

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTÀ DI FARMACIA

Dipartimento di Scienze del Farmaco

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE

XXIV ciclo

Dott.ssa Barbara Schininà

Progettazione, sintesi e valutazione farmacologica di derivati
del 4-nitro-7-piperazin-1-il-2,1,3-benzossadiazolo come nuovi
ligandi sigma fluorescenti

—————
TESI DI DOTTORATO
—————

Tutor:

Chiar.mo Prof. Agostino Marrazzo

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Giuseppe Ronsisvalle

Triennio 2008-2011

INDICE

Introduzione	4
Tecniche di fluorescenza: interazione ligando-recettore	5
Capitolo 1. Recettore sigma	7
1.1. Sottotipi recettoriali	10
1.2. Recettore σ_1	12
1.2.1. Struttura del recettore σ_1	12
1.2.2. Distribuzione anatomica cellulare e subcellulare del recettore σ_1	14
1.2.3. Ligandi endogeni del recettore σ_1	17
1.2.4. Ruoli fisiologici del recettore σ_1	21
1.2.5. Potenzialità terapeutiche del recettore σ_1	25
1.2.6. Modello farmacoforico del recettore σ_1	30
1.3. Recettore σ_2	39
1.3.1. Struttura e distribuzione del recettore σ_2	39
1.3.2. Ruoli fisiologici e potenzialità terapeutiche del recettore σ_2	39
1.3.3. Modello farmacoforico del recettore σ_2	43
Capitolo 2. Spettroscopia di fluorescenza	47
2.1. Processi che competono con la fluorescenza	51
2.2. Variabili che influenzano la fluorescenza	54
2.3. Spettrofluorimetri	57
2.4. Fluorescenza: applicazioni	59
2.5. Fluorescenza polarizzata	62
2.6. Saggio di binding fluorescente	65
Capitolo 3. Progettazione razionale	70
Capitolo 4. Parte sperimentale chimica	76
4.1. Materiali e metodi	77
4.2. Discussione chimica	77
4.3. Sintesi	85
Capitolo 5. Parte sperimentale biologica	108
5.1. Materiali e metodi	109
5.2. Saggi di binding con radioligandi	109

5.3. Saggio di permeabilità	110
Capitolo 6. Parte sperimentale spettroscopica	112
6.1. Materiali e metodi	112
6.2. Spettroscopia di fluorescenza	113
Capitolo 7. Risultati e discussione	115
7.1. Affinità di binding	116
7.2. Permeabilità cellulare	118
7.3. Proprietà spettroscopiche	118
Capitolo 8. Conclusioni	121
Bibliografia	124

Introduzione

Tecniche di fluorescenza: interazione ligando-recettore

L'aumentato utilizzo delle tecniche di fluorescenza per far fronte ad alcuni problemi di natura chimica è attribuibile alla sensibilità e selettività, così come all'innovazione e allo sviluppo, dei sistemi di misurazione. Inoltre, durante gli ultimi due decenni le applicazioni della fluorescenza a studi biochimici è aumentata enormemente soprattutto attraverso lo sviluppo di nuovi ligandi fluorescenti e del loro utilizzo in tecniche anticorpali.

Da sempre biologi e biochimici hanno focalizzato la loro attenzione in numerosi studi volti a chiarire i processi e le strutture molecolari fondamentali per la vita. Tra le tecnologie utilizzate allo scopo di conoscere la struttura di una biomolecola e la sua interazione con altre strutture, la diffrazione a raggi X, la risonanza magnetica nucleare e la microscopia elettronica permettono misure che richiedono grandi quantità di composti purificati, sono spesso eseguite in condizioni non-fisiologiche e sono raramente adatte per osservare le reazioni molecolari in tempo reale.

Recenti sviluppi sono stati mostrati sia nel campo della fluorescenza che in numerosi metodi che consentono la selettività e l'analisi delle interazioni molecolari in condizioni fisiologiche, come nelle cellule vive.

L'analisi si concentra sulle interazioni ligando-recettore e sul processo successivo di trasduzione del segnale, che determina la risposta finale cellulare. Generalmente questi processi sono mediati, attraverso le membrane cellulari, da proteine canale o recettori accoppiati a proteina G. I nuovi saggi di fluorescenza sono importanti per spiegare la funzione dei recettori e i processi di trasduzione del segnale, così come per lo screening di nuovi composti terapeutici.

In particolare, il metodo della fluorescenza polarizzata (FP), della fluorescenza di risonanza a trasferimento di energia (FRET) e della fluorescenza a tempo risolto (TRFS), sono emersi come soluzione agli *high-throughput screening assays* (HTS), in quanto più rapidi, con minor impatto ambientale e minori costi. Sebbene siano stati riscontrati alcuni problemi analitici, i ligandi fluorescenti

