i l'efaroxan, i d'alguns dels seus derivats. Es recullen tots els compostos que es comenten a la **Figura 5**.

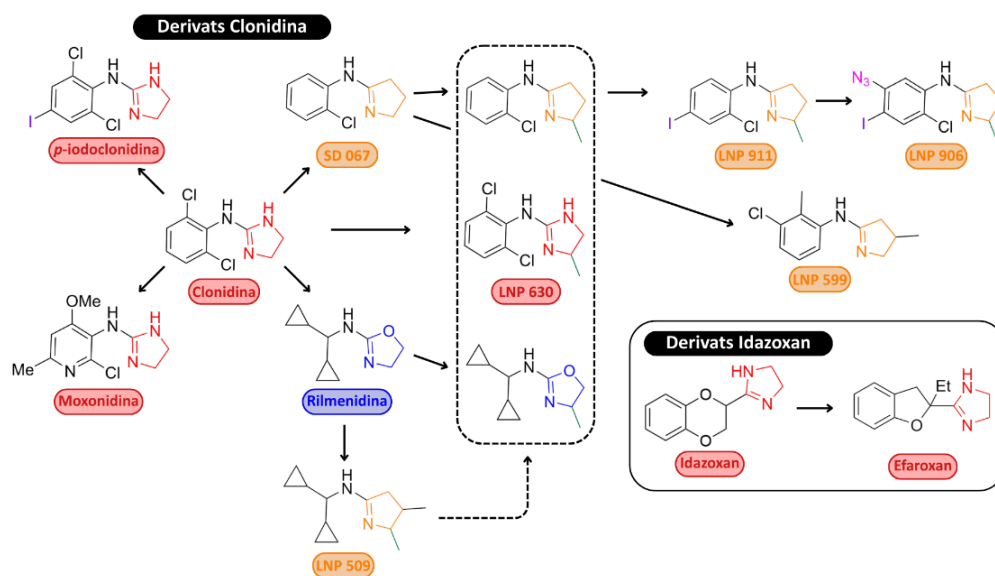


Figura 5: Lligands I₁-IR derivats de la clonidina i l'idazoxan. En vermell ressaltat l'anell imidazolínic, en blau l'anell oxazolínic i en taronja l'anell pirrolínic.

Derivats de la clonidina

La **clonidina** (pK_i I₁-IR = 7.85; pK_i α_2 AR = 8.42)⁶⁵ es tracta d'una **2-amino-2-imidazolina**, que presenta potencial antihipertensiu derivat principalment per la interacció amb els receptors adrenèrgics. Així doncs, es van dur a terme diverses modificacions en l'estructura de la clonidina amb l'objectiu de millorar la seva selectivitat pels I₁-IR.

- La iodació en posició *para* en l'anell aromàtic, permet el desenvolupament de la **p-iodoclonidina** (pK_i I₁-IR = 8.31; pK_i α_2 AR = 8.65). Aquesta modificació presenta dos clars avantatges: per una banda, augmenta la selectivitat pels I₁-IR sobre els altres receptors IR, però també incrementa l'afinitat pels receptors α_2 AR. Per l'altra banda, la introducció del radioisòtop ¹²⁵I, el qual presenta una activitat altament específica, permet el seu ús com a ràdio lligand per a l'estudi dels I₁-IR.^{66,67}

- Canvis en l'anell aromàtic de la clonidina van donar lloc a la **moxonidina** ($pK_i I_1\text{-IR} = 8.37$; $pK_i \alpha_2\text{AR} < 5$), la qual presenta unes 700 vegades major afinitat pels $I_1\text{-IR}$ que pels $\alpha_2\text{AR}$.⁶⁶ Conjuntament amb la **rilmenidina** formen part de la 2a generació de fàrmacs antihipertensius d'acció central.
- La **rilmenidina** ($pK_i I_1\text{-IR} = 7.08$; $pK_i \alpha_2\text{AR} = 6.74$)⁶⁵ també s'obté a partir de la modificació estructural de la **clonidina**, però a diferència de la **moxonidina**, la part imidazolílica se substitueix per una **2-oxazolina**. No obstant això, tot i presentar una major selectivitat pels $I_1\text{-IR}$, es continua unint als $I_2\text{-IR}$ i als $\alpha_2\text{AR}$, causant els efectes adversos característics, en especial sedació.⁶
- Una altra modificació en l'anell imidazolínic de la **clonidina** condueix a l'obtenció d'una família d'**2-amino-2-pirrolines**, en concret **SD 067** ($pK_i I_1\text{-IR} = 7.11$; $pK_i \alpha_2\text{AR} = 5.52$). Es tracta d'un derivat pirrolínic amb propietats hipotensores però amb un menor efecte sobre els $\alpha_2\text{AR}$, ja que evita la vasoconstricció per l'activació dels receptors α -adrenèrgics.⁶⁷

Derivats metilats

Malgrat la reducció de l'afinitat pels $\alpha_2\text{AR}$ aconseguida amb la 2a generació de fàrmacs, aquests no es troben totalment absents d'unió amb els receptors, i això continua suposant un inconvenient per a l'estudi dels $I_1\text{-IR}$. L'obtenció del **LNP 509** ($pK_i I_1\text{-IR} = 6.27$; $pK_i \alpha_2\text{AR} > 5$), un derivat pirrolínic metilat de la **rilmenidina** amb gran perfil de selectivitat pels $I_1\text{-IR}$ i potencial hipotensor, inspira l'exploració de modificacions en l'heterocicle de les 3 famílies de compostos comentades: les **2-amino-2-imidazolines**, **2-amino-2-oxazolines** i **2-amino-1-pirrolines**.⁶⁷

En concret, s'explora la metilació del carboni adjacent a l'àtom de nitrogen de l'heterocicle de la **clonidina**, la **rilmenidina** i l'**SD 067**, donant lloc a derivats amb una gran reducció de l'afinitat pels $\alpha_2\text{AR}$, ja que la introducció d'un grup metil impedeix el posicionament correcte dels lligands dins del lloc d'unió. En respecte a l'afinitat amb els $I_1\text{-IR}$ i l'efecte antihipertensiu, s'obtenen diferents resultats en funció de la família i, únicament, el derivat metilat de la **clonidina**, el **LNP 630** ($pK_i I_1\text{-IR} = 9.03$; $pK_i \alpha_2\text{AR} = 5.71$), mostra un augment i potencial hipotensor.⁶⁷

Cal destacar que, la iodació de l'anell aromàtic del derivat metilat de **SD 067** en posició *para* condueix a l'obtenció del ràdio lligand **LNP 911** ($pK_i I_1\text{-IR} = 9.70$; $pK_i \alpha_2\text{AR} = 5.60$).^{65,68} A més a més, amb la introducció d'un grup azida permet la generació del fotolligand **LNP 906** ($pK_i I_1\text{-IR} = 8.22$; $pK_i \alpha_2\text{AR} = 6.65$).⁶⁵ Aquest últim compost actua com un antagonista reversible dels receptors en condicions de fosc, però amb l'aplicació de llum UV la seva unió esdevé irreversible.⁶⁹ Ambdós representen els primers ràdio lligand i foto lligand

amb afinitat subnanomolar i alta selectivitat pels I_1 -IR, el qual els converteix en eines excel·lents per a l'estudi dels receptors.

Arilaminopirrolidines

Amb l'augment de la selectivitat pels I_1 -IR s'aconsegueix una reducció dels efectes adversos, però també de l'efecte hipotensor, ja que la pèrdua d'afinitat pels α_2 AR evita l'acció sinèrgica dels dos receptors en el control de la pressió. El derivat pirrolínic de la **rilmenidina**, **LNP 509**, va ser el primer compost totalment desproveït d'efectes adrenèrgics capaç de disminuir la pressió arterial. En canvi, els nous lligands altament selectius, **LNP 911** i **LNP 906**, no presenten cap acció hipotensora. Per tant, amb l'objectiu de potenciar aquest efecte en els derivats pirrolínics es duu a terme un estudi per analitzar la seva relació estructura-activitat.⁶⁵

Fruit d'aquesta investigació es desenvolupen un seguit d'estructures arilaminopirrolidines, de les quals es destaca el **LNP 599** (pK_i I_1 -IR = 8.49; pK_i α_2 AR = <5), amb gran selectivitat pels I_1 -IR i capacitat per reduir la tensió arterial. A més a més, els compostos presenten efectes metabòlics positius, com reducció del colesterol i millora de la tolerància a la glucosa. A diferència de l'efecte hipotensor, els efectes metabòlics escalen amb la millora de la selectivitat, ja que inclús la interacció amb els α_2 AR pot provocar l'efecte contrari. Així doncs, el lligand **LNP 599** ha sigut objecte de nombrosos estudis pel seu gran potencial per al tractament de la síndrome metabòlica i la hipertensió.⁶⁵

Derivats de l'idazoxan

L'**idazoxan** és un lligand usat en l'estudi dels I_2 -IR que presenta molt poca afinitat pels I_1 -IR i, per aquest motiu, es comentarà amb més profunditat en el pròxim apartat. Malgrat això, algunes modificacions de la seva estructura han conduït al desenvolupament de lligands amb una afinitat considerable pels I_1 -IR. Concretament, l'**efaroxan** (pK_i I_1 -IR = 7.14; pK_i α_2 AR = 7.29)⁷⁰ deriva del canvi de l'anell de dioxà de l'**idazoxan** per un de dihidrofurà substituït amb un grup etil i, tot i unir-se amb més afinitat als receptors α_2 AR, ha sigut molt utilitzat per a la caracterització dels I_1 -IR. A més de tractar-se d'un lligand no selectiu, la seva activitat varia en funció dels receptors, ja que actua com antagonista davant dels I_1 -IR i α_2 AR, i com agonista en els receptors I_3 -IR.^{6,66}

4.2.2 – Lligands dels I_2 -IR

El desenvolupament de lligands I_2 -IR selectius és necessari per a l'estudi dels receptors, en tractar-se d'una família altament heterogènia es requereixen lligands que interactuin de forma específica amb determinades formes dels receptors, per tal de desenvolupar

l'efecte fisiològic desitjat i evitar la interacció amb altres subtipus de I₂-IR, fet que pot causar variabilitat en els resultats dels estudis i l'aparició d'efectes adversos.^{57,62} A continuació es comentaran alguns dels lligands més usats en l'estudi dels receptors i les seves corresponents famílies, els compostos comentats es recullen a la **Figura 6**.

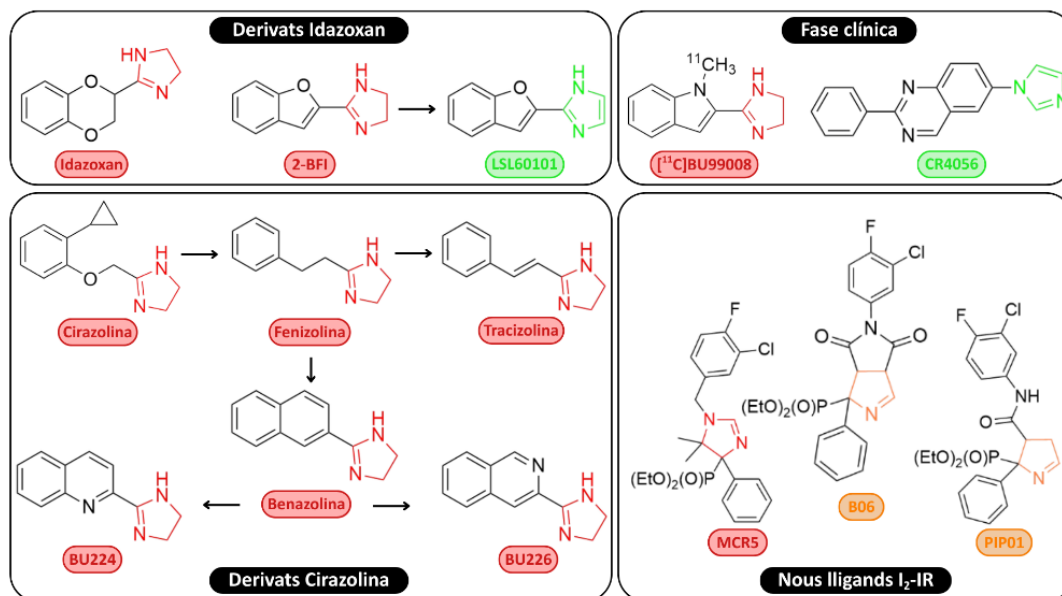


Figura 6: Estructura dels lligands I₂-IR. En vermell ressaltat l'anell imidazolínic, en verd l'anell imidazol i en taronja l'anell pirrolínic.

Derivats idazoxan

L'**idazoxan** (pK_i I₂-IR = 7.97; pK_i α_2 AR = 7.26) és considerat el marcador històric dels I₂-IR i, malgrat no ser selectiu pels receptors, ha estat molt usat en la seva caracterització gràcies a la seva acció com antagonista. A més a més, a partir de la seva farmacomodulació, s'han obtingut diversos lligands en els quals s'ha modificat tant l'heterocicle com els substituents de l'anell aromàtic. Per una banda, les modificacions dels substituents de l'anell aromàtic no presenten massa interès, malgrat que aconseguir augmentar la selectivitat pels I₂-IR, en la majoria dels derivats, es produeix una disminució de l'afinitat pels I₂-IR, i l'augment de selectivitat és causat principalment per una disminució major de l'afinitat pels α_2 AR.⁶⁶

Per altra banda, els anàlegs de l'heterocicle resulten més interessants, concretament, el canvi de l'anell de dioxà per un anell de furà dona lloc a l'estructura **2-BFI** (pK_i I₂-IR = 8.89; pK_i α_2 AR = 5.43), un anàleg molt rellevant en l'estudi dels receptors, ja que disposa d'una de les majors afinitats i selectivitats pels I₂-IR.⁷¹ A més a més, presenta un anàleg amb estructura imidazol, **LSL60101** que, tot i presentar una baixa afinitat pels I₂-IR en teixits cerebrals de rata, en teixits cerebrals humans presenta una de les més elevades (pK_i I₂-IR en rata = 6.45; pK_i I₂-IR en humans = 9.03).⁷²

Derivats de la cirazolina

La **cirazolina** és un lligand I₂-IR (pK_i I₂-IR = 8.41; pK_i α_2 AR = 7.77),⁷³ que també s'uneix als α_2 AR. Per tal d'augmentar la seva selectivitat, les variacions estructurals han donat lloc a nous lligands, que han desenvolupat un paper fonamental en l'estudi dels I₂-IR des de finals del segle XX fins a l'actualitat.⁶⁶

En estudiar la relació estructura-activitat de la **cirazolina**, es descarta el grup ciclopropil per resultar innecessari en la unió amb els receptors, i es realitza el canvi isostèric de l'àtom d'oxigen per un metilè, que permet disminuir l'afinitat pels α_2 AR. Aquestes modificacions donen lloc a **fenizolina** (pK_i I₂-IR = 8.60; pK_i α_2 AR = 5.70),⁷³ que va ser considerada un *lead* a causa de les seves excel·lents propietats i per l'eliminació del component adrenèrgic.^{70,73}

Posteriorment, partint de l'estructura de la **fenizolina** i reduint la seva flexibilitat conformacional, es desenvolupen nous lligands amb alta afinitat pels I₂-IR. Mitjançant la introducció d'un doble enllaç en la cadena alquílica, es dona lloc a la **tracizolina** (pK_i I₂-IR = 8.74; pK_i α_2 AR = 4.85), i gràcies a la conversió en naftalè de l'anell de benzè i la cadena alquílica, a la **benazolina** (pK_i I₂-IR = 9.07; pK_i α_2 AR = 4.80).⁷³ En el cas de la **benazolina**, tot i presentar una afinitat pels I₂-IR 18621 vegades superior als α_2 AR, disposava d'un efecte hipertensor associat a l'antagonisme dels I₁-IR.⁷⁴ Per tal de disminuir la seva afinitat per aquests receptors es van desenvolupar **BU224** (pK_i I₂-IR = 8.70; I₂/I₁ = 832) i **BU226** (pK_i I₂-IR = 8.85; I₂/I₁ = 380), provinents de la substitució isostèrica de l'anell de naftalè per una quinolina i una isoquinolina respectivament.⁶⁶

Analitzant les estructures dels lligands I₂-IR descrits fins al moment, i tenint en compte els lligands en fase clínica [¹¹C]**BU99008** i **CR4056**, en pràcticament tots els casos es presenta el grup 2-imidazolina. Aquest patró estructural només varia lleugerament en els compostos **CR4056** i en **LSL60101**, on es canvia per un anell d'imidazol. Així doncs, és necessari el desenvolupament de nous lligands que abandonin aquesta tendència estructural.

Nous lligands I₂-IR

El grup de la professora Carmen Escolano ha realitzat una extensa investigació en el camp dels lligands I₂-IR i ha aconseguit sintetitzar diferents famílies de compostos amb una excel·lent afinitat pels receptors.

- (2-imidazolin-4-il)fosfonats: es tracta d'una família que conserva la 2-imidazolina, però es troba diversament substituïda en les posicions 1, 4 i 5, destacant la presència del grup fosfonat en la posició 4. Aquesta estructura s'aconsegueix

mitjançant una reacció multicomponent.⁷⁵ En concret, s'han realitzat nombrosos estudis amb el lligand **MCR5** (pK_i I₂-IR = 9.42; I_2/α_2 = 457), gràcies a la seva elevada afinitat i selectivitat amb els I₂-IR.⁵⁹

- α -iminofosfonats bicíclics: Aquesta família es sintetitzada mitjançant una reacció de cicloaddició [3+2] i abandona totalment l'estructura de 2-imidazolina. Aquesta és substituïda per un bicicle, un dels quals és un anell de pirrolina. El derivat més destacat és el **B06** (pK_i I₂-IR = 8.56; I_2/α_2 = 195).⁷²
- (3-fenilcarbamoil-3,4-dihidro-2H-pirrol-2-il)fosfonats: Aquesta família es desenvolupa a partir de l'exploració de la reactivitat dels α -iminofosfonats bicíclics, en la qual es realitza una obertura de la imida, deixant l'anell de pirrolina. En destaca el **PIP01** (pK_i I₂-IR = 9.98; I_2/α_2 = 3) amb una elevada afinitat però poca selectivitat davant els α_2 AR.⁷⁶

4.2.3 – Lligands dels I₃-IR

Derivats de l'efaroxan

L'efaroxan, tot i considerar-se un lligand I₁-IR, també s'uneix als I₃-IR desenvolupant l'activitat secretora d'insulina. A partir d'aquí, s'ha intentat sintetitzar anàlegs de l'efaroxan per potenciar aquest efecte i augmentar la selectivitat pels receptors. Un dels derivats sintetitzats és el **KU14R** (Figura 7), que prové de la substitució de l'anell d'imidazolina de l'efaroxan per un d'imidazole. No obstant això, pel que refereix a l'activitat d'aquest anàleg, sembla actuar com un agonista parcial, però existeixen molts dubtes sobre el seu comportament. Tot i això, a causa de la manca d'un antagonista pur dels I₃-IR, **KU14R** és usat per confirmar la interacció d'altres lligands amb els receptors.⁷⁷

Altres compostos

Els compostos següents han demostrat unir-se als I₃-IR i induir la secreció d'insulina, la seva interacció ha estat confirmada mitjançant l'administració de **KU14R**. Malgrat això, no presenten selectivitat pels receptors, ja que també s'uneixen a altres IR. En els darrers estudis sobre els receptors, es demostra l'efecte insulínotrop de tres compostos similars a la guanidina, representats a la Figura 7, l'**al·lantoïna**⁷⁸, la **canavanina**⁶³ i l'**agmatina**, en el cas de l'últim, també s'ha demostrat la seva capacitat de prevenir el dany pancreàtic.⁶⁴

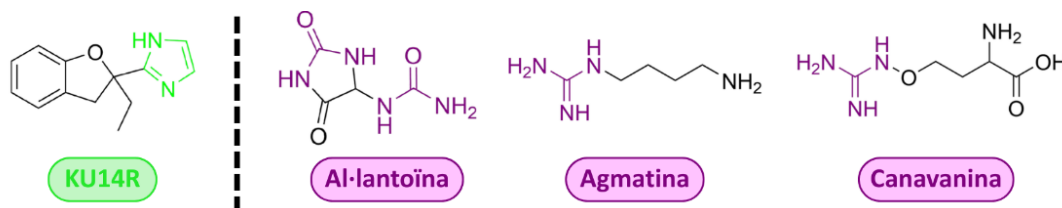


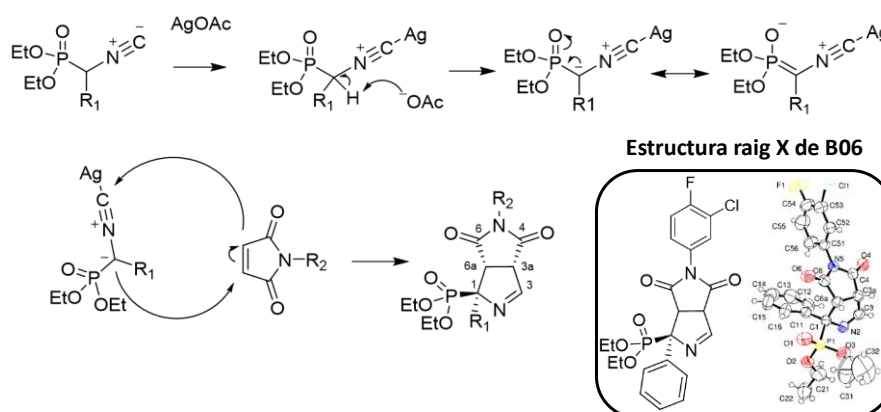
Figura 7: Estructura lligands I₃-IR. En verd s'indica l'anell imidazole i en lila l'estructura de guanidina.

En resum, el coneixement sobre els IR creix exponencialment amb el desenvolupament de nous lligands, ja que la caracterització farmacològica dels efectes ocasionats per la seva administració és la principal eina disponible per a l'estudi dels receptors. En aquesta metodologia d'estudi és totalment necessari l'ús d'antagonistes, perquè permet confirmar la relació entre el receptor i l'efecte fisiològic produït per l'administració del lligand. Tant els I₁-IR com els I₂-IR presenten un gran nombre de lligands amb alta afinitat i selectivitat que han permès l'obtenció d'un gran coneixement, no obstant això, el camí que queda per recórrer en el seu estudi és molt llarg, en especial en els I₂-IR, on a causa de la seva heterogeneïtat, es requereixen lligands selectius que permetin l'estudi dels diferents subtipus de receptors. Pel que fa als I₃-IR, la manca de lligands selectius, en concret d'antagonistes purs, en dificulta l'estudi i pot explicar els pocs avenços obtinguts en aquest camp.

4.3 - 3a Part: Síntesi de nous lligands dels I₂-IR

4.3.1 - α -Iminofosfonats bicíclics

Gràcies als estudis recents del grup de la professora Carmen Escolano, s'ha desenvolupat un protocol sintètic per accedir a una nova família de compostos α -iminofosfonats bicíclics. En concret, el lligand anomenat **B06 (Esquema 1)** presenta una bona afinitat i selectivitat pels I₂-IR.



Esquema 1: Mecanisme de reacció de la cicloadició [3+2] que permet la formació selectiva del diastereòmer indicat + estructura de raig X del compost B06.^{72,79}

La reacció es tracta d'una cicloadició [3+2] diastereoselectiva entre dietil isocianometilfosfonats i maleïmides *N*-substituídes, té lloc mitjançant la catàlisi d'acetat de plata, on el catió es complexa amb el carboni del grup isonitril augmentant l'acidesa del protó en α . D'aquesta manera, l'ió acetat capta el protó i crea el centre nucleòfil, que reacciona amb la maleïmida tal i com es representa en l'**Esquema 1**. Donades aquestes condicions, només es genera el diastereòmer amb la disposició *trans* entre el H-1 i H-3a, tal i com s'ha determinat per l'estudi de raigs X d'un cristall d'B06 del Prof. Elies Molins.⁷⁹

Els assaigs de competitivitat realitzats en la Universitat del País Basc pel grup del Prof. Luis F. Callado (**Taula 2**), mostren la gran afinitat i selectivitat, davant dels α_2 AR, del compost **B06** sobre els I₂-IR. A més a més, les prediccions *In silico*, assaigs *In vitro* i experiments *In vivo* han permès demostrar que el compost presenta unes propietats ADME i *druglike* prometedores, i una capacitat òptima per travessar la barrera hematoencefàlica.⁸⁰ Pel que fa a les propietats farmacològiques, l'experimentació amb models de ratolins de la MA, com els 5xFAD i SAMP8, duta a terme pel grup de la Professora M.Pallàs i el Dr. C.Griñán, ha demostrat un paper beneficiós en el tractament de la MA.⁵⁶

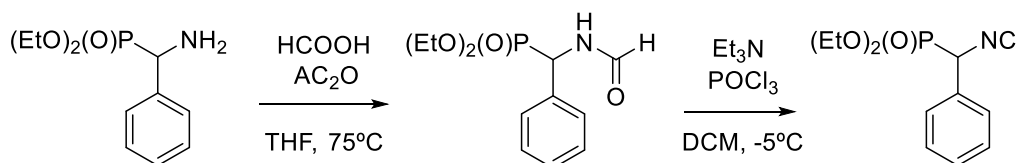
Compost	[³ H]-2-BFI I ₂ pK _i	[³ H]-RX821002 α_2 pK _i	Selectivitat I ₂ -IR/ α_2 -AR
CR4056	7.72 ± 0.31	2.65 ± 1.24	117490
Tracizolina	8.48 ± 0.51	4.33 ± 0.22	14125
2-BFI	9.87 ± 0.33	6.64 ± 0.38	1698
LSL60101	9.03 ± 0.21	5.17 ± 1.32	7244
B06	8.61 ± 0.28	6.27 ± 0.56	219

Taula 2: Resultats dels assaigs de competició en membranes cerebrals humanes realitzats en la Universitat del País Basc. Extret de "I₂-IR and α_2 -AR Binding Affinities (pK_i) of CR4056, Tracizoline, LSL60101 and 9d in Post-mortem Human Brain Cortical Membranes".⁷²

4.3.2 - Síntesi dels reactius

Els compostos α -iminofosfonats bicíclics sintetitzats es poden classificar en funció del substituent en α del reactiu isocianofosfonat: en primer lloc, si es tracta d'un àtom d'hidrogen i, en segon lloc, d'un grup fenil. Ambdós grups se sintetitzen mitjançant el mateix esquema, però la principal diferència es troba en la preparació dels reactius.

- α -iminofosfonats bicíclics substituïts per un àtom d'hidrogen a la posició α : es preparen a partir de la maleimida N-substituïda i el reactiu dietil (isocianometil)fosfonat o PhosMic, els quals són comercials.
- α -iminofosfonats substituïts per un anell de fenil: se sintetitzen a partir de la maleimida N-substituïda i el reactiu dietil (isociano(fenil)metil)fosfonat, el qual parteix de la conversió del compost comercial dietil (amino(fenil)metil)fosfonat al compost dietil (formamido(fenil)metil)fosfonat, el qual, posteriorment, es deshidrata per donar lloc al reactiu dietil (isociano(fenil)metil)fosfonat. El procediment es pot observar en l'**Esquema 2**.



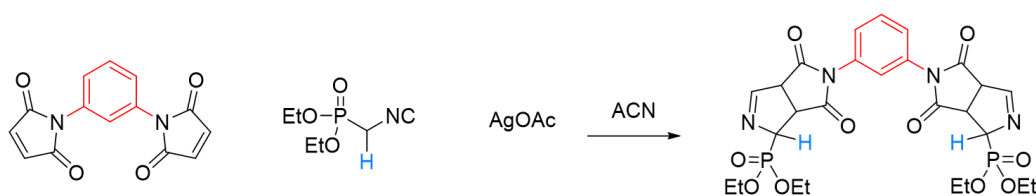
Esquema 2: Síntesi del reactiu dietil (isociano(fenil)metil)fosfonat.

4.3.3 - Síntesi de bis α -iminofosfonats bicíclics

A conseqüència dels bons resultats farmacològics obtinguts pel compost **B06**, es decideix continuar explorant les possibilitats estructurals de la família. Així doncs, aplicant els principis de la duplicació molecular⁸¹ es planteja la síntesi de bis α -iminofosfonats bicíclics mitjançant la primera doble-cicloaddició [3+2] entre *bis*-maleïmides i derivats isocianofosfonats α -substituïts.

La reacció parteix del protocol sintètic de la cicloaddició [3+2], el qual no estava optimitzat per realitzar la doble cicloaddició [3+2]. Així doncs, per sintetitzar el primer derivat fenil *bis*-iminofosfonat bicíclic (**Figura 8**), obtingut de la reacció entre la 1,1'-(1,3-phenylene)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) i PhosMic, es parteix de les condicions usades en la síntesi d' α -iminofosfonats bicíclics, en les que s'utilitzen: 6% - 10% d'acetat de plata (AgOAc), 1-1,5 mmol de maleïmida, 1 mmol de reactiu PhosMic i 6mL d'acetonitril (ACN) com a dissolvent, es barreja a temperatura ambient i es deixa reaccionar tota la nit.⁷²

Així doncs, per a la doble cicloaddició [3+2] una mescla d'1 equivalent (eq) de 1,1'-(1,3-fenilè)bis(1H-pirrol-2,5-diona), 2 eq de PhosMic i 8% de AgOAc, en 4,5 ml d'ACN es barreja durant 24 hores a temperatura ambient. Seguidament, es purifica el cru de la reacció mitjançant cromatogràfica en columna fent servir DCM/MeOH. Finalment, s'obté el compost pur amb un 27% de rendiment (**Figura 8, entrada 1**).



Entrada	PhosMic (eq)	Temperatura (°C)	Temps	Rendiment (%)
1	2	T ^a ambient	24h	27
2	2	80	48h	27
3	2	MW, 40	10min	36
4	2	MW, 80	10min	27
5	2	MW, 40	30min	47
6	3	MW, 40	30min	35

Figura 8: Diferents condicions provades en l'optimització de la reacció de doble cicloaddició [3+2].

Tot i aconseguir un protocol funcional, el rendiment obtingut de la reacció és baix, per tant, s'opta per repetir la reacció amb diferents condicions, duent a terme un procés d'optimització.

En les proves realitzades tant a temperatura ambient (**Figura 8, entrada 1**) com a temperatura de reflux del dissolvent (**entrada 2**) es continua sense progressar. D'aquesta

manera, es decideix usar un reactor microones on s'observa una millora considerable. Finalment, s'obté un rendiment del 47% utilitzant el reactor microones i 2 eq de PhosMic durant 30 minuts a 40 °C (**entrada 5**). Curiosament, l'augment de la temperatura a 80 °C (**entrada 4**) i l'ús de 3 equivalents de PhosMic (**entrada 6**) suposen un menor rendiment. Per tant, s'estableixen aquestes condicions per a la síntesi de la resta de compostos doble α -iminofosfonats bicíclics, en les que l'ús del reactor microones permet seguir els principis de la química verda en assolir un rendiment major, en un menor temps.

Aquestes condicions han permès contribuir en la síntesi de deu compostos doble α -iminofosfonats bicíclics durant l'estada en el laboratori de Química Farmacèutica de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'alimentació. Els compostos provenen de la combinació entre diferents reactius *bis*-maleimida units per diferents *linkers*, amb els reactius PhosMic o dietil (isociano(fenil)metil)fosfonat. A continuació es presenten els compostos sintetitzats i els rendiments assolits en la **Figura 9**.

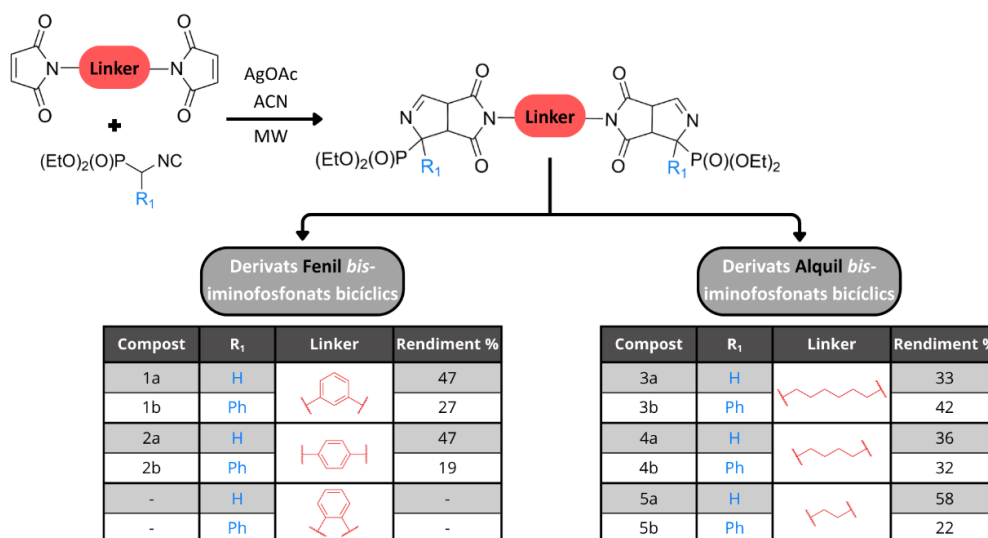


Figura 9: Compostos sintetitzats en el laboratori de química farmacèutica i els rendiments obtinguts de cada reacció.

No obstant això, com mostra la **Figura 9**, no s'ha pogut aïllar de forma pura cap dels compostos que provinguin de l'1,1'-(1,2-phenylene)bis(1H-pyrrole-2,5-dione), a conseqüència d'una escassa formació de producte. La causa més probable és l'impediment estèric que suposa el sistema aromàtic en posició *orto* que dificulta l'aproximació dels reactius i, per tant, la seva reacció. D'aquesta manera, en un treball futur, és necessari la cerca d'altres condicions de reacció que afavoreixin aquesta síntesi solucionant el problema generat per l'impediment estèric. Finalment, els compostos sintetitzats seran avaluats en assaigs de competitivitat per determinar la seva afinitat i selectivitat amb els I₂-IR, i així comprovar el seu potencial per esdevenir lligands dels receptors.

5- Conclusions

La realització de cada part del treball ha conclòs amb l'assoliment del seu propi objectiu plantejat a l'inici del treball:

En la 1a Part: S'ha dut a terme una cerca sobre els tres tipus de IR, mitjançant la qual s'han aportat evidències que justifiquen el seu potencial per esdevenir futures dianes farmacològiques en el control de determinades patologies. Com ara:

- En els I₁-IR: Malalties cardiovasculars, la síndrome metabòlica, esteatosi hepàtica i insuficiència renal.
- En els I₂-IR: Tractament del dolor, malalties neurodegeneratives i trastorns depressius.
- En els I₃-IR: Control de la glucèmia i protecció enfront del dany pancreàtic.