sono stati proposti come alternativa ai radioligandi per gli studi di *binding* sui recettori [1-2-3]. Tali composti possono anche dare informazioni sulle caratteristiche bio-fisiche del sito di legame del ligando poiché alcuni fluorofori mostrano una resa quantica che dipende dalla lipofilicità o dal pH dell'ambiente [4-5]. Inoltre potrebbero essere in grado di chiarire la localizzazione e le funzioni biologiche di alcuni tipi di recettore. Per esempio ligandi fluorescenti hanno permesso la localizzazione dei recettori α_1 adrenergici [6], dei trasportatori della dopamina [7], dei recettori A_1 adenosinici [8] e dei recettori periferici delle benzodiazepine [9]. Sempre attraverso l'uso di tali composti è stato possibile lo studio dell'espressione e del *clustering* del recettore ionotropico 5-HT₃ [10], la visualizzazione in tempo reale del *trafficking* cellulare e dell'internalizzazione del complesso del ligando con i recettori oppioidi μ e δ [11] e infine l'oligomerizzazione dei recettori della somatostatina regolata dal legame con il ligando [12]. Sono stati inoltre sintetizzati composti fluorescenti attivi sui recettori sigma (σ) [13-14] che potrebbero essere in grado di fornire nuove informazioni e chiarimenti sul loro ruolo fisio-patologico. Tali recettori sono presenti a livello del sistema nervoso centrale (SNC), del fegato, del rene, del sistema immunitario e del tessuto endocrino e le loro funzioni fisiologiche sono ancora oggetto di studio. In particolare, nel SNC i recettori σ_1 sono coinvolti nella modulazione dei canali del potassio e del calcio e nella neurotrasmissione glutammatergica, serotoninergica, dopaminergica e muscarinica, suggerendo un loro potenziale ruolo terapeutico nel trattamento di disturbi cognitivi, depressione e schizofrenia. I recettori σ_2 , invece, sono overespressi in linee cellulari tumorali e per questo motivo ligandi σ fluorescenti potrebbero essere utili alla diagnosi tumorale. Inoltre per meglio chiarire il coinvolgimento fisiologico e patologico dei recettori σ_1 e σ_2 nella crescita delle cellule tumorali, un ligando fluorescente potrebbe rappresentare un potenziale *tool* molecolare per lo studio della vitalità cellulare [15].

Capitolo 1

Recettore sigma

Da quando i recettori sigma (σ) furono identificati per la prima volta, sono stati effettuati numerosi studi sulla loro localizzazione e la loro funzione biologica ma, sebbene molti progressi siano stati compiuti, rimane ancora molto da fare per avere un quadro completo.

Il primo lavoro in cui vennero descritti gli effetti psicomimetici delle ciclazocine e delle nalorfine nell'uomo risale al 1970 [16]. Più tardi, nel 1976, Martin e collaboratori proposero l'esistenza del recettore σ come sottoclasse dei recettori oppioidi in virtù della loro affinità di binding nei confronti del derivato 6,7-benzomorfanonico (\pm)-*N*-allil-normetazocina [(\pm)-SKF-10,047] e da cui deriva il nome stesso di questa classe recettoriale (σ ha avuto origine dalla prima lettera "S" del composto SKF- 10,047) [17]. Questa confusione iniziale fu dovuta alla complessa farmacologia di questo composto racemico; infatti studi successivi mostrarono che l'isomero levogiro si legava principalmente ai recettori oppioidi μ e κ ed i suoi effetti venivano antagonizzati dal naloxone, mentre l'isomero destrogiro interagiva con il sito σ producendo un effetto che non veniva antagonizzato da antagonisti oppioidi (**Fig.1.1**)[18-19-20-21].

È quindi chiaro che il recettore σ non è classificabile tra i recettori oppioidi.

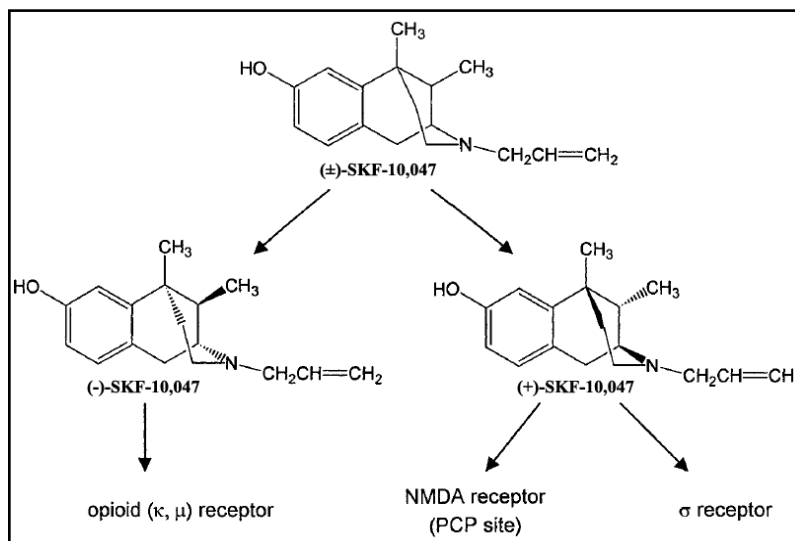
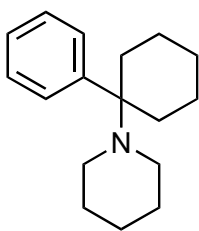


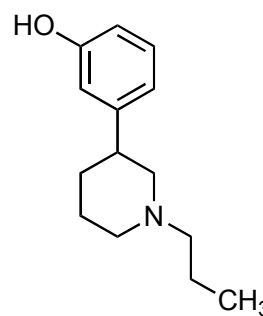
Fig.1.1 Struttura ed enantiomeri di SKF-10,047

Successivamente venne evidenziata la capacità dell'isomero(+)-SKF-10,047 di legarsi al sito di legame per la fenciclidina (PCP) presente sul recettore

glutammatergico NMDA, dal momento che (+)-SKF-10,047 era in grado di spiazzare la [³H]-PCP dal suo sito di legame. Inizialmente si ipotizzò l'esistenza di un sito coincidente "σ-PCP", data anche l'affinità di legame della fenciclidina per il recettore σ, ma tale supposizione fu in seguito smentita dal fatto che la [³H]-PCP si legava ad un sito integrato nel recettore NMDA, mentre il [³H] (+)-SKF-10,047 si legava ad un sito differente[22-23-24].