En la 2a Part: S'han explorat els diferents lligands disponibles de cada tipus d'IR i s'ha observat la relació que manté el seu desenvolupament amb els coneixements obtinguts dels receptors. En concret, en el cas dels I₂-IR, a causa de la seva gran heterogeneïtat, la investigació de nous lligands selectius esdevé crucial per al seu estudi i comprensió.

En la 3a Part: S'ha aconseguit establir un protocol sintètic per a la síntesi de doble α -iminofosfonats bicíclics, el qual ha permès l'obtenció de 10 compostos, que posteriorment, seran avaluats per definir les seves propietats farmacològiques. Com a treball futur, es proposa cercar les condicions adequades per a la síntesi dels dos compostos que no s'han pogut elaborar.

Adicionalment, la realització del treball ha permès la millora de les habilitats per consultar fons bibliogràfic i resumir informació, les quals podran ser utilitzades en futurs treballs. A més a més, l'estada en el laboratori de química farmacèutica ha augmentat la capacitat de participació en el treball en grup.

En conclusió, després de l'elaboració del present treball es pot afirmar l'assoliment del seu objectiu principal de realitzar un estudi bibliogràfic sobre els IR i els seus lligands.

6- Bibliografia

- (1) Schuhmacher, A.; Hinder, M.; Brief, E.; Gassmann, O.; Hartl, D. Benchmarking R&D Success Rates of Leading Pharmaceutical Companies: An Empirical Analysis of FDA Approvals (2006–2022). *Drug Discov. Today* **2025**, 30 (2), 104291. DOI: 10.1016/j.drudis.2025.104291
- (2) Roland, A.; Fox, W.; Baker, A. Efficiency, Effectiveness and Productivity in Pharmaceutical R&D. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2024**, 23 (9), 656–657. DOI: 10.1038/d41573-024-00068-6
- (3) Sun, D.; Gao, W.; Hu, H.; Zhou, S. Why 90% of Clinical Drug Development Fails and How to Improve It? *Acta Pharm. Sin. B.* **2022**, 12 (7), 3049–3062. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.02.002
- (4) Xia, D.; Liu, B.; Xu, X.; Ding, Y.; Zheng, Q. Drug Target Discovery by Magnetic Nanoparticles Coupled Mass Spectrometry. *J. Pharm. Anal.* **2021**, 11 (1), 122–127. DOI: 10.1016/j.jpha.2020.02.002
- (5) Stähle, H. A Historical Perspective: Development of Clonidine. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* **2000**, 14 (2), 237–246. DOI: 10.1053/bean.2000.0079
- (6) Drew, G. M.; Gower, A. J.; Marriott, A. S. α_2 -Adrenoceptors Mediate Clonidine-Induced Sedation in the Rat. *Br. J. Pharmacol.* **1979**, 67 (1), 133–141
- (7) Bousquet, P.; Hudson, A.; García-Sevilla, J. A.; Li, J.-X. Imidazoline Receptor System: The Past, the Present, and the Future. *Pharmacol. Rev.* **2020**, 72 (1), 50–79. DOI: 10.1124/pr.118.016311
- (8) Bousquet, P.; Feldman, J.; Schwartz, J. Central Cardiovascular Effects of Alpha Adrenergic Drugs: Differences between Catecholamines and Imidazolines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, 230 (1), 232–236
- (9) Aparoy, P.; Reddy, K. K.; Reddanna, P. Structure and Ligand Based Drug Design Strategies in the Development of Novel 5- LOX Inhibitors. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19 (22), 3763–3778. DOI: 10.2174/092986712801661112
- (10) Li, J.-X. Imidazoline I₂ Receptors: An Update. *Pharmacol. Ther.* **2017**, 178, 48–56. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.03.009
- (11) Sun, Z.; Chang, C.-H.; Ernsberger, P. Identification of IRAS/Nischarin as an I₁-Imidazoline Receptor in PC12 Rat Pheochromocytoma Cells. *J. Neurochem.* **2007**, 101 (1), 99–108. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04413.x
- (12) Arnoux, A.; Aubertin, G.; Da Silva, S.; Weiss, M.; Bousquet, P.; Monassier, L.; Niederhoffer, N. Nischarin Is Not the Functional I₁ Imidazoline Receptor Involved in Blood Pressure Regulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2022**, 79 (2), 229–234. DOI: 10.1097/FJC.0000000000001128
- (13) Nascimento, A. R.; Gomes, F.; Machado, M. V.; Gonçalves-de-Albuquerque, C.; Bousquet, P.; Tibiriçá, E. I₁-Imidazoline Receptor-Mediated Cardiovascular and Metabolic Effects in High-Fat Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Auton. Neurosci.* **2019**, 217, 18–25. DOI: 10.1016/j.autneu.2018.12.007
- (14) Yang, P.-S.; Wu, H.-T.; Chung, H.-H.; Chen, C.-T.; Chi, C.-W.; Yeh, C.-H.; Cheng, J.-T. Rilmenidine Improves Hepatic Steatosis through P38-Dependent Pathway to Higher the Expression of Farnesoid X Receptor. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2012**, 385 (1), 51–56. DOI: 10.1007/s00210-011-0691-1
- (15) Weiss, M.; Bouchoucha, S.; Aiad, F.; Ayme-Dietrich, E.; Dali-Youcef, N.; Bousquet, P.; Grenay, H.; Niederhoffer, N. Imidazoline-like Drugs Improve Insulin Sensitivity through Peripheral Stimulation of Adiponectin and AMPK Pathways in a Rat Model

- of Glucose Intolerance. *Am. J. Physiol.* **2015**, *309* (2), E95–E104. DOI: 10.1152/ajpendo.00021.2015
- (16) Micheli, L.; Di Cesare Mannelli, L.; Del Bello, F.; Giannella, M.; Piergentili, A.; Quaglia, W.; Carrino, D.; Pacini, A.; Ghelardini, C. The Use of the Selective Imidazoline I₁ Receptor Agonist Carbophenylene as a Strategy for Neuropathic Pain Relief: Preclinical Evaluation in a Mouse Model of Oxaliplatin-Induced Neurotoxicity. *Neurotherapeutics* **2020**, *17* (3), 1005–1015. DOI: 10.1007/s13311-020-00873-y
- (17) Elkomy, N. M. I. M.; Ibrahim, I. A. A. E. -H.; El-Fayoumi, H. M.; Elshazly, S. M. Effect of Imidazoline-1 Receptor Agonists on Renal Dysfunction in Rats Associated with Chronic, Sequential Fructose and Ethanol Administration. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2020**, *47* (4), 609–619. DOI: 10.1111/1440-1681.13232
- (18) Darabont, R. O.; Gheorghe-Fronea, O. F.; Bumbacea, R.; Vornicu, R.; Andrei, C. L. An Actual Perspective on I₁-Imidazoline Agonists in Blood Pressure Control. Results of a Multicentric Observational Prospective Study. *Maedica - J. Clin. Med.* **2023**, *18* (4), 547–554. DOI: 10.26574/maedica.2023.18.4.547
- (19) Valensi, P.; Jambart, S. MARRIAGE: A Randomized Trial of Moxonidine Versus Ramipril or in Combination With Ramipril in Overweight Patients With Hypertension and Impaired Fasting Glucose or Diabetes Mellitus. Impact on Blood Pressure, Heart Rate and Metabolic Parameters. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **2024**, *29*, 1–14. DOI: 10.1177/10742484241258381
- (20) Ferreira, R. B.; De Oliveira, M. G.; Antunes, E.; Almeida, W. P.; Ibrahim, B. M.; Abdel-Rahman, A. A. New 2-Aminothiazoline Derivatives Lower Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) via I₁-Imidazoline and Alpha-2 Adrenergic Receptors Activation. *Eur. J. Pharmacol.* **2016**, *791*, 803–810. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.10.009
- (21) Mahmoudi, J.; Majdi, A.; Lattanzi, S.; Di Napoli, M.; Bershad, E. M.; Rodrigues, C. M. P.; Divani, A. A. Imidazoline Receptors Agonists for Managing Hypertension May Hold Promise for Treatment of Intracerebral Hemorrhage. *Curr. Mol. Med.* **2018**, *18* (4), 241–251. DOI: 10.2174/1566524018666180926163712
- (22) Yamanaka, H.; Hayashi, Y.; Iwasaki, M.; Kamibayashi, T.; Yamatodani, A.; Mashimo, T. Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling Pathway and Endogenous Nitric Oxide Are Needed for the Antiarrhythmic Effect of Centrally Administered Rilmenidine. *Eur. J. Pharmacol.* **2010**, *647* (1-3), 155–160. DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.08.035
- (23) Mukaddam-Daher, S. An “I” on Cardiac Hypertrophic Remodelling: Imidazoline Receptors and Heart Disease. *Can. J. Cardiol.* **2012**, *28* (5), 590–598. DOI: 10.1016/j.cjca.2012.02.007
- (24) Estado, V.; Nascimento, A.; Antunes, B.; Gomes, F.; Coelho, L.; Rangel, R.; Garzoni, L.; Daliry, A.; Bousquet, P.; Tibiriçá, E. Cerebral Microvascular Dysfunction and Inflammation Are Improved by Centrally Acting Antihypertensive Drugs in Metabolic Syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **2017**, *15* (1), 26–35. DOI: 10.1089/met.2016.0085
- (25) Alberti, K. G. M.; Zimmet, P.; Shaw, J. The Metabolic Syndrome—a New Worldwide Definition. *The Lancet* **2005**, *366* (9491), 1059–1062. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67402-8
- (26) Aubertin, G.; Weiss, M.; Traversi, F.; Benameur, D.; Choquet, P.; Dali-Youcef, N.; Pons, F.; Sigrist, S.; Grenay, H.; Monassier, L.; Bousquet, P.; Niederhoffer, N. Effects of

- Imidazoline-like Drugs on Liver and Adipose Tissues, and Their Role in Preventing Obesity and Associated Cardio-Metabolic Disorders. *Int. J. Obes.* **2019**, *43*, 2163–2175. DOI: 10.1038/s41366-019-0342-z
- (27) Zhang, W.; Li, X.; Liu, Y.; Chen, H.; Gong, J. Activation of Imidazoline I₁ Receptor by Moxonidine Regulates the Progression of Liver Fibrosis in the Nrf2-Dependent Pathway. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *90*, 821–834. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.04.025
- (28) Elkomy, N. M. I. M.; Ibrahim, I. A. A. E.-H.; Elshazly, S. M.; El-Fayoumi, H. M. Ameliorative Effects of Clonidine on Ethanol Induced Kidney Injury in Rats: Potential Role for Imidazoline-1 Receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *824*, 148–156. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.02.001
- (29) Mukaddam-Daher, S.; Gutkowska, J. Atrial Natriuretic Peptide Is Involved in Renal Actions of Moxonidine. *Hypertension* **2000**, *35* (6), 1215–1220. DOI: 10.1161/01.HYP.35.6.1215
- (30) Siemian, J. N.; Wang, K.; Zhang, Y.; Li, J. Mechanisms of Imidazoline I₂ Receptor Agonist-induced Antinociception in Rats: Involvement of Monoaminergic Neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175* (9), 1519–1534. DOI: 10.1111/bph.14161
- (31) Eglen, R. M.; Hudson, A. L.; Kendall, D. A.; Nutt, D. J.; Morgan, N. G.; Wilson, V. G.; Dillon, M. P. 'Seeing through a Glass Darkly': Casting Light on Imidazoline 'I' Sites. *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, *19* (9), 381–390. DOI: 10.1016/S0165-6147(98)01244-9
- (32) Kimura, A.; Tyacke, R. J.; Robinson, J. J.; Husbands, S. M.; Minchin, M. C. W.; Nutt, D. J.; Hudson, A. L. Identification of an Imidazoline Binding Protein: Creatine Kinase and an Imidazoline-2 Binding Site. *Brain Res.* **2009**, *1279*, 21–28. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.04.044
- (33) Li, J.-X.; Zhang, Y. Imidazoline I₂ Receptors: Target for New Analgesics? *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *658* (2–3), 49–56. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.02.038.
- (34) Ruiz, J.; Martín, I.; Callado, L. F.; Meana, J. J.; Barturen, F.; García-Sevilla, J. A. Non-Adrenoceptor [³H]Idazoxan Binding Sites (I₂-Imidazoline Sites) Are Increased in Postmortem Brain from Patients with Alzheimer's Disease. *Neurosci. Lett.* **1993**, *160* (1), 109–112. DOI: 10.1016/0304-3940(93)90925-B
- (35) Wilson, H.; Dervenoulas, G.; Pagano, G.; Tyacke, R. J.; Polychronis, S.; Myers, J.; Gunn, R. N.; Rabiner, E. A.; Nutt, D.; Politis, M. Imidazoline 2 Binding Sites Reflecting Astroglia Pathology in Parkinson's Disease: An in vivo ¹¹C-BU99008 PET Study. *Brain* **2019**, *142* (10), 3116–3128. DOI: 10.1093/brain/awz260.
- (36) Callado, L. F. Imidazoline I₂ Receptor Density Increases with the Malignancy of Human Gliomas. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2004**, *75* (5), 785–787. DOI: 10.1136/jnnp.2003.020446
- (37) Tonello, R.; Villarinho, J. G.; da Silva Sant'Anna, G.; Tamiozzo, L.; Machado, P.; Trevisan, G.; Pinto Martins, M. A.; Ferreira, J.; Rubin, M. A. The Potential Antidepressant-like Effect of Imidazoline I₂ Ligand 2-BFI in Mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2012**, *37* (1), 15–21. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2011.11.005
- (38) Hernández-Hernández, E.; García-Fuster, M. J. Evaluating the Effects of 2-BFI and Tracizoline, Two Potent I₂-Imidazoline Receptor Agonists, on Cognitive Performance

- and Affect in Middle-Aged Rats. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2021**, *394* (5), 989–996. DOI: 10.1007/s00210-020-02042-6
- (39) European Pain Federation. *What is the definition of pain?*. <https://europeanpainfederation.eu/what-is-pain/> (accessed 04/02/2025).
- (40) Li, J.-X.; Thorn, D. A.; Qiu, Y.; Peng, B.-W.; Zhang, Y. Antihyperalgesic Effects of Imidazoline I₂ Receptor Ligands in Rat Models of Inflammatory and Neuropathic Pain. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171* (6), 1580–1590. DOI: 10.1111/bph.12555
- (41) Siemian, J. N.; Woodhouse, K.; Liu, D. H.; Zhang, Y.; Li, J.-X. The Imidazoline I₂ Receptor Agonist 2-BFI Reduces Abuse-Related Effects of Morphine: Self-Administration and Drug Discrimination. *Psychopharmacology (Berl.)* **2024**, *241* (3), 479–487. DOI: 10.1007/s00213-023-06524-2
- (42) Sampson, C.; Zhang, Y.; Bello, F. D.; Li, J.-X. Effects of Imidazoline I₂ Receptor Ligands on Acute Nociception in Rats. *NeuroReport* **2012**, *23* (2), 73–77. DOI: 10.1097/WNR.0b013e32834e7db3
- (43) Li, J.-X.; Zhang, Y.; Winter, J. C. Morphine-Induced Antinociception in the Rat: Supra-Additive Interactions with Imidazoline I₂ Receptor Ligands. *Eur. J. Pharmacol.* **2011**, *669* (1-3), 59–65. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.07.041
- (44) Rovati, L. C.; Brambilla, N.; Blicharski, T.; Connell, J.; Vitalini, C.; Bonazzi, A.; Giacobelli, G.; Girolami, F.; D'Amato, M. Efficacy and Safety of the First-in-Class Imidazoline-2 Receptor Ligand CR4056 in Pain from Knee Osteoarthritis and Disease Phenotypes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Trial. *Osteoarthritis Cartilage* **2020**, *28* (1), 22–30. DOI: 10.1016/j.joca.2019.09.002
- (45) Sala, E.; Ferrari, F.; Lanza, M.; Milia, C.; Sabatini, C.; Bonazzi, A.; Comi, E.; Borsi Franchini, M.; Caselli, G.; Rovati, L. C. Improved Efficacy, Tolerance, Safety, and Abuse Liability Profile of the Combination of CR4056 and Morphine over Morphine Alone in Rodent Models. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177* (14), 3291–3308. DOI: 10.1111/bph.15049
- (46) Meregalli, C.; Ceresa, C.; Canta, A.; Carozzi, V. A.; Chiorazzi, A.; Sala, B.; Oggioni, N.; Lanza, M.; Letari, O.; Ferrari, F.; Avezza, F.; Marmioli, P.; Caselli, G.; Cavaletti, G. CR4056, a New Analgesic I₂ Ligand, Is Highly Effective against Bortezomib-Induced Painful Neuropathy in Rats. *J. Pain Res.* **2012**, *5*, 151–167. DOI: 10.2147/JPR.S32122
- (47) Meana, J. J.; Barturen, F.; Martin, I.; García-Sevilla, J. A. Evidence of Increased Non-Adrenoceptor [³H]Idazoxan Binding Sites in the Frontal Cortex of Depressed Suicide Victims. *Biol. Psychiatry* **1993**, *34* (7), 498–501. DOI: 10.1016/0006-3223(93)90243-7
- (48) Gargalidis-Moudanos, C.; Pizzinat, N.; Javoy-Agid, F.; Remaury, A.; Parini, A. I₂-Imidazoline Binding Sites and Monoamine Oxidase Activity in Human Postmortem Brain from Patients with Parkinson's Disease. *Neurochem. Int.* **1996**, *30* (1), 31–36. DOI: 10.1016/S0197-0186(96)00035-6
- (49) Tyacke, R. J.; Myers, J. F. M.; Venkataraman, A.; Mick, I.; Turton, S.; Passchier, J.; Husbands, S. M.; Rabiner, E. A.; Gunn, R. N.; Murphy, P. S.; Parker, C. A.; Nutt, D. J. Evaluation of ¹¹C-BU99008, a PET Ligand for the Imidazoline₂ Binding Site in Human Brain. *J. Nucl. Med.* **2018**, *59* (10), 1597–1602. DOI: 10.2967/jnumed.118.208009
- (50) Kumar, A.; Koistinen, N. A.; Malarte, M.-L.; Nennesmo, I.; Ingelsson, M.; Ghetti, B.; Lemoine, L.; Nordberg, A. Astroglial Tracer BU99008 Detects Multiple Binding Sites in Alzheimer's Disease Brain. *Mol. Psychiatry* **2021**, *26* (10), 5833–5847. DOI: 10.1038/s41380-021-01101-5