Fenciclidina



3-PPP

Studi autoradiografici dimostrarono, inoltre, la differente distribuzione anatomica nel sistema nervoso centrale del recettore σ e del sito per la PCP. Questi estesi studi portano alla conclusione che il recettore σ si distingue dai recettori oppioidi e dal recettore NMDA [25-26]. In seguito studi di *binding* hanno mostrato che molti farmaci antipsicotici si legano con alta affinità ai siti σ. Tra gli antipsicotici, l'aloiperidolo esibisce la più alta affinità per i recettori σ inibendo il legame del [³H]SKF-10,047 con una K_i di 4 nM, cioè con una potenza almeno dieci volte maggiore rispetto a quella esibita nei confronti del recettore dopaminergico D₂. Ulteriori studi, hanno poi evidenziato la capacità dell'agonista dell'autorecettore dopaminergico [³H]-3-(3-idrossifenil)-N-1-propilpiperidina (3-PPP) di legarsi a siti identici a quelli del SKF-10,047, in esperimenti nei quali il sito della PCP viene preventivamente bloccato [27].

In seguito è stata individuata un'altra sostanza, la 1,3-di-*o*-tolilguanidina (DTG) con struttura chimica molto differente sia dal SKF-10,047 che dalla 3-PPP, capace di legarsi con alta affinità e con spiccata selettività ai siti σ. La scoperta di un'alta affinità per i recettori sigma di alcuni inibitori delle monoaminossidasi (MAO), usati nel trattamento dei disordini affettivi, suggerisce il loro coinvolgimento in tali disordini e nella schizofrenia[28].

1.1. Sottotipi recettoriali

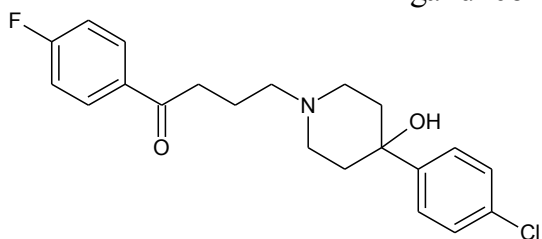
La varietà dei composti che interagiscono con i recettori sigma e le diverse risposte esplicitate da queste molecole suggeriscono l'esistenza di più sottotipi recettoriali del recettore sigma[29].

Studi condotti da Bowen e collaboratori sul legame della (+)-pentazocina ai siti sigma, hanno portato alla scoperta della presenza di due sottotipi recettoriali: recettori sigma-1 (σ_1) e recettori sigma-2 (σ_2)[30], sulla base di differenti caratteristiche di affinità, selettività, funzione, architettura molecolare, localizzazione e meccanismi biochimici connessi con la loro attivazione. Inoltre, è stato riportato un profilo di legame differente per i due sottotipi recettoriali: mentre, infatti, il sottotipo σ_1 mostra stereospecificità nei confronti degli isomeri destrogiri dei benzomorfolani, confermando come tale recettore sia quello descritto da Su [18], il sottotipo σ_2 mostra selettività verso gli isomeri levogiri, come identificato da Bowen.

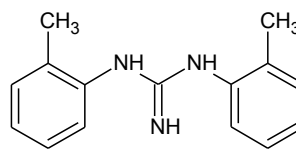
Anche se il sito di legame del recettore σ_1 è stato originariamente identificato mediante i benzomorfolani destrogiri, come (+)-SKF-10,047 e (+)-pentazocina, più tardi studi di *binding* hanno dimostrato che il recettore σ_1 lega diverse classi di composti farmacologici[18-19-25-26-30-31-32-33]. Infatti, il recettore σ_1 lega l'aloiperidolo, l'imipramina, fluvoxamina, pimozide, clorpromazina e destrometorfano in saggi di *binding* in vitro. Specificatamente, la maggior parte degli antipsicotici possiedono un'alta affinità di *binding* per il recettore σ_1 [34].

Entrambi i sottotipi mostrano elevata affinità per l'aloiperidolo ($K_i \sigma_1 = 2.2 \text{ nM}$; $K_i \sigma_2 = 16.0 \text{ nM}$) e la 1,3-di-(2-tolil)-guanidina (DTG) ($K_i \sigma_1 = 27.7 \text{ nM}$; $K_i \sigma_2 = 12.8 \text{ nM}$). Per quanto riguarda i ligandi selettivi, AC-915, Spipethiane, PD-144418, SA-4503 mostrano selettività per il recettore σ_1 mentre PB-28, CB-184, Ibogaina e Ifenprodil per il recettore σ_2 (**Fig.1.2**).

Ligandi comuni

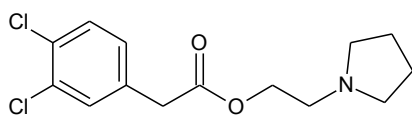


Aloperidolo

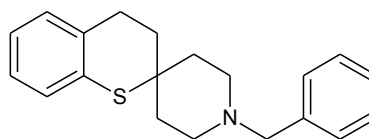


DTG

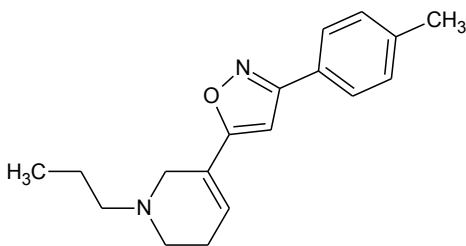
Ligandi sigma-1 selettivi



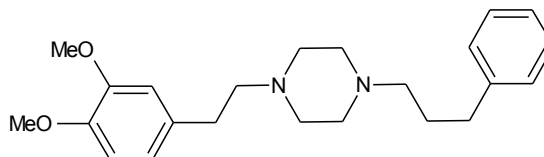
AC-915



Spipethiane

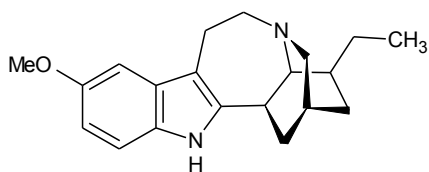


PD-144418

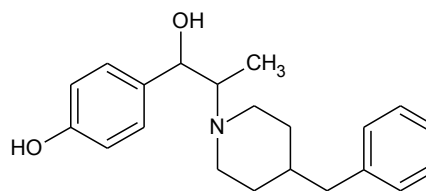


S A 4503

Ligandi sigma-2 selettivi



Ibogaina



Ifenprodil

Fig.1.2. Ligandi comuni e selettivi dei recettori sigma.

1.2. Recettore σ_1

1.2.1. Struttura del recettore σ_1

Il recettore σ_1 è farmacologicamente ben caratterizzato poiché si conoscono sia la sequenza aminoacidica che i ligandi selettivi. E' una proteina costituita da un singolo polipeptide di 223 aminoacidi, con una massa molecolare di 25-28 kDa, purificato e clonato per la prima volta nel 1996 da cellule epatiche di Guinea Pig [35]; successivamente è stata clonata e caratterizzata anche la proteina umana [36], di ratto [37] e di topo [38]. Si è visto che la sequenza aminoacidica del recettore σ_1 esibisce un'omologia maggiore del 90% in vari tessuti e specie di mammifero, indicando una importanza rilevante di tale recettori nella funzioni cellulari. Sono state proposte diverse strutture per il recettore σ_1 . Inizialmente si pensava ad un singolo dominio transmembrana [39], di recente Aydar e collaboratori hanno evidenziato che il recettore σ_1 nella membrana plasmatica presenta due segmenti transmembrana (uno vicino all'estremità N-terminale, l'altro verso il centro della proteina) con i domini N- e C- terminali sul lato citoplasmatico della membrana [40](Fig.1.3).

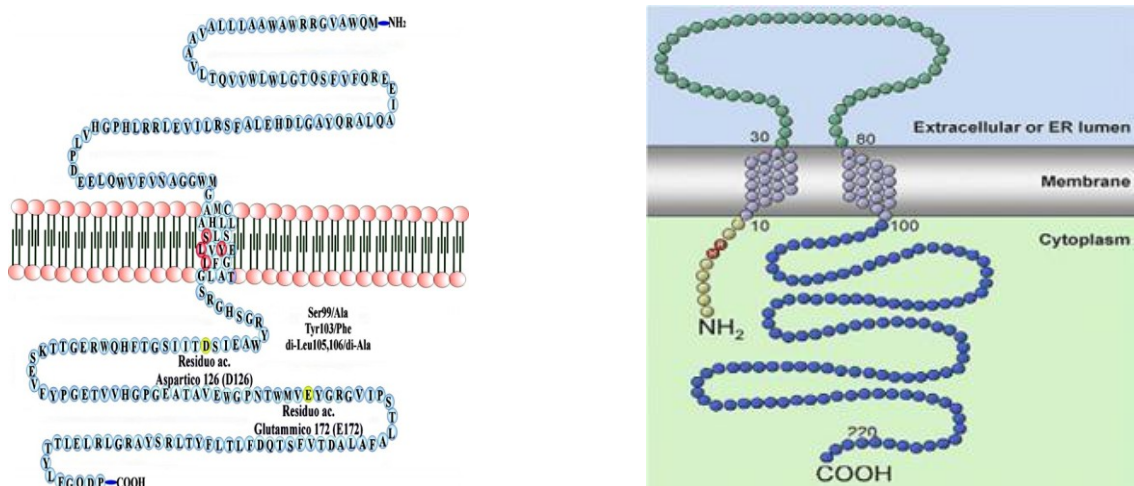


Fig. 1.3. Struttura del recettore σ_1 con singolo e con doppio dominio transmembrana.

Recentemente, oltre alle due regioni idrofobiche rappresentate dai due domini transmembrana, è stata ipotizzata l'esistenza di due segmenti idrofobici aggiuntivi, uno dei quali è parzialmente sovrapposto al secondo dominio transmembrana. Tali domini sono indicati come *steroid binding domain-like I* (SBDLI) e *steroid binding domain-like II* (SBDLII) e rappresentano un secondo sito di legame sul recettore σ_1 selettivo per ligandi a struttura steroidea (**Fig.1.4**) [41].