- (51) World Health Organization. *Dementia*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (accedit 2025-02-11).
- (52) Hou, Y.; Dan, X.; Babbar, M.; Wei, Y.; Hasselbalch, S. G.; Croteau, D. L.; Bohr, V. A. Ageing as a Risk Factor for Neurodegenerative Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15* (10), 565–581. DOI: 10.1038/s41582-019-0244-7
- (53) 2023 Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimers Dement.* **2023**, *19* (4), 1598–1695. DOI: 10.1002/alz.13016
- (54) Kotagale, N.; Dixit, M.; Garmelwar, H.; Bhondekar, S.; Umekar, M.; Taksande, B. Agmatine Reverses Memory Deficits Induced by A β _{1–42} Peptide in Mice: A Key Role of Imidazoline Receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2020**, *196*, 172976. DOI: 10.1016/j.pbb.2020.172976
- (55) Griñán-Ferré, C.; Vasilopoulou, F.; Abás, S.; Rodríguez-Arévalo, S.; Bagán, A.; Sureda, F. X.; Pérez, B.; Callado, L. F.; García-Sevilla, J. A.; García-Fuster, M. J.; Escolano, C.; Pallàs, M. Behavioral and Cognitive Improvement Induced by Novel Imidazoline I₂ Receptor Ligands in Female SAMP8 Mice. *Neurotherapeutics* **2019**, *16* (2), 416–431. DOI: 10.1007/s13311-018-00681-5
- (56) Vasilopoulou, F.; Griñán-Ferré, C.; Rodríguez-Arévalo, S.; Bagán, A.; Abás, S.; Escolano, C.; Pallàs, M. I₂ Imidazoline Receptor Modulation Protects Aged SAMP8 Mice against Cognitive Decline by Suppressing the Calcineurin Pathway. *GeroScience* **2021**, *43* (2), 965–983. DOI: 10.1007/s11357-020-00281-2
- (57) Siemian, J. N.; Shang, L.; Seaman, R. W.; Zhu, Q.; Zhang, Y.; Li, J.-X. Effects of Imidazoline I₂ Receptor Agonists on Reserpine-Induced Hyperalgesia and Depressive-like Behavior in Rats. *Behav. Pharmacol.* **2019**, *30* (5), 429–434. DOI: 10.1097/FBP.0000000000000454
- (58) Thorn, D. A.; An, X.-F.; Zhang, Y.; Pignini, M.; Li, J.-X. Characterization of the Hypothermic Effects of Imidazoline I₂ Receptor Agonists in Rats. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, *166* (6), 1936–1945. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01894.x
- (59) Abás, S.; Erdozain, A. M.; Keller, B.; Rodríguez-Arévalo, S.; Callado, L. F.; García-Sevilla, J. A.; Escolano, C. Neuroprotective Effects of a Structurally New Family of High Affinity Imidazoline I₂ Receptor Ligands. *ACS Chem. Neurosci.* **2017**, *8* (4), 737–742. DOI: 10.1021/acchemneuro.6b00426
- (60) Sánchez-Blázquez, P.; Boronat, M. A.; Olmos, G.; García-Sevilla, J. A.; Garzón, J. Activation of I₂-imidazoline Receptors Enhances Supraspinal Morphine Analgesia in Mice: A Model to Detect Agonist and Antagonist Activities at These Receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *130* (1), 146–152. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703294
- (61) Vasilopoulou, F.; Rodríguez-Arévalo, S.; Bagán, A.; Escolano, C.; Griñán-Ferré, C.; Pallàs, M. Disease-modifying Treatment with I₂ Imidazoline Receptor Ligand LSL60101 in an Alzheimer's Disease Mouse Model: A Comparative Study with Donepezil. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178* (15), 3017–3033. DOI: 10.1111/bph.15478
- (62) Hernández-Hernández, E.; García-Sevilla, J. A.; García-Fuster, M. J. Exploring the Antidepressant-like Potential of the Selective I₂-Imidazoline Receptor Ligand LSL 60101 in Adult Male Rats. *Pharmacol. Rep.* **2021**, *73* (1), 288–295. DOI: 10.1007/s43440-020-00148-5
- (63) Yang, T.; Niu, H.; Chen, L.; Ku, P.; Lin, K.; Cheng, J. Canavanine Induces Insulin Release via Activation of Imidazoline I₃ Receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2015**, *42* (3), 263–268. DOI: 10.1111/1440-1681.12348

- (64) Li, Y.; Cheng, K.; Asakawa, A.; Amitani, H.; Takimoto, Y.; Runtuwene, J.; Inui, A. Activation of imidazoline-I₃ Receptors Ameliorates Pancreatic Damage. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2015**, *42* (9), 964–971. DOI: 10.1111/1440-1681.12441
- (65) Gasparik, V.; Greney, H.; Schann, S.; Feldman, J.; Fellmann, L.; Ehrhardt, J.-D.; Bousquet, P. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Aryliminopyrrolidines as Selective Ligands for I₁ Imidazoline Receptors: Discovery of New Sympatho-Inhibitory Hypotensive Agents with Potential Beneficial Effects in Metabolic Syndrome. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (2), 878–887. DOI: 10.1021/jm501456p
- (66) Dardonville, C.; Rozas, I. Imidazoline Binding Sites and Their Ligands: An Overview of the Different Chemical Structures. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24* (5), 639–661. DOI: 10.1002/med.20007
- (67) Schann, S.; Greney, H.; Gasparik, V.; Dontenwill, M.; Rascente, C.; Lacroix, G.; Monassier, L.; Bruban, V.; Feldman, J.; Ehrhardt, J.-D.; Bousquet, P. Methylation of Imidazoline Related Compounds Leads to Loss of α_2 -Adrenoceptor Affinity. Synthesis and Biological Evaluation of Selective I₁ Imidazoline Receptor Ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (15), 4710–4715. DOI: 10.1016/j.bmc.2012.06.008
- (68) Greney, H.; Urosevic, D.; Schann, S.; Dupuy, L.; Bruban, V.; Ehrhardt, J.-D.; Bousquet, P.; Dontenwill, M. [¹²⁵I]2-(2-Chloro-4-Iodo-Phenylamino)-5-Methyl-Pyrroline (LNP 911), a High-Affinity Radioligand Selective for I₁ Imidazoline Receptors. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62* (1), 181–191. DOI: 10.1124/mol.62.1.181
- (69) Dragan, U.; Stephan, S.; Jean-Daniel, E.; Pascal, B.; Hugues, G. LNP 906, the First High-affinity Photoaffinity Ligand Selective for I₁ Imidazoline Receptors. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142* (3), 609–617. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705784
- (70) Gentili, F.; Bousquet, P.; Brasili, L.; Dontenwill, M.; Feldman, J.; Ghelfi, F.; Giannella, M.; Piergentili, A.; Quaglia, W.; Pignini, M. Imidazoline Binding Sites (IBS) Profile Modulation: Key Role of the Bridge in Determining I₁-IBS or I₂-IBS Selectivity within a Series of 2-Phenoxymethylimidazoline Analogues. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (11), 2169–2176. DOI: 10.1021/jm021113r
- (71) Hudson, A. L.; Chapleo, C. B.; Lewis, J. W.; Husbands, S.; Grivas, K.; Mallard, N. J.; Nutt, D. J. Identification of Ligands Selective for Central I₂-Imidazoline Binding Sites. *Neurochem. Int.* **1997**, *30* (1), 47–53. DOI: 10.1016/S0197-0186(96)00037-X
- (72) Abás, S.; Rodríguez-Arévalo, S.; Bagán, A.; Griñán-Ferré, C.; Vasilopoulou, F.; Brocos-Mosquera, I.; Muguruza, C.; Pérez, B.; Molins, E.; Luque, F. J.; Pérez-Lozano, P.; De Jonghe, S.; Daelemans, D.; Naesens, L.; Brea, J.; Loza, M. I.; Hernández-Hernández, E.; García-Sevilla, J. A.; García-Fuster, M. J.; Radan, M.; Djikic, T.; Nikolic, K.; Pallàs, M.; Callado, L. F.; Escolano, C. Bicyclic α -Iminophosphonates as High Affinity Imidazoline I₂ Receptor Ligands for Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (7), 3610–3633. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b02080
- (73) Pignini, M.; Bousquet, P.; Carotti, A.; Dontenwill, M.; Giannella, M.; Moriconi, R.; Piergentili, A.; Quaglia, W.; Tayebati, S. K.; Brasili, L. Imidazoline Receptors: Qualitative Structure-Activity Relationships and Discovery of Tracizoline and Benazoline. Two Ligands with High Affinity and Unprecedented Selectivity. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5* (5), 833–841. DOI: 10.1016/S0968-0896(97)00009-6
- (74) Bruban, V.; Feldman, J.; Dontenwill, M.; Greney, H.; Brasili, L.; Giannella, M.; Pignini, M.; Bousquet, P. An Unexpected Central Hypertensive Effect of the New Imidazoline Compound Benazoline. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *881*, 102–105. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09347.x

- (75) Abás, S.; Estarellas, C.; Javier Luque, F.; Escolano, C. Easy Access to (2-Imidazolin-4-yl)Phosphonates by a Microwave Assisted Multicomponent Reaction. *Tetrahedron* **2015**, *71* (19), 2872–2881. DOI: 10.1016/j.tet.2015.03.065
- (76) Bagán, A.; López-Ruiz, A.; Abás, S.; Ruiz-Cantero, M. C.; Vasilopoulou, F.; Taboada-Jara, T.; Griñán-Ferré, C.; Pallàs, M.; Muguruza, C.; Diez-Alarcia, R.; Callado, L. F.; Entrena, J. M.; Cobos, E. J.; Pérez, B.; Morales-García, J. A.; Molins, E.; De Jonghe, S.; Daelemans, D.; Brea, J.; Val, C.; Loza, M. I.; Hernández-Hernández, E.; García-Sevilla, J. A.; García-Fuster, M. J.; Díaz, C.; Fernández-Godino, R.; Genilloud, O.; Beljkaš, M.; Oljačić, S.; Nikolic, K.; Escolano, C. Discovery of (3-Phenylcarbamoyl-3,4-Dihydro-2H-Pyrrol-2-yl)Phosphonates as Imidazoline I₂ Receptor Ligands with Anti-Alzheimer and Analgesic Properties. *J. Med. Chem.* **2025**, *68* (3), 2551–2573. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.4c01644
- (77) Mayer, G.; Taberner, P. V. Effects of the Imidazoline Ligands Efaroxan and KU14R on Blood Glucose Homeostasis in the Mouse. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *454* (1), 95–102. DOI: 10.1016/S0014-2999(02)02473-1
- (78) Tsai, C.-C.; Chen, L.-J.; Niu, H.-S.; Chung, K.-M.; Cheng, J.-T.; Lin, K.-C. Allantoin Activates Imidazoline I-3 Receptors to Enhance Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells. *Nutr. Metab.* **2014**, *11*, 1–16. DOI: 10.1186/1743-7075-11-41
- (79) Arróniz, C.; Molina, J.; Abás, S.; Molins, E.; Campanera, J. M.; Luque, F. J.; Escolano, C. First Diastereoselective [3 + 2] Cycloaddition Reaction of Diethyl Isocyanomethylphosphonate and Maleimides. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (10), 1640–1649. DOI: 10.1039/C3OB26766K
- (80) Bagán, A.; Morales-García, J. A.; Griñán-Ferré, C.; Díaz, C.; Pérez del Palacio, J.; Ramos, M. C.; Vicente, F.; Pérez, B.; Brea, J.; Loza, M. I.; Pallàs, M.; Escolano, C. Insights into the Pharmacokinetics and In Vitro Cell-Based Studies of the Imidazoline I₂ Receptor Ligand B06. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (10), 5408. DOI: 10.3390/ijms23105408
- (81) Vrettou, M.; Gray, A. A.; Brewer, A. R. E.; Barrett, A. G. M. Strategies for the Synthesis of C₂ Symmetric Natural Products—a Review. *Tetrahedron* **2007**, *63* (7), 1487–1536. DOI: 10.1016/j.tet.2006.09.109

Annexos

General remarks

Reagents, solvents and starting products were acquired from commercial sources. Evaporation of solvents was accomplished with rotary evaporator. The reactions were monitored by thinlayer chromatography (TLC) using silica gel (60 F254) plates. Compounds were visualized by UV irradiation and/or spraying with 1% aqueous KMnO_4 , followed by charring at 150 °C or Iodine steam. Chromatography refers to flash column chromatography and was carried out using PuriFlash 5.250 system equipped with autosampler, UV/Vis and ELSD detectors (Interchim, Montluçon, France) with 12g cartridges packed with monodisperse 50 μm spherical silica particles (Interchim_PF-50SIHP-F0012) using a solvent system of dichloromethane and methanol. IR spectra were performed in a spectrophotometer Nicolet Avantar 320 FTIR or in a Spectrum Two FTIR Spectrometer, and only noteworthy IR absorptions (cm^{-1}) are listed. NMR spectra were recorded in CDCl_3 at 400 MHz (^1H) and 101 MHz (^{13}C), and chemical shifts are reported in values downfield from TMS or relative to residual solvent (7.26 ppm and 77.0 ppm for CDCl_3) as an internal standard. Data are reported in the following manner: chemical shift, multiplicity, coupling constant (J) in hertz (Hz), integrated intensity and assignment (when possible). Multiplicities are reported using the following abbreviations: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet. Assignments are given only when they are derived from definitive dimensional NMR experiments (gHSQC). The accurate mass analyses were carried out using a LC/MSD TOF spectrophotometer. HPLC-MS spectra were carried out on HPLC-MS (Agilent 1260 Infinity II or Waters 2795 Alliance) analysis was conducted on a Poroshell 120 ECC15 (4.6 mm $\times$ 50 mm, 2.7 μm) at 40 °C or a Zorbax Extend C18 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 3.5 μm) at 35 °C with mobile phase A (H_2O + 0.05% formic acid) and B (ACN + 0.05% formic acid) using a gradient elution and flow rate 0.6 mL/min. The DAD detector was set at 254 or 220 nm, the injection volume was 5 μl , and oven temperature was 40 °C.

General procedure for preparation of diethyl (isocyano(phenyl)methyl)phosphonate

To a solution of diethyl (amino(phenyl)methyl)phosphonate (1 mmol) in THF (25 mL), another solution of acetic anhydride (2.2 mmol) and HCOOH (2.2 mmol) was added dropwise. The reaction was stirred at 75 °C for 4 h, the crude was quenched with NaHCO₃ and the formamide derivative was extracted with DCM.

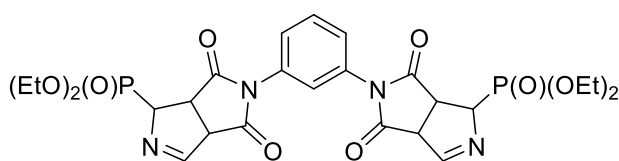
To a solution of diethyl (formamido(phenyl)methyl)phosphonate (1 mmol) in DCM (2.9 ml), Et₃N (5 mmol) was added. The reaction mixture was cooled to -5 °C and POCl₃ (1 mmol) was added dropwise, letting it react for 1.5 h. After that, the crude was purified by manual chromatography column using Et₂O/DCM and concentrated to finally get diethyl (isocyano(phenyl)methyl)phosphonate.

General procedure for [3+2] cycloaddition reaction

To a solution of silver acetate (10%) and dimaleimide (1 mmol) in acetonitrile was added PhosMic or diethyl (isocyano(phenyl)methyl)phosphonate (2 mmol). The reaction mixture was stirred in CEM Discover microwave at 40 °C for 30 min. Then, the mixture was filtered through cotton, concentrated and the residue was purified by column chromatography.

Diethyl (5-(3-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)phenyl)-4,6-dioxo-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

1a



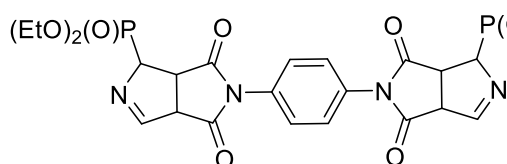
Following the general procedure, AgOAc (3 mg, 0.02 mmol), 1,1'-(1,3-phenylene)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (50 mg, 0.19 mmol), acetonitrile (1.4

mL) and PhosMic (59.8 µL, 0.38 mmol), gave (54 mg, 47%) as final product (1a). Purified by column Chromatography using DCM/MeOH (96:4). MP 106-108 °C. IR (ATR) 1713, 1605, 1493, 1365, 1239, 1168, 1097, 1017, 972, 868, 813, 792, 744, 686 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (td, *J* = 7, 2.6 Hz, 12H, 4CH₂CH₃), 3.88 (qd, *J* = 8.6, 2.7 Hz, 2H, H-3a), 4.41 (m, 2H, H-6a), 4.19-4.31 (m, 8H, 4CH₂CH₃), 4.96 (dq, *J* = 20, 2.6 Hz, 2H, H-1), 7.32 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, ArH), 7.34 (d, *J* = 2 Hz, 1H, ArH), 7.36 (d, *J* = 2 Hz, 1H, ArH), 7.56 (t, *J* = 8 Hz, 1H, ArH), 7.77 (m, 2H, H-3). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 16.4 (d, *J* = 5.7 Hz, 4CH₂CH₃), 44.1 (2C-3a), 58.7 (2C-6a), 63.3 (d, *J* = 7 Hz, 2CH₂CH₃), 63.9 (d, *J* = 6.5 Hz, 2CH₂CH₃), 73.7 (d, *J* = 158.9 Hz, 2C-1), 123.5 (CH-Ar), 126.2 (2CH-Ar), 129.7 (CH-Ar), 131.8

(2C-*i*), 162.6 (d, $J = 12.6$ Hz, 2C-3), 170.8 (d, $J = 5.7$ Hz, 2C-4), 175.0 (d, $J = 14.4$ Hz, 2C-6). HRMS $C_{26}H_{33}O_{10}N_4P_2$ $[M+H]^+$ 623.1666; found 623.1655.

Diethyl (5-(4-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)phenyl)-4,6-dioxo-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

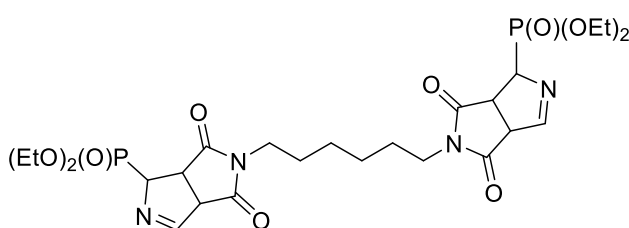
2a



Following the general procedure, AgOAc (3 mg, 0.02 mmol), 1,1'-(1,4-phenylene)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (50 mg, 0.19 mmol), acetonitrile (1.4 mL) and PhosMic (59.8 μ L, 0.38 mmol), gave (54 mg, 47%) as final product (2a). Purified by column Chromatography using DCM/MeOH (96:4). MP 177-179 $^{\circ}$ C. IR 2982, 1778, 1711, 1612, 1513, 1372, 1293, 1260, 1183, 1097, 1017, 959, 900, 846, 794, 741, 622 cm^{-1} . 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.40 (td, $J = 7.1, 4.4$ Hz, 12H, $4CH_2CH_3$), 3.90 (qd, $J = 8.6, 2.7$ Hz, 2H, H-3a), 4.20 – 4.30 (m, 8H, $4CH_2CH_3$), 4.42 (m, 2H, H-6a), 4.97 (dq, $J = 20.1, 2.6$ Hz, 2H, H-1), 7.39 (s, 4H, 4ArH), 7.78 (m, 2H, H-3). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$) δ 16.9 (d, $J = 5.8$ Hz, $4CH_2CH_3$), 44.6 (2C-3a), 59.2 (2C-6a), 63.8 (d, $J = 7.1$ Hz, $2CH_2CH_3$), 64.4 (d, $J = 6.6$ Hz, $2CH_2CH_3$), 74.2 (d, $J = 158.4$ Hz, 2C-1), 127.4 (4CH-Ar), 131.8 (2C-*i*), 163.2 (d, $J = 12.3$ Hz, 2C-3), 171.4 (d, $J = 5.8$ Hz, 2C-4), 175.5 (d, $J = 14.5$ Hz, 2C-6). HRMS $C_{26}H_{33}O_{10}N_4P_2$ $[M+H]^+$ 623.1666; found 623.1652.

Diethyl (5-(6-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)hexyl)-4,6-dioxo-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

3a

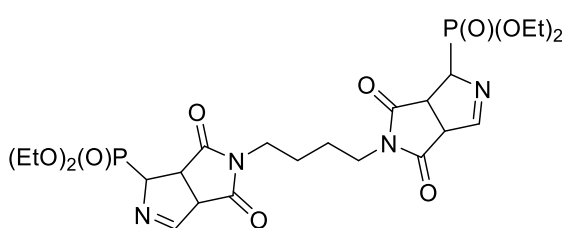


Following the general procedure, AgOAc (3 mg, 0.02 mmol), 1,1'-(hexane-1,6-diyl)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (50 mg, 0.18 mmol), acetonitrile (1.4 mL) and PhosMic (58.0 μ L, 0.36 mmol), gave (38 mg, 33%) as final product (3a). Purified by column Chromatography using DCM/MeOH (96:4). IR (ATR) 3465, 2934, 1776, 1697, 1613, 1438, 1395, 1367, 1239, 1151, 1097, 1016, 964, 867, 791, 756, 626 cm^{-1} . 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.20 (m, 4H, $2CH_2$), 1.37 (q, $J = 6.9$ Hz, 12H, $4CH_2CH_3$), 1.48 (m, 4H, $2CH_2$), 3.41 (t, $J = 7.2$ Hz, 4H, $2N-CH_2$), 3.69 (qd, $J = 8.4, 2.7$ Hz, 2H, H-3a), 4.15 – 4.20 (m, 2H, H-6a), 4.20 – 4.27 (m, 8H, $4CH_2CH_3$), 4.81 (dq, $J = 20.0, 2.7$ Hz, 2H, H-1), 7.68 (m, 2H, H-3). ^{13}C NMR (100.6 MHz, $CDCl_3$) δ 16.5 (d, $J = 5.7$ Hz, $4CH_2CH_3$), 25.9 ($2N-CH_2CH_2CH_2$), 27.3 ($2N-$

CH₂CH₂), 39.0 (2N-CH₂), 44.0 (2C-3a), 58.9 (2C-6a), 63.3 (d, *J* = 7.0 Hz, 2CH₂CH₃), 63.8 (d, *J* = 6.5 Hz, 2CH₂CH₃), 73.7 (d, *J* = 159 Hz, 2-C1), 163.2 (d, *J* = 12.4 Hz, 2C-3), 172.6 (d, *J* = 5.8 Hz, 2C-4), 176.5 (d, *J* = 14.1 Hz, 2C-6). HRMS C₂₆H₄₁O₁₀N₄P₂ [M+H]⁺ 631.2292; found 631.2273.

Diethyl (5-(4-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)butyl)-4,6-dioxo-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

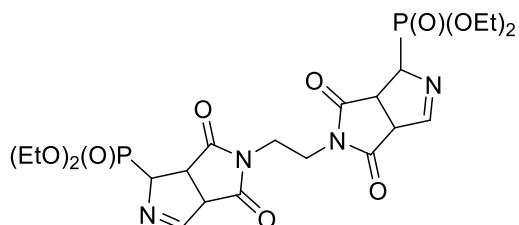
4a



Following the general procedure, AgOAc (7 mg, 0.04 mmol), 1,1'-(butane-1,4-diyl)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (100 mg, 0.40 mmol), acetonitrile (3 mL) and PhosMic (129.2 μL, 0.80 mmol), gave (88 mg, 36%) as final product (4a). Purified by column Chromatography using DCM/MeOH (96:4). IR (ATR) 3465, 2982, 1776, 1697, 1613, 1438, 1395, 1368, 1238, 1156, 1097, 1016, 963, 791, 755, 626 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃). δ 1.37 (q, *J* = 7.0 Hz, 12H, 4CH₂CH₃), 1.47 (m, 4H, 2CH₂), 3.43 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H, 2N-CH₂), 3.69 (ddd, *J* = 17.4, 8.4, 2.8 Hz, 2H, H-3a), 4.13 – 4.20 (m, 2H, H-6a), 4.20 – 4.28 (m, 8H, 4CH₂CH₃), 4.81 (dq, *J* = 20, 2.7 Hz, 2H, H-1), 7.67 (m, 2H, H-3). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 16.5 (d, *J* = 5.8 Hz, 4CH₂CH₃), 24.6 (2N-CH₂CH₂), 38.5 (2N-CH₂), 44.1 (2C-3a), 58.9 (2C-6a), 63.3 (d, *J* = 7.1 Hz, 2CH₂CH₃), 63.9 (d, *J* = 6.5 Hz, 2CH₂CH₃), 73.3 (*J* = 160.6 Hz, 2C-1), 163.1 (d, *J* = 12.3 Hz, 2C-3), 172.5 (d, *J* = 5.8 Hz, 2C-4), 176.4 (d, *J* = 14.1 Hz, 2C-6). HRMS C₂₄H₃₇O₁₀N₄P₂ [M+H]⁺ 603.1979; found 603.1969.

Diethyl (5-(2-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)ethyl)-4,6-dioxo-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

5a

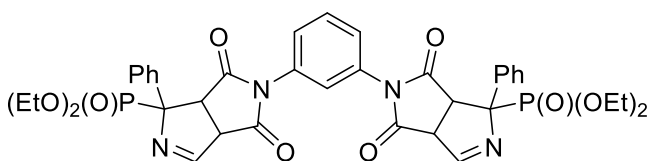


Following the general procedure, AgOAc (8 mg, 0.05 mmol), 1,1'-(ethane-1,2-diyl)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (100 mg, 0.45 mmol), acetonitrile (3.4 mL) and PhosMic (145.6 μL, 0.91 mmol), gave (152 mg, 58%) as final product (5a). Purified by column Chromatography using DCM/MeOH (96:4). Mp 71-73 °C. IR (ATR) 2983, 1778, 1703, 1613, 1434, 1391, 1238, 1161, 1097, 1015, 963, 833, 786, 757, 624 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃). δ 1.38 (q, *J* = 7.2 Hz, 12H, 4CH₂CH₃), 3.61-3.64 (m, 1H, H-3a), 3.65 (s, 4H, 2N-CH₂), 3.67 – 3.69 (m, 1H, H-3a), 4.16 – 4.19 (m, 2H, H-6a),

4.19 – 4.29 (m, 8H, 4CH₂CH₃), 4.76 – 4.81 (m, 1H, H-1), 4.81 – 4.87 (m, 1H, H-1), 7.63 (m, 2H, H-3). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 16.5 (d, *J* = 5.9 Hz, 4CH₂CH₃), 37.3 (2N-CH₂), 44.1 (2C-3a), 58.8 (2C-6a), 63.2 (d, *J* = 7.0 Hz, 2CH₂CH₃), 63.9 (d, *J* = 6.5 Hz, 2CH₂CH₃), 72.9 (dd, *J* = 159.5, 5.5 Hz, 2C-1), 162.3 (d, *J* = 12.5 Hz, 2C-3), 172.6 (d, *J* = 5.9 Hz, 2C-4), 176.5 (d, *J* = 13.9 Hz, 2C-6). HRMS C₂₂H₃₃O₁₀N₄P₂ [M+H]⁺ 575.1666; found 575.1658.

Diethyl (5-(3-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-4-phenyl-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)phenyl)-4,6-dioxo-1-phenyl-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

1b

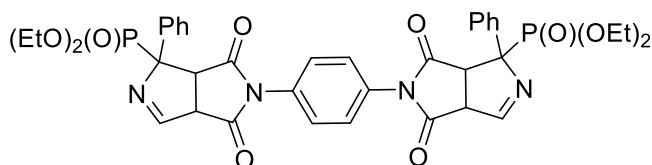


Following the general procedure, AgOAc (3 mg, 0.02 mmol), 1,1'-(1,3-phenylene)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (45 mg, 0.17 mmol),

acetonitrile (1.3 mL) and diethyl (isocyano(phenyl)methyl)phosphonate (85 mg, 0.34 mmol), gave (26 mg, 27%) as final product (1b). Purified by column Chromatography using DCM/AcOEt (97:3). MP 123-125°C. IR (ATR) 2981, 1715, 1626, 1493, 1448, 1364, 1241, 1179, 1017, 968, 790, 756, 700, 618 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 1.27 (td, *J* = 7.0, 1.7 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 3.85 – 3.98 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.04 – 4.17 (m, 6H, 3CH₂CH₃), 4.17 – 4.26 (m, 2H, H-6a), 4.43 (m, 2H, H-3a), 6.53 (dt, *J* = 23.4, 1.9 Hz, 1H, ArH), 6.58 (s, 1H, ArH), 6.67 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H, ArH), 7.14 – 7.23 (m, 1H, ArH), 7.28 – 7.38 (m, 6H, ArH), 7.65 (td, *J* = 6.1, 1.6 Hz, 4H, ArH), 8.02 (ddd, *J* = 4.8, 3.3, 1.4 Hz, 2H, H-3). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 16.1 (m, 4CH₂CH₃), 47.9 (2C-6a), 59.9 (d, *J* = 2.4 Hz, 2C-3a), 63.4 (dd, *J* = 7.5, 2.3 Hz, 2CH₂CH₃), 64.6 (dd, 7.4, 1.6 Hz, 2CH₂CH₃), 86.1 (d, *J* = 156.8 Hz, 2C-1), 123.0 (d, *J* = 15.9 Hz, 2CH-Ar), 125.6 (d, *J* = 8.3 Hz, CH-Ar), 127.8 (4CH-Ar), 128.2 (m, 4CH-Ar), 128.4 (2CH-Ar), 129.0 (CH-Ar), 131.3 (2C-i), 133.1 (t, *J* = 3.9 Hz, 2C-i), 162.1 (d, *J* = 11.9 Hz, 2C-3), 170.1 (d, *J* = 5.3 Hz, 2C-4), 170.8 (dd, 12.4, 6.1 Hz, 2C-6). HRMS C₃₈H₄₁O₁₀N₄P₂ [M+H]⁺ 775.2292; found 775.2315.

Diethyl (5-(4-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-4-phenyl-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)phenyl)-4,6-dioxo-1-phenyl-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

2b



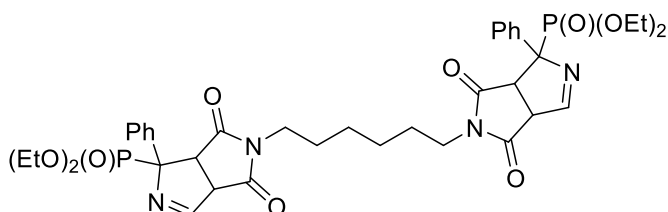
Following the general procedure, AgOAc (3 mg, 0.02 mmol), 1,1'-(1,4-phenylene)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (50 mg, 0.19 mmol),

acetonitrile (1.4 mL) and diethyl (isocyano(phenyl)methyl)phosphonate (94 mg, 0.37

mmol), gave (25mg, 19%) as final product (2b). Purified by column Chromatography using AcOEt/MeOH (97:3). MP > 230°C (DEC). IR (ATR) 2981, 1714, 1622, 1516, 1446, 1368, 1233, 1177, 1016, 965, 884, 838, 789, 760, 701, 627 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 3.86 – 3.99 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.04 – 4.17 (m, 6H, CH₂CH₃), 4.17 – 4.26 (m, 2H, H-6a) 4.44 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, H-3a), 6.66 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H, ArH), 7.28 – 7.36 (m, 6H, ArH), 7.62 (d, *J* = 6.9 Hz, 4H, ArH), 8.00 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H, H-3). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 16.4 (m, 4CH₂CH₃), 48.3 (d, *J* = 2.3 Hz, 2C-6a), 60.2 (2C-3a), 63.7 (d, *J* = 7.4 Hz, 2CH₂CH₃), 64.8 (d, *J* = 7.4 Hz, 2CH₂CH₃), 86.3 (d, *J* = 157.7 Hz, 2C-1), 126.6 (4CH-Ar), 128.1 (4CH-Ar), 128.4 (2CH-Ar), 128.5 (2CH-Ar), 128.7 (2CH-Ar), 131.7 (d, *J* = 2.7 Hz, 2C-i), 133.5 (m, 2C-i) 162.3 (d, *J* = 12.2 Hz, 2C-3), 170.6 (d, *J* = 5.5 Hz, 2C-4), 171.3 (dd, *J* = 11.7, 1.7 Hz, 2C-6). HRMS C₃₈H₄₀O₁₀N₄NaP₂ [M+Na]⁺ 797.2112; found 797.2138.