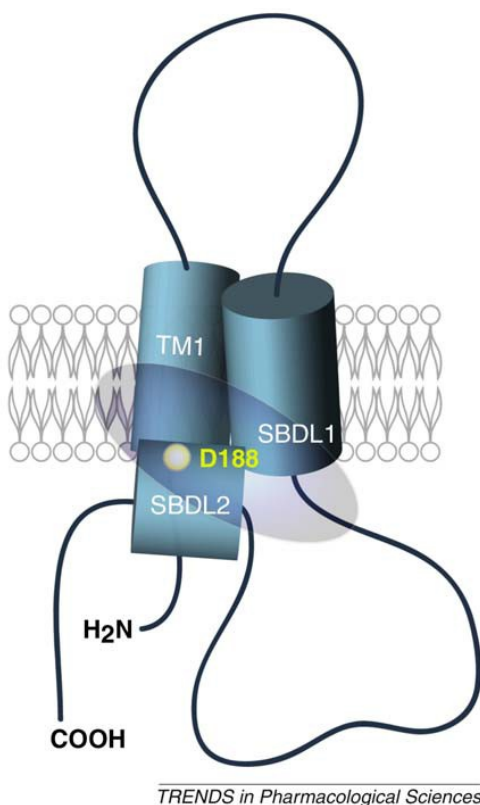


Fig.1.4 Modello del recettore σ_1 . L'area circolare include i domini idrofobici. Aspartato 188 (D188) in SBDL II è stato identificato come parte del sito di legame della cocaina.

La conoscenza della sequenza amminoacidica del recettore σ_1 ha permesso, mediante studi di *site-directed mutagenesis*, di individuare alcuni amminoacidi essenziali per l'interazione dei ligandi con il recettore. Sostituendo alcuni amminoacidi presenti nel dominio transmembrana, quali Ser⁹⁹ con Ala, Tyr¹⁰³ con Phe e due residui Leu¹⁰⁵ e Leu¹⁰⁶ con Ala, si assiste ad una diminuzione dell'affinità sia di agonisti che di antagonisti; ciò suggerisce un probabile ruolo critico di questa regione nell'interazione con i ligandi σ_1 . Il gene che codifica per il recettore σ_1 , lungo 7 Kpb e contenente 4 esoni e 3 introni, si trova localizzato sul cromosoma 9 nell'uomo e sul cromosoma 2 nei roditori. L'esone 2 codifica

per il dominio transmembrana[42]. Dal momento che una variante di *splicing* che manca dell'esone 3 non è in grado di legare ligandi σ è probabile che il dominio di legame con i suoi residui amminoacidici anionici sia situato in prossimità della regione codificata dall'esone 3 [43]. Il modello del recettore σ_1 prevede la disposizione del dominio di legame proposto in prossimità della porzione C-terminale intracellulare [40]. Esperimenti successivi hanno dimostrato che gli amminoacidi critici per il legame si trovano nella porzione C-terminale del recettore piuttosto che nel dominio transmembrana e corrispondono ai residui di Asp¹²⁶ e Glu¹⁷²[44].

1.2.2. Distribuzione anatomica cellulare e subcellulare del recettore σ_1

Al fine di caratterizzare la localizzazione del recettore σ_1 , sono state impiegate procedure radiografiche quali binding, tecniche autoradiografiche, di imaging e di Northern Blot, che hanno evidenziato la presenza del recettore in diverse aree del sistema nervoso centrale e in organi periferici [45].

I recettori σ_1 , a livello centrale, sono concentrati in specifiche aree implicate nella memoria, nelle funzioni motorie e sensoriali e nel sistema limbico. Una considerevole concentrazione di recettori σ_1 è stata riscontrata nell'ippocampo, specialmente nel giro dentato, nell'ipotalamo, nel bulbo olfattivo, in alcuni strati corticali, nel *locuscoeruleus*, nella *substantianigra*, nel nucleo rosso, in vari nuclei motori di nervi cranici e nella retina (**Fig. 1.5**). Il cervelletto non è particolarmente ricco di recettori σ_1 , sebbene una notevole quantità è stata evidenziata nello strato delle cellule del Purkinje. Oltre che a livello cerebrale, i recettori σ_1 sono anche numerosi nel midollo spinale, principalmente negli strati superficiali delle corna dorsali [46].