Diethyl (5-(6-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-4-phenyl-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)hexyl)-4,6-dioxo-1-phenyl-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

3b

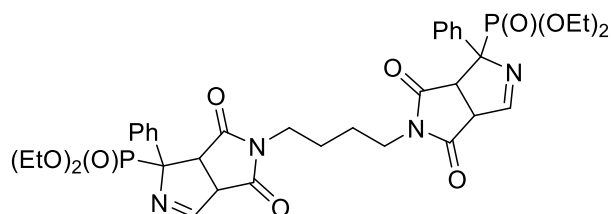


Following the general procedure, AgOAc (3 mg, 0.02 mmol), 1,1'-(hexane-1,6-diyl)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (50 mg, 0.18 mmol), acetonitrile (1.4 mL) and diethyl

(isocyano(phenyl)methyl)phosphonate (92 mg, 0.36 mmol), gave (51 mg, 36%) as final product (3b). Purified by column Chromatography using DCM/AcOEt (97:3). MP 87-89 °C. IR (ATR) 2935, 1776, 1698, 1626, 1445, 1393, 1367, 1242, 1152, 1015, 966, 842, 790, 757, 699, 635 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.73 – 0.8 (m, 4H, 2CH₂), 0.92 – 1.04 (m, 4H, 2CH₂), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 1.26 (m, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 3.12 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H, 2N-CH₂), 3.85 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.00 – 4.07 (m, 2H, H-6a), 4.07 – 4.20 (m, 6H, 3CH₂CH₃), 4.30 (m, 2H, H-3a), 7.27 – 7.34 (m, 6H, ArH), 7.65 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H, ArH), 7.96 (dt, *J* = 5 Hz, 1.3 Hz, 2H, H-3). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 16.4 (t, *J* = 5.0 Hz, 4CH₂CH₃), 25.8 (2N-CH₂CH₂CH₂), 27.0 (2N-CH₂CH₂), 38.8 (2N-CH₂), 47.8 (d, *J* = 2.4 Hz, 2C-3a), 60.5 (2C-6a), 63.6 (d, *J* = 7.6 Hz, 2CH₂CH₃), 64.8 (d, *J* = 7.3, 2CH₂CH₃), 85.8 (d, *J* = 156.1 Hz, 2C-1), 127.9 (6CH-Ar), 128.6 (4CH-Ar), 133.5 (2C-i), 162.7 (d, *J* = 11.6 Hz, 2C-3), 172.2 (d, *J* = 5.5 Hz, 2C-4), 172.7 (d, *J* = 12.7 Hz, 2C-6). HRMS C₃₈H₄₉O₁₀N₄P₂ [M+H]⁺ 783.2918; found 783.2942.

Diethyl (5-(4-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-4-phenyl-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)butyl)-4,6-dioxo-1-phenyl-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

4b

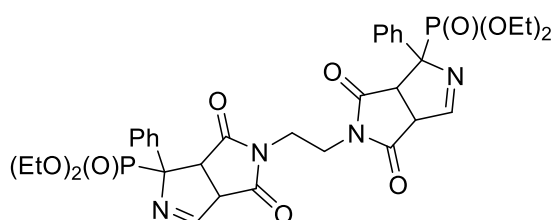


Following the general procedure, AgOAc (3 mg, 0.02 mmol), 1,1'-(butane-1,4-diyl)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (50 mg, 0.20 mmol), acetonitrile (1.5 mL) and diethyl

(isocyano(phenyl)methyl)phosphonate (102 mg, 0.40 mmol), gave (50 mg, 33%) as final product (4b). Purified by column Chromatography using DCM/AcOEt (97:3). MP 157-159 °C. IR (ATR) 2930, 1775, 1698, 1627, 1432, 1389, 1369, 1342, 1326, 1237, 1179, 1156, 1014, 963, 841, 788, 759, 701, 662, 638 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.75 – 0.84 (m, 4H, 2CH₂), 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 2.94 – 3.07 (m, 4H, 2N-CH₂), 3.80 – 3.92 (m, 2H, CH₂CH₃), 4.02 – 4.06 (m, 2H, H-6a), 4.06 – 4.17 (m, 6H, 3CH₂CH₃), 4.25 – 4.30 (m, 2H, H-3a), 7.27 – 7.35 (m, 6H, ArH), 7.62 (d, *J* = 6.0 Hz, 4H, ArH), 7.93 (dd, *J* = 5.0, 1.2 Hz, 2H, H-3). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 16.4 (t, *J* = 5.1 Hz, 4CH₂CH₃), 24.1 (d, *J* = 3.3 Hz, 2N-CH₂CH₂), 37.9 (d, *J* = 5.4 Hz, 2N-CH₂), 47.9 (2C-3a), 60.4 (2C-6a), 63.6 (d, *J* = 7.3 Hz, 2CH₂CH₃), 64.8 (d, *J* = 7.3 Hz, 2CH₂CH₃), 85.8 (d, *J* = 156.1 Hz, 2-C1), 127.9 (6CH-Ar), 128.6 (4CH-Ar), 133.5 (2C-i), 162.6 (d, *J* = 11.7 Hz, 2C-3), 172.1 (d, *J* = 5.4 Hz, 2C-4), 172.6 (d, *J* = 12.6 Hz, 2C-6). HRMS C₃₆H₄₅O₁₀N₄P₂ [M+H]⁺ 755.2605; found 755.2633.

Diethyl (5-(2-(4-(diethoxyphosphoryl)-1,3-dioxo-4-phenyl-3,3a,4,6a-tetrahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-2(1H)-yl)ethyl)-4,6-dioxo-1-phenyl-1,3a,4,5,6,6a-hexahydropyrrolo[3,4-c]pyrrol-1-yl)phosphonate

5b



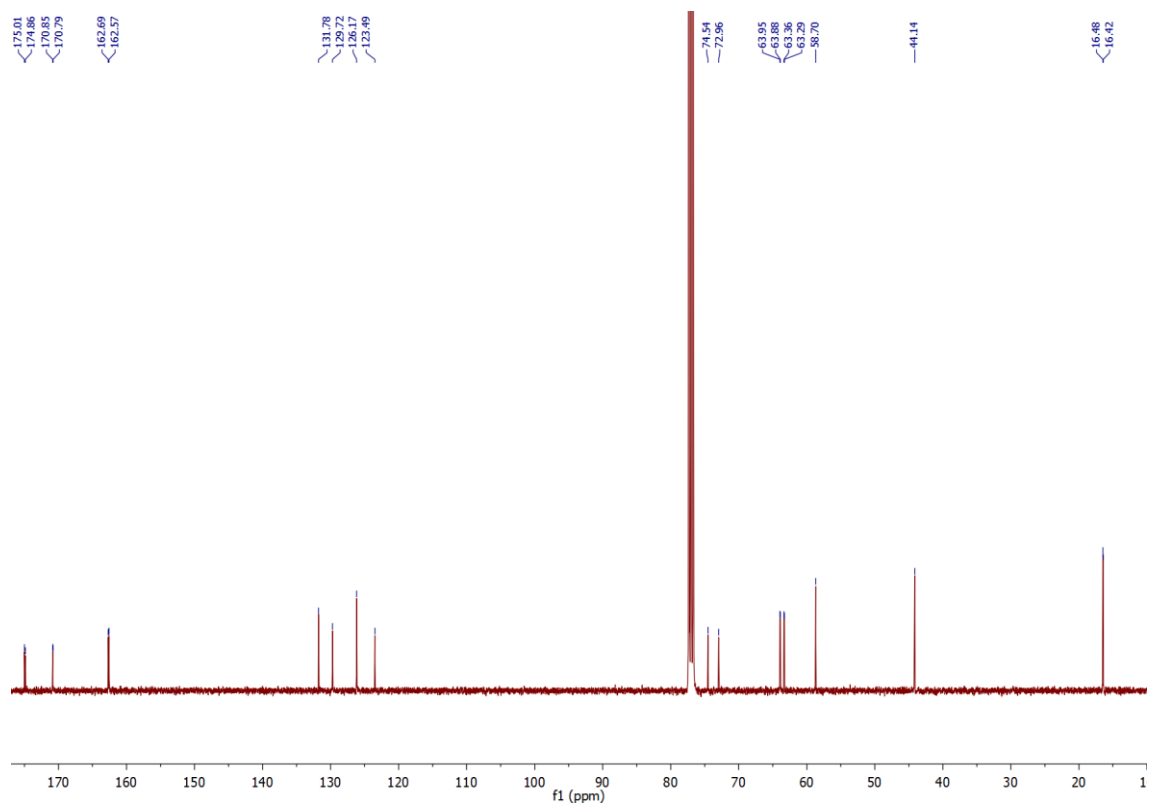
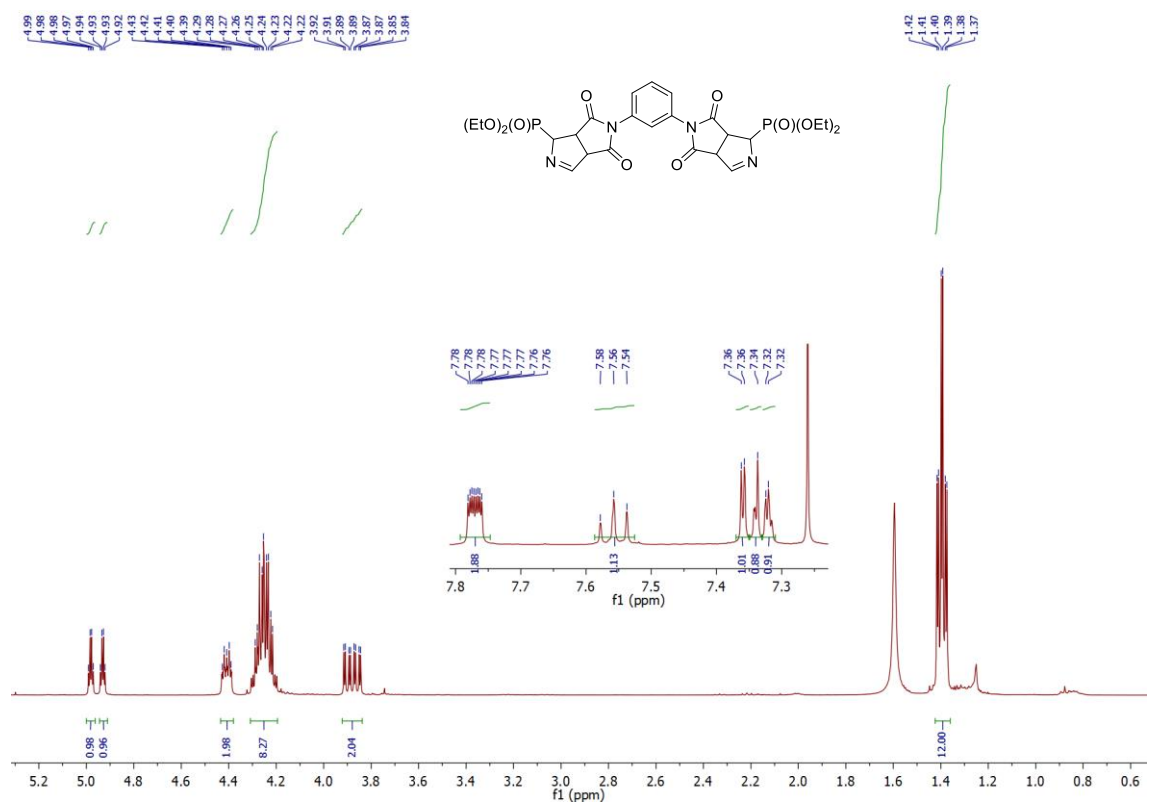
Following the general procedure, AgOAc (3 mg, 0.02 mmol), 1,1'-(ethane-1,2-diyl)bis(1H-pyrrole-2,5-dione) (50 mg, 0.23 mmol), acetonitrile (1.7 mL) and diethyl (isocyano(phenyl)methyl)phosphonate

(115 mg, 0.45 mmol), gave (35 mg, 21%) as final product (5b). Purified by column Chromatography using DCM/AcOEt (97:3). MP 101-103°C. IR (ATR) 2982, 1779, 1705, 1626, 1433, 1389, 1242, 1162, 1017, 966, 791, 759, 699, 633 cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.13 (td, *J* = 7.1, 4.1 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H, 2CH₂CH₃), 3.07 – 3.36 (m, 4H, 2N-CH₂), 3.79 (m, 2H, 2CH₂CH₃), 3.96 – 4.02 (m, 2H, H-6a), 4.02 – 4.14 (m,

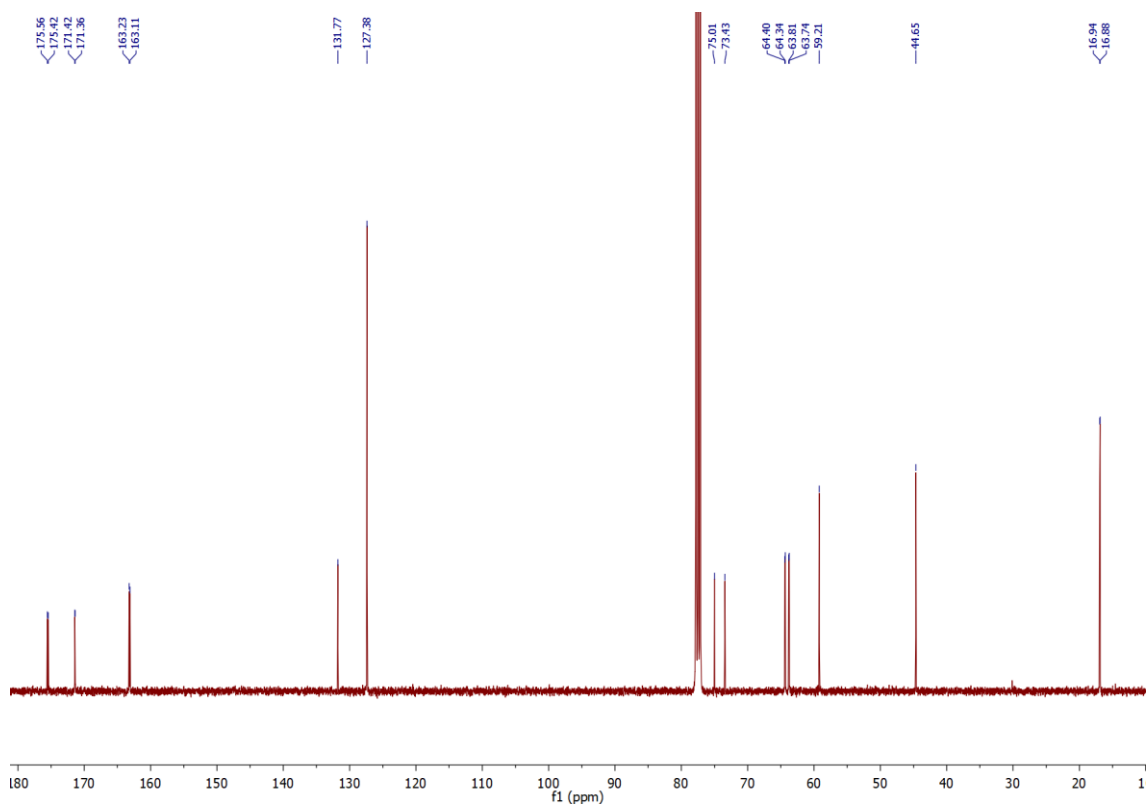
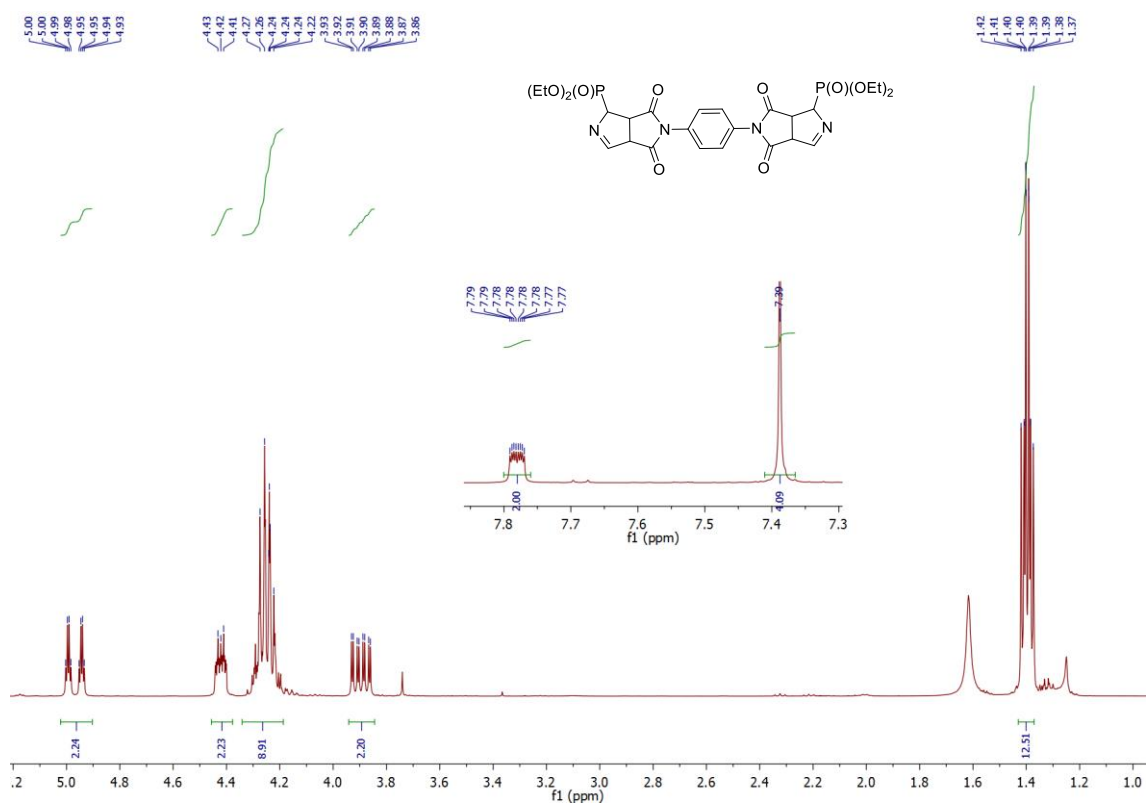
6H, 3CH₂CH₃), 4.14 – 4.21 (m, 2H, H-3a), 7.27 – 7.38 (m, 6H, ArH), 7.69 (m, 4H, ArH), 7.83 (m, 2H, H-3). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 16.7 (m, 4CH₂CH₃), 37.5 (d, *J* = 11.3 Hz, 2N-CH₂), 48.0 (d, *J* = 19.2 Hz, 2C-3a), 60.8 (d, *J* = 4.5 Hz, 2C-6a), 63.9 (m, 2CH₂CH₃), 65.1 (m, 2CH₂CH₃), 86.0 (dd, *J* = 153.1, 4.0 Hz, 2C-1), 128.1 (d, *J* = 15.5 Hz, 4CH-Ar), 128.8 (d, *J* = 7.3 Hz, 2CH-Ar), 129.1 (d, *J* = 6.1 Hz, 2CH-Ar), 129.4 (d, *J* = 5.9 Hz, 2CH-Ar), 133.6 (2C-i), 162.6 (t, *J* = 10.6 Hz, 2C-3), 172.7 (dd, *J* = 23.7, 5.5 Hz, 2C-4), 173.2 (t, *J* = 15.2 Hz, 2C-6). HRMS C₃₄H₄₁O₁₀N₄P₂ [M+H]⁺ 727.2292; found 727.2313.