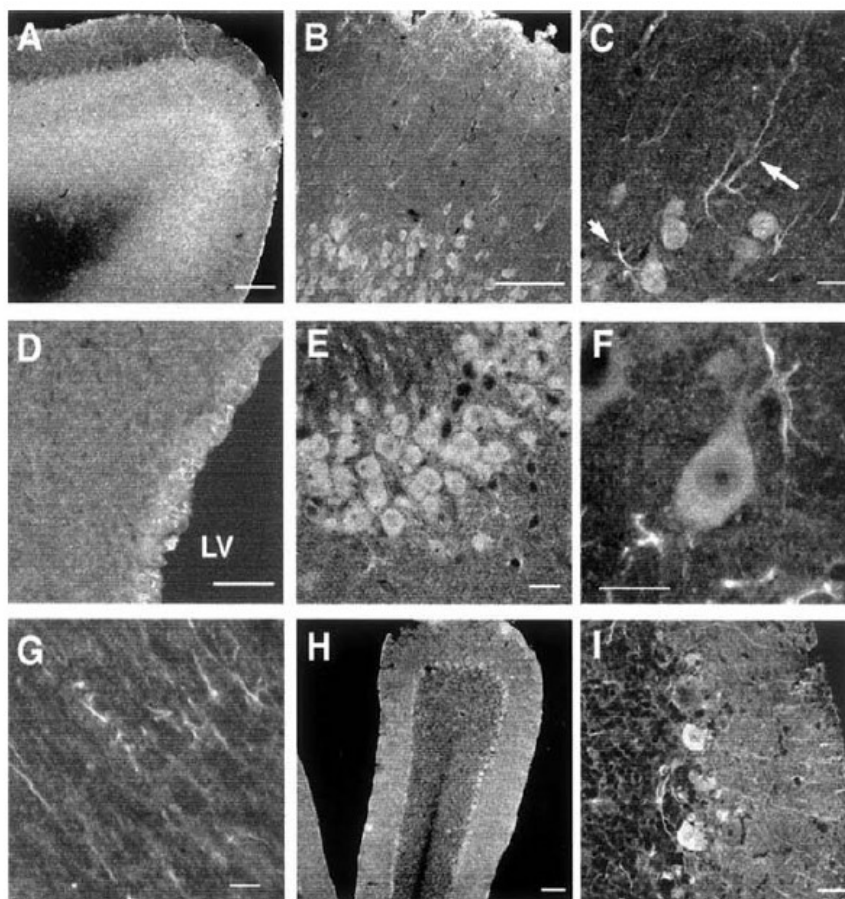


Fig. 1.5 Visualizzazione di recettori σ_1 nel cervello di ratti adulti tramite immunofluorescenza, con anticorpi anti- σ_1 e anticorpo secondario marcato con Alexa480. Le immagini sono state ottenute tramite microscopia confocale di fluorescenza. (A) bulbo olfattivo, (B-C) corteccia parietale (le frecce indicano i dendriti), (D) zona subventricolare (LV: ventricolo laterale), (E-F) ippocampo CA3, (G) corpus callosum, (H-I) cervelletto.

A livello periferico è stata osservata la presenza di recettori σ_1 in vari distretti. In particolare, sono presenti a livello cardiaco e più specificamente a livello del sistema parasimpatico che innerva il cuore e nei miociti, dove modulano la contrattilità e l'influsso di ioni calcio. Un'elevata densità di recettori σ_1 è presente anche nell'intestino, nella ghiandola surrenale, nella placenta, a livello polmonare, renale e della milza, in particolare nella zona delle cellule T. Risultati ottenuti mediante analisi *Northern Blot* evidenziano che gli mRNA codificanti i recettori σ_1 sono altamente espressi a livello del fegato, ipotizzando un'attività recettoriale simile a quella del citocromo P450. Alcune linee di cellule tumorali esprimono livelli di mRNA per il recettore σ_1 in maniera variabile.

La distribuzione sub-cellulare del recettore σ_1 è stata studiata mediante *binding* di radioligandi e più recentemente con metodi immunochimici. Gli esperimenti di *binding* con i radioligandi σ_1 [^3H](+)-SKF-10,047, [^3H](+)-3-PPP e [^3H](+)-

pentazocina mostrano che i recettori σ_1 sono situati in alcuni tipi di membrane cellulari nel topo, nel ratto e in *Guinea Pig*. I siti di *binding* sono abbondanti nelle membrane microsomiali in accordo con la presenza, nel recettore σ_1 clonato, della sequenza segnale per la ritenzione al reticolo endoplasmatico, ma sono anche presenti nella membrana nucleare, mitocondriale e sinaptica [47-49].

Studi immunostochimici hanno confermato l'esistenza del recettore σ_1 nel reticolo endoplasmatico, non solo a livello neuronale, ma anche in molte altre tipologie cellulari, quali oligodendrociti [50], cellule della retina [51] ed alcune cellule neoplastiche (**Fig. 1.6-1.7**).

Inoltre, è stato dimostrato come i recettori σ_1 siano associati a dei microdomini lipidici presenti nelle membrane cellulari ("*lipid rafts*") [52-53], coinvolti in processi importanti come il trasporto vescicolare, l'internalizzazione e l'accoppiamento dei recettori con le proteine coinvolte nella trasduzione del segnale [54].

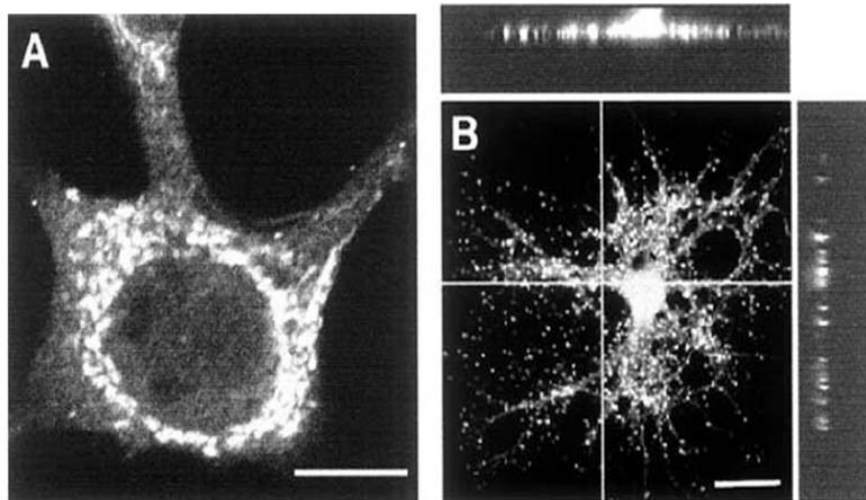


Fig. 1.6 Distribuzione dei recettori σ_1 , rilevata tramite immunofluorescenza. (A) in cellula NG-108. (B) in oligodendrocita maturo da cervello di ratto.

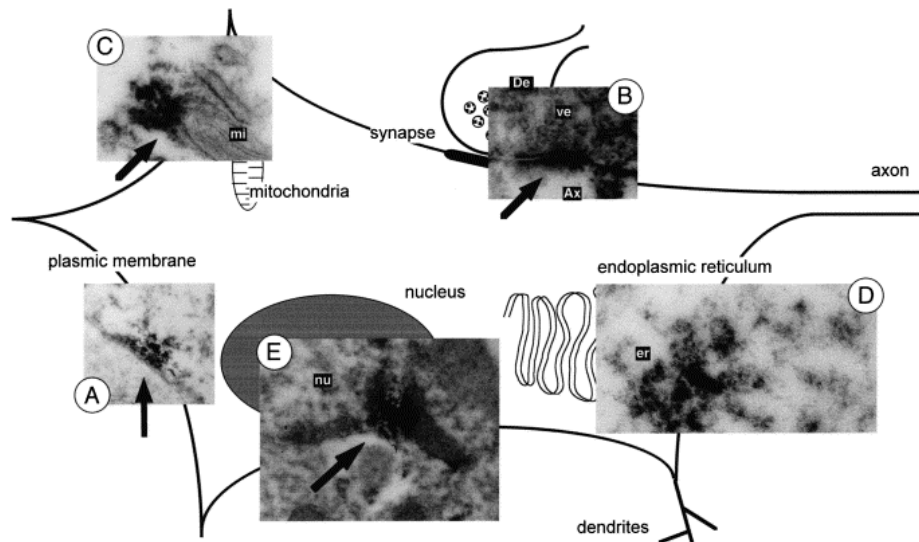


Fig. 1.7 Localizzazione subcellulare del recettore σ_1 in un neurone ipotalamico di topo C57B1/6.

1.2.3. Ligandi endogeni del recettore σ_1

Per meglio comprendere il ruolo dei recettori σ nelle funzioni fisiologiche e patologiche è utile l'identificazione dei ligandi endogeni di tale recettore.

I normali neurotrasmettitori, come serotonina, noradrenalina, dopamina ed istamina, non si legano al recettore; neanche aminoacidi come glutammato, cisteina, glicina ed aspartato oppure diversi peptidi quali le endorfine, le dinorfine, le encefaline e la sostanza P sono in grado di interagire con questa classe recettoriale.

E' stato suggerito un ruolo dei recettori σ nel metabolismo degli steroidi, in particolare dei neurosteroidi, grazie agli studi effettuati dal gruppo di ricerca di Su e coll., i quali hanno evidenziato una somiglianza del recettore σ con l'enzima Δ^{7-8} sterolo-isomerasi presente nei funghi, nonostante non sia stata riscontrata attività enzimatica o omologia con la Δ^{7-8} sterolo-isomerasi dei mammiferi [55].

I neurosteroidi, sintetizzati nel cervello a partire dal colesterolo o da altri precursori steroidei, sono ormoni che vengono immagazzinati ed agiscono localmente a livello delle cellule nervose [56-57] (**Fig.1.8**). Essi possiedono un'importante attività di neuromodulazione su diversi sistemi di neurotrasmissione situati a livello centrale, tra cui il sistema GABAergico, attraverso il recettore GABA_A[58]e quello glutammatergico [59-60] Inoltre rivestono un ruolo fondamentale nei processi di apprendimento e memoria[61].

L'interazione tra i neurosteroidi, quali progesterone, testosterone, deidroepiandrosterone (DEHA), pregnenolone solfato, β -estradiolo, ed i recettori σ_1 è stata suggerita per la prima volta nel 1988 a partire da studi in vitro condotti nel cervello di guinea pig. Tra gli steroidi testati, il progesterone risulta il più potente inibitore del binding di radioligandi σ_1 -specifici. L'ipotesi che i neurosteroidi possano rappresentare probabili ligandi σ_1 rimane discutibile perché l'affinità del progesterone, come ligando endogeno, non sembra essere abbastanza elevata. Inoltre, altri steroidi come deidroepiandrosterone solfato (DHEAS) e pregnenolone solfato mostrano bassa affinità per il recettore σ_1 , ma si comportano come agonisti nei confronti di tale recettore. Questi steroidi influenzano le risposte comportamentali mediate dai recettori σ_1 sia dopo somministrazione esogena sia dopo manipolazioni endocrine dei loro livelli endogeni [62-63-64].