^1H and ^{13}C NMR

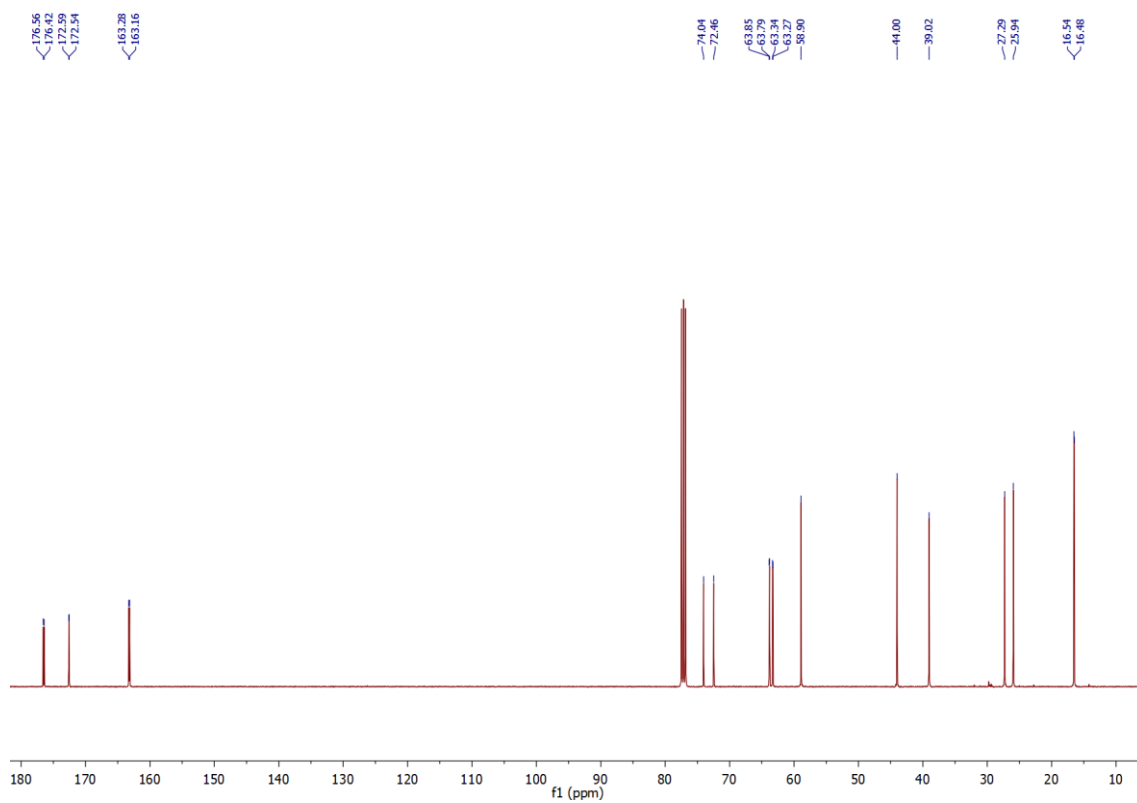
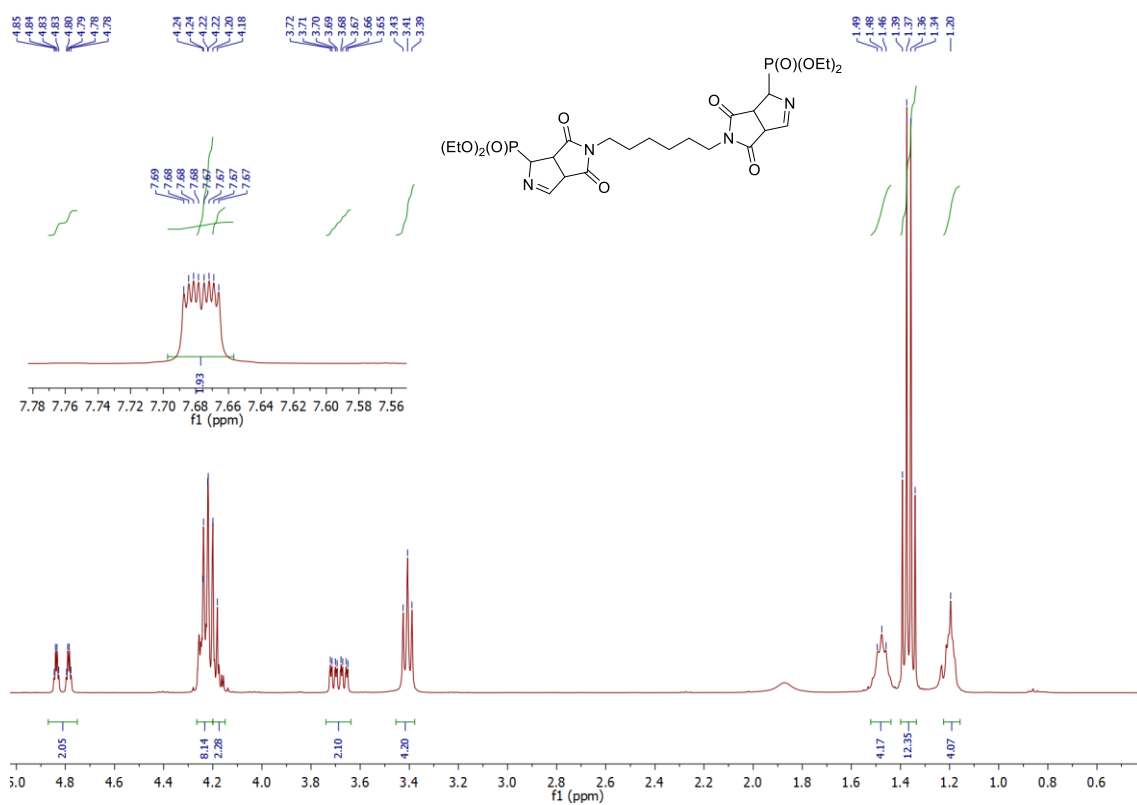
1a



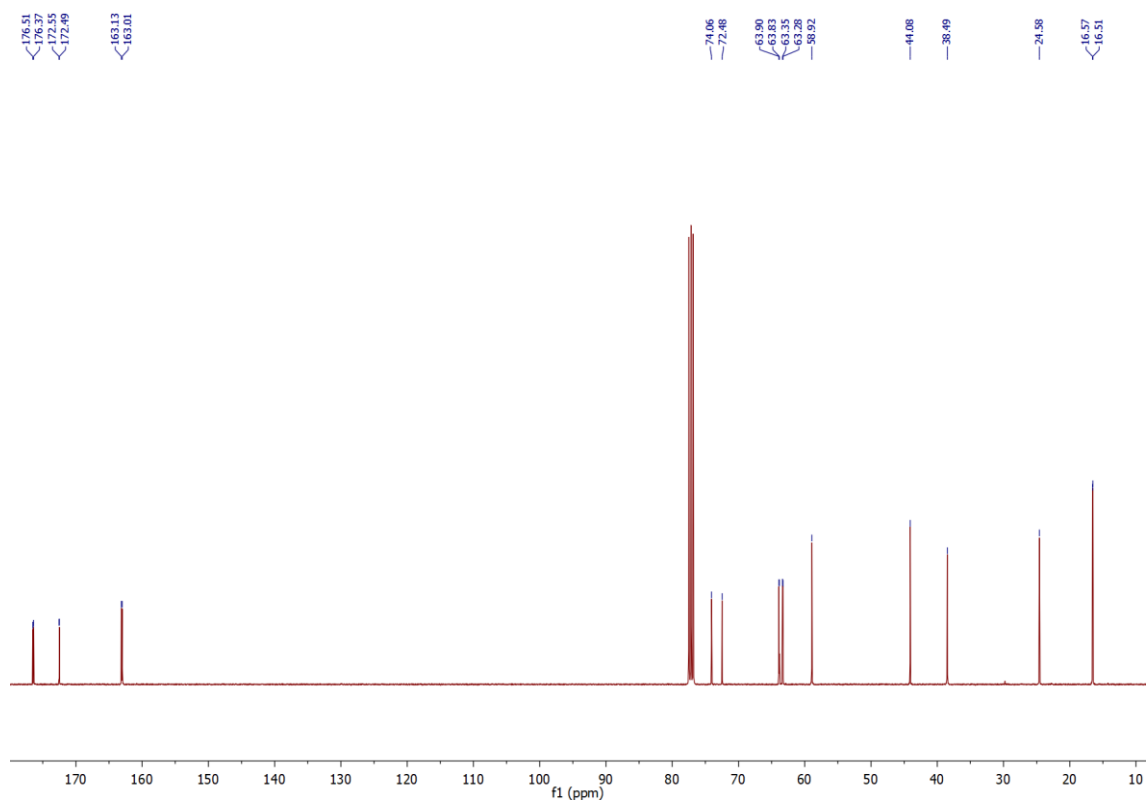
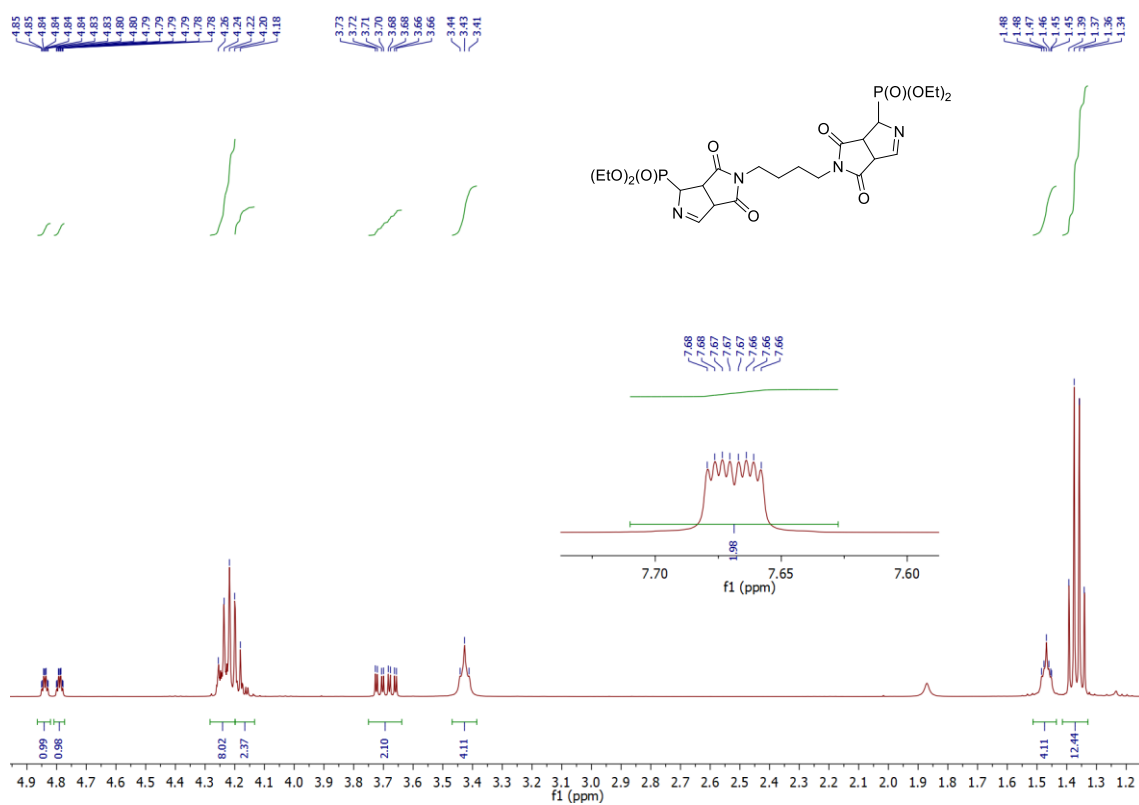
2a



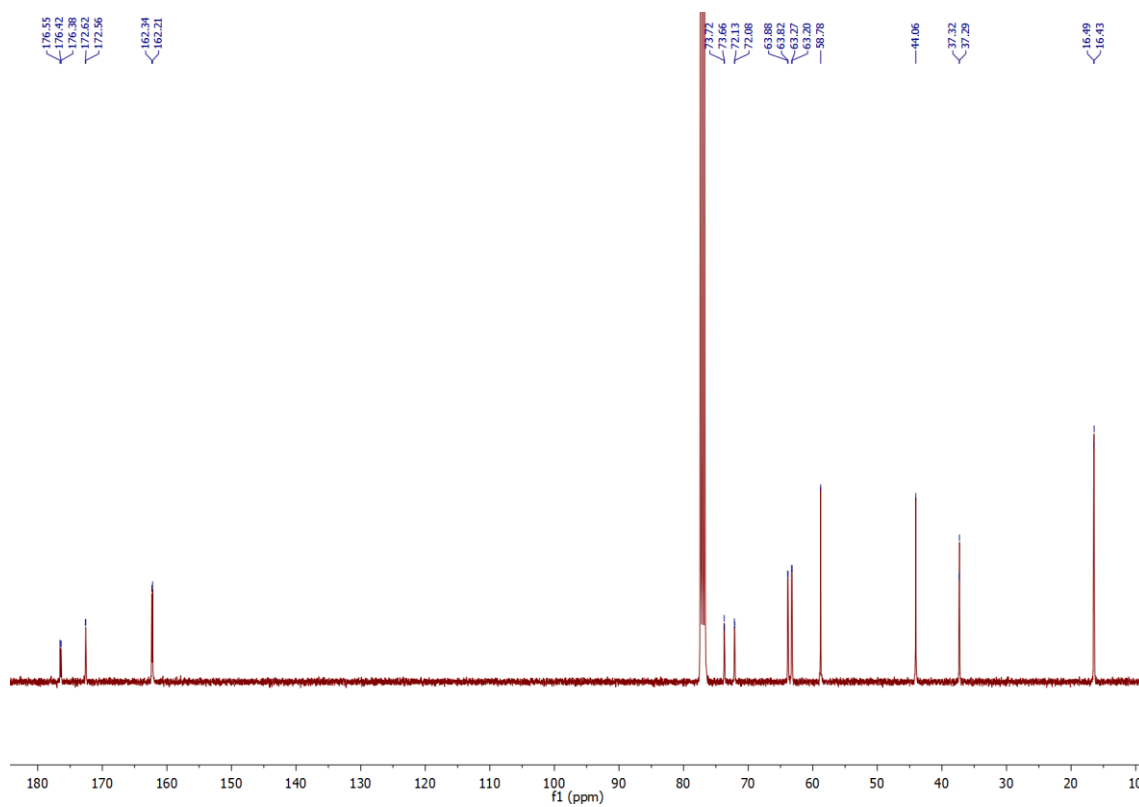
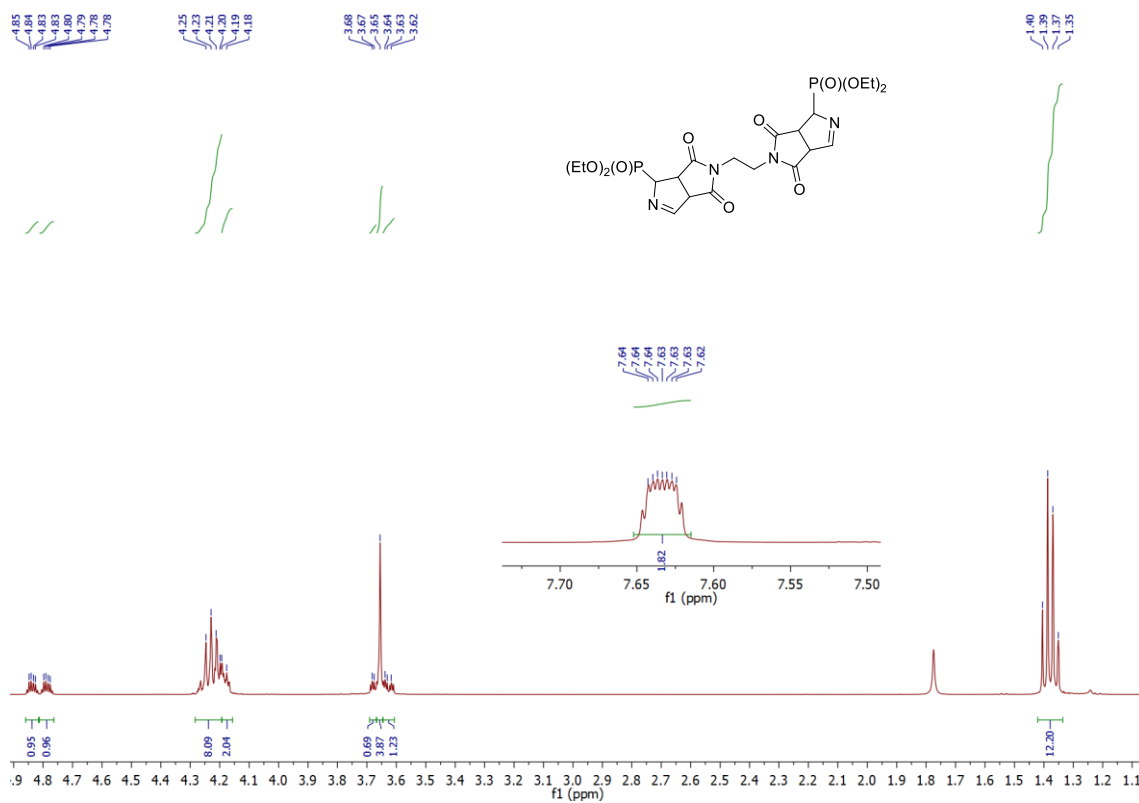
3a



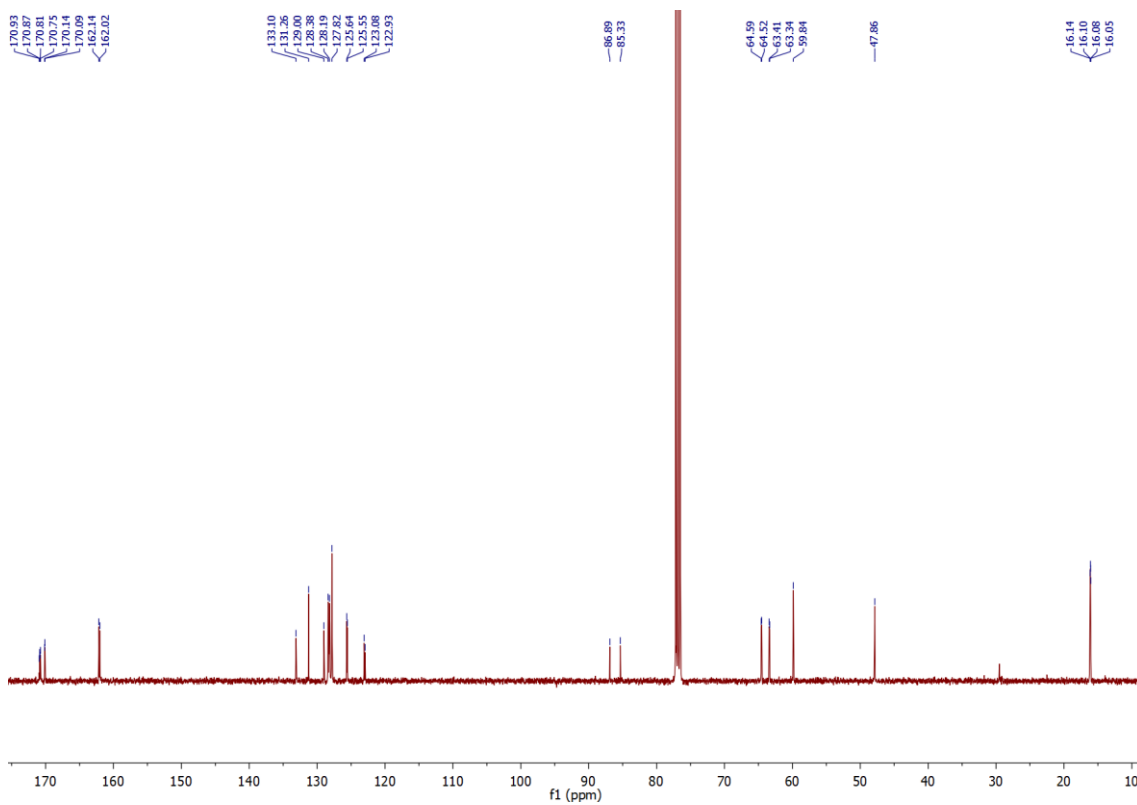
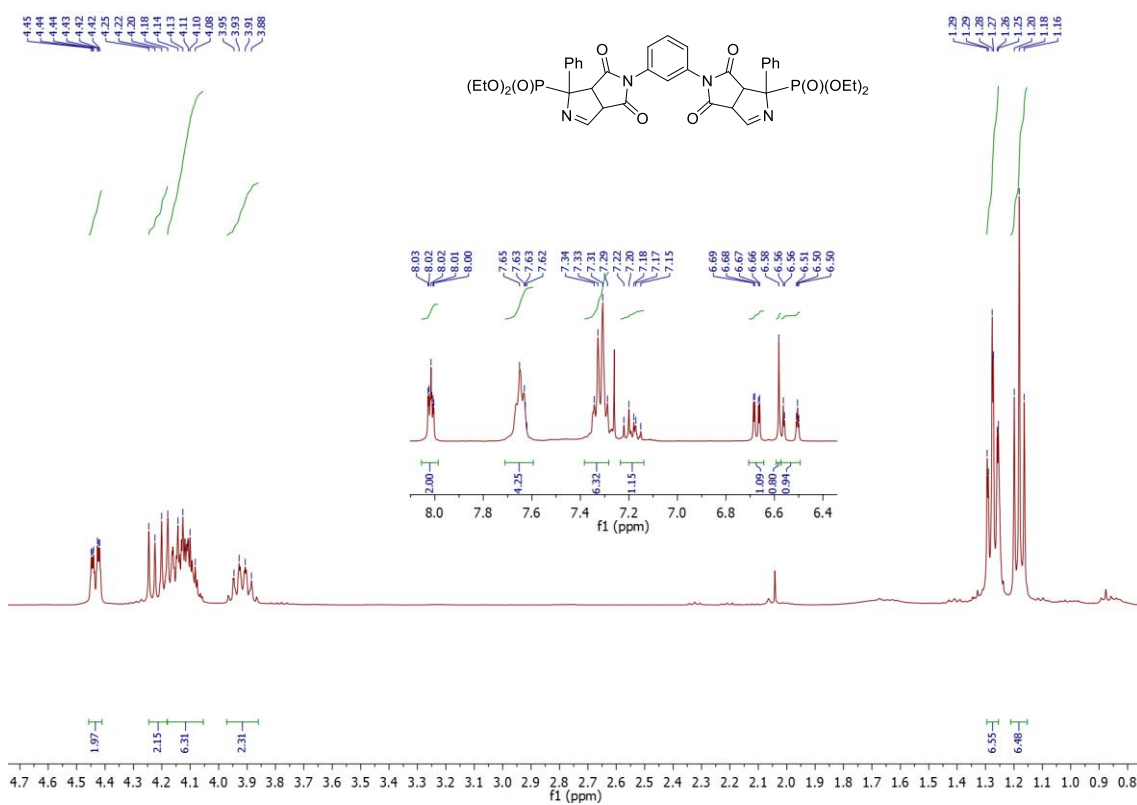
4a



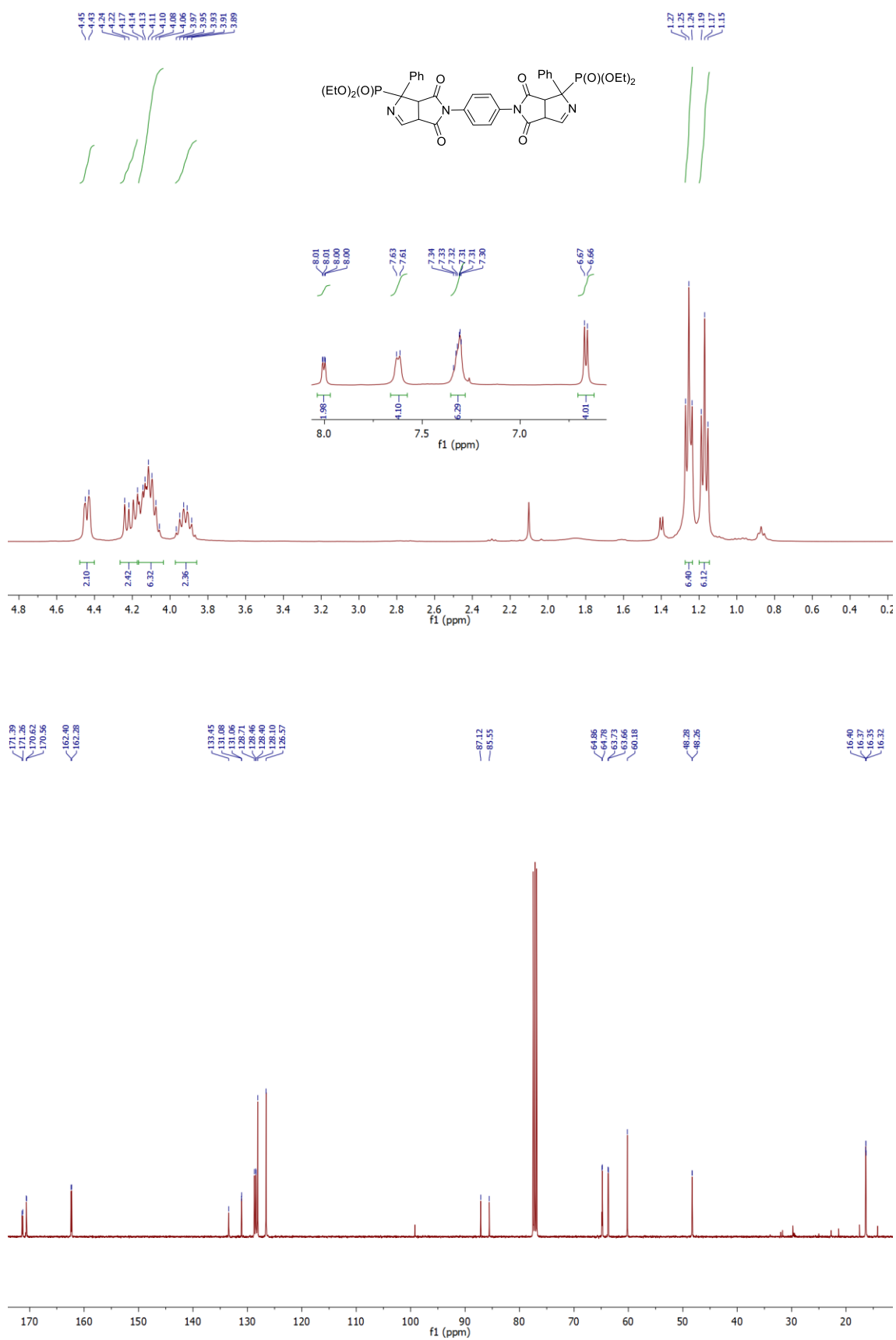
5a



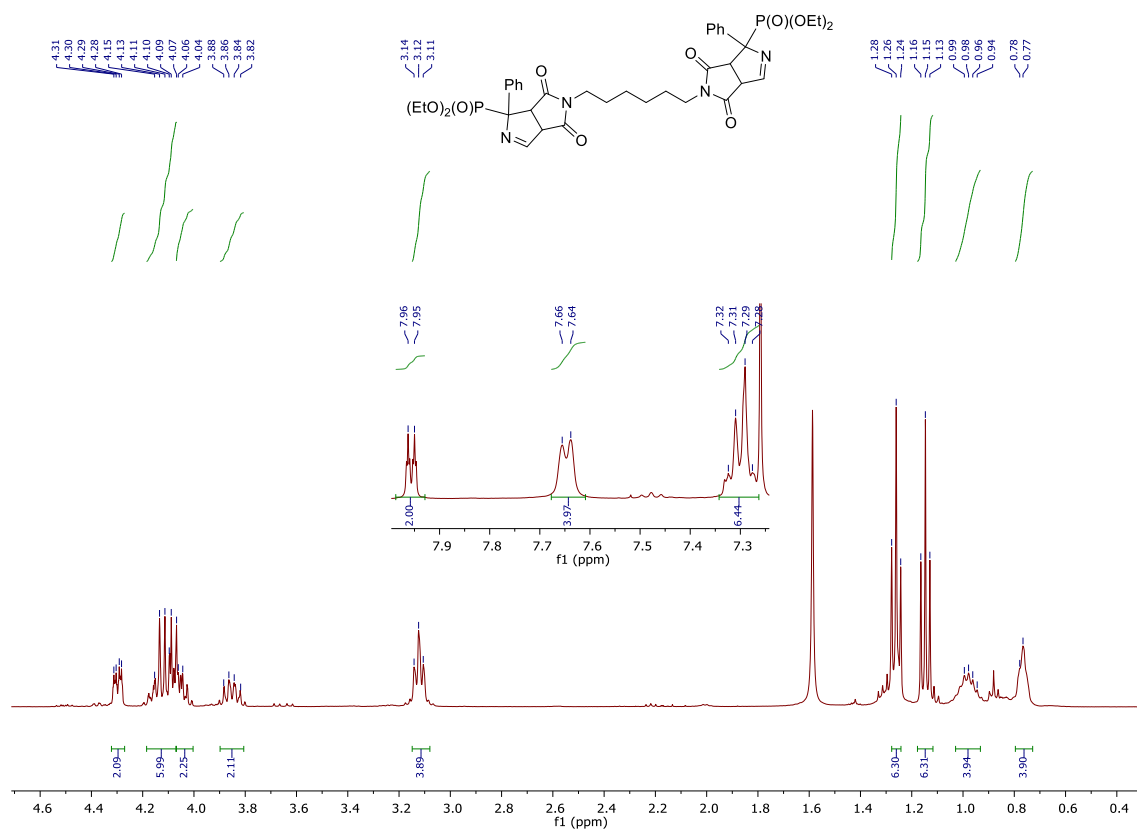
1b



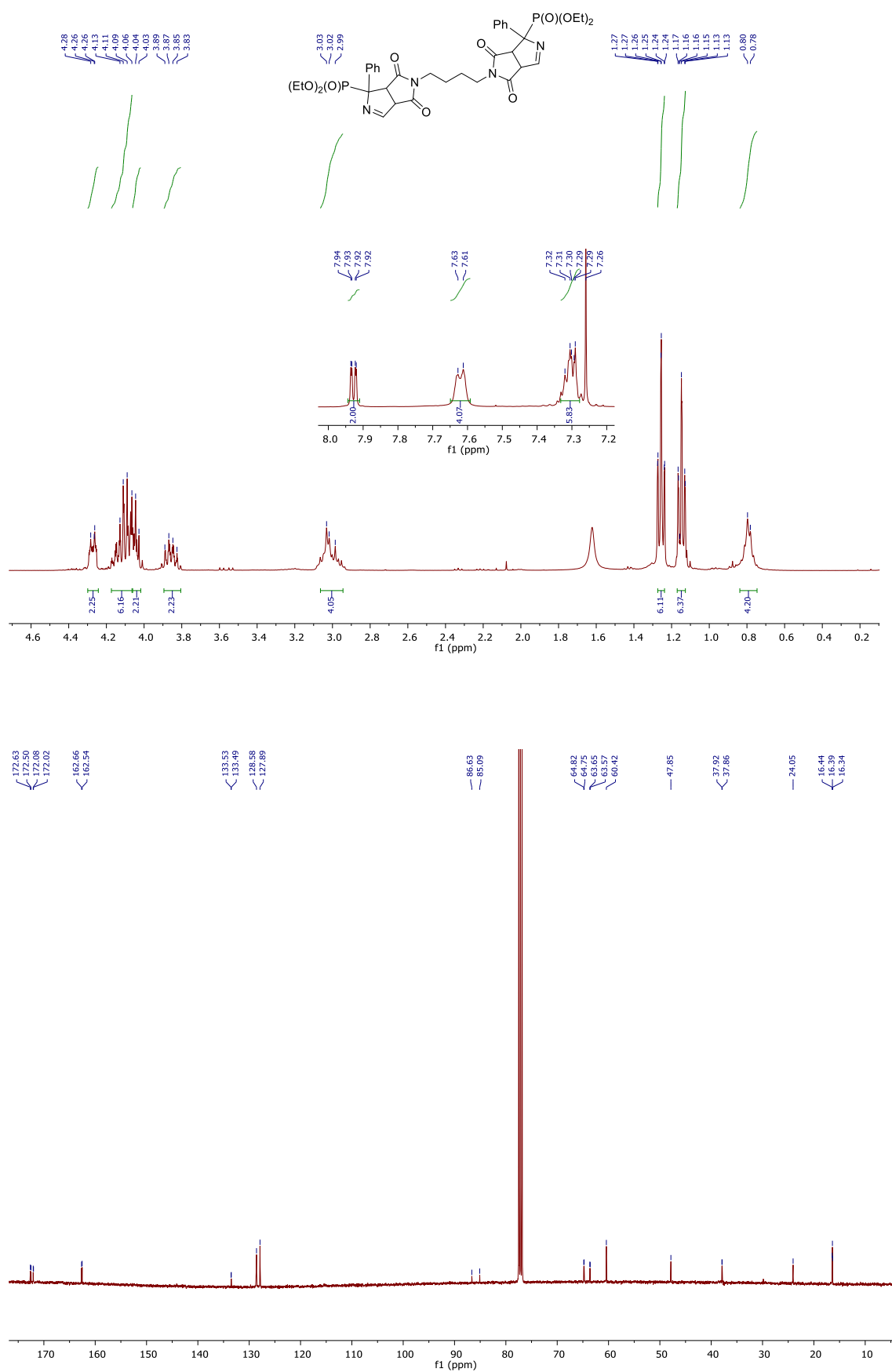
2b



3b



4b



5b