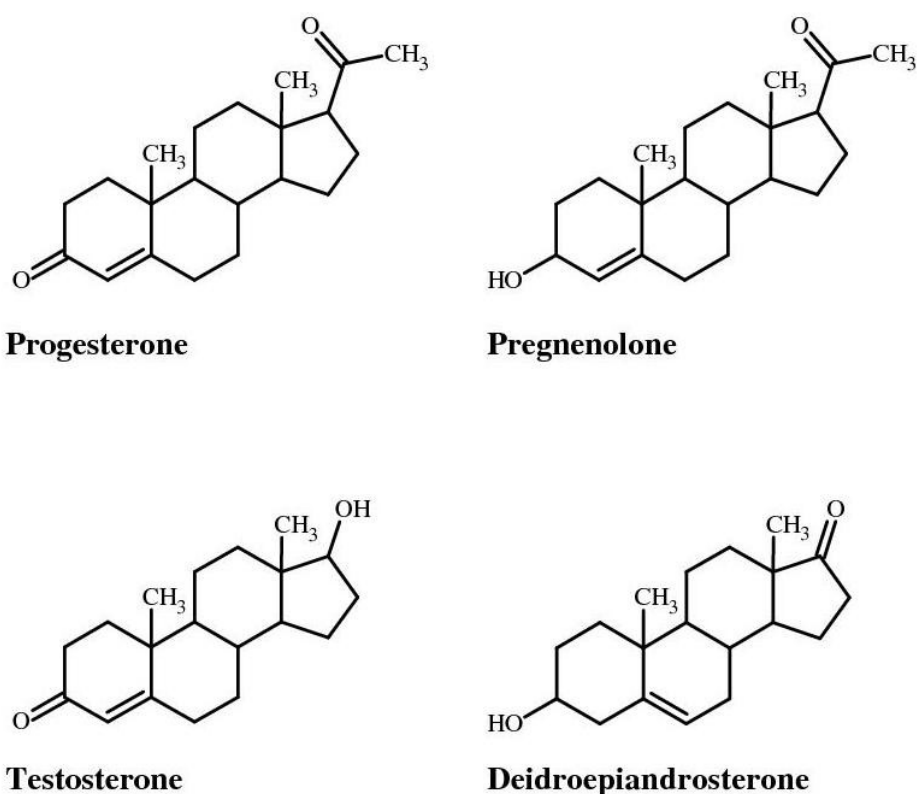


Fig.1.8 Struttura di alcuni neurosteroidi con affinità per il recettore σ_1 .

Recentemente, hanno suscitato notevole interesse alcune ammine endogene N-sostituite o N,N-disostituite, tra queste è stata evidenziata la N,N-

dimetiltriptamina (DMT) che ha mostrato una certa interazione con il recettore σ_1 (Fig. 1.9) [65-66-67].

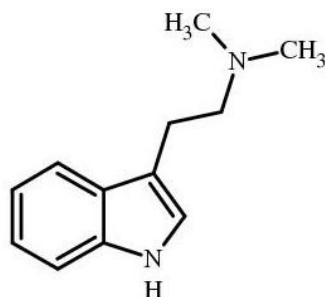


Fig. 1.9. *N,N-Dimetiltriptamina: 2-(1H-indol-3-il)-N,N-dimetiletanamina*

La DMT è prodotta da enzimi epatici nei mammiferi e a livello cerebrale nei roditori, mentre nell'uomo è stata trovata nel sangue, nel fluidocerebrospinale e nelle urine. Barker e coll. [68] hanno suggerito che tale molecola potrebbe essere sequestrata in vescicole di deposito a livello cerebrale e che la sua produzione potrebbe aumentare in caso di stress nei roditori. Studi di binding effettuati sul recettore σ_1 hanno evidenziato che rispetto al specifico ligando per il recettore σ_1 (+)-[3 H]-pentazocina, la triptamina, la fenetilamina e la tiramina, ammine non metilate, mostrano un'affinità per il recettore abbastanza scarsa. In maniera opposta, i derivati N,N-dimetilati di questi composti si legano al recettore σ_1 con maggiore affinità.

Inoltre queste sostanze, ad eccezione delle ammine N-metilate, non si legano al recettore σ_2 , confermando dunque le differenze funzionali e farmacologiche presenti tra i due recettori.

Poiché i ligandi ad alta affinità per il recettore σ_1 contengono un atomo di azoto legato ad una lunga catena alchilica, un altro gruppo di ricerca ha rivolto la propria attenzione verso alcune ammine endogene appartenenti alla famiglia degli sfingolipidi, come la D-eritro-sfingosina [69].

Per determinare se la sfingosina e i suoi derivati si legano al recettore σ_1 è stata testata la loro capacità di inibire il legame della [3 H]-(+)-pentazocina [59] eseguendo test di binding sulle membrane epatiche di Guinea Pig e sul recettore σ_1 purificato. In questo studio sono state testate la D-eritrosfingosina, la N,N-dimetil-sfingosina, la L-treo-sfingosina e la sfingenina

(analogo della D-eritro-sfingosina saturato al C4), le quali hanno mostrato un'inibizione del legame della [³H]-(+)-pentazocina sia nei saggi condotti col recettore σ_1 purificato sia in quelli condotti con le membrane epatiche di guinea pig. Questo studio ha, inoltre, evidenziato che la sfingosina-1-fosfato, ottenuta a partire dalla sfingosina ad opera di un enzima appartenente alla famiglia delle sfingosina-chinasi, non si lega ai recettori σ . Questa selettività di legame della sfingosina rispetto al suo analogo fosforilato suggerisce, dunque, un meccanismo di regolazione dell'attività del recettore σ_1 ad opera delle sfingosina-chinasi. I risultati ottenuti da Ramachandran e coll.[69] sostengono che la sfingosina possa essere un modulatore endogeno del recettore σ_1 (Fig.1.10).

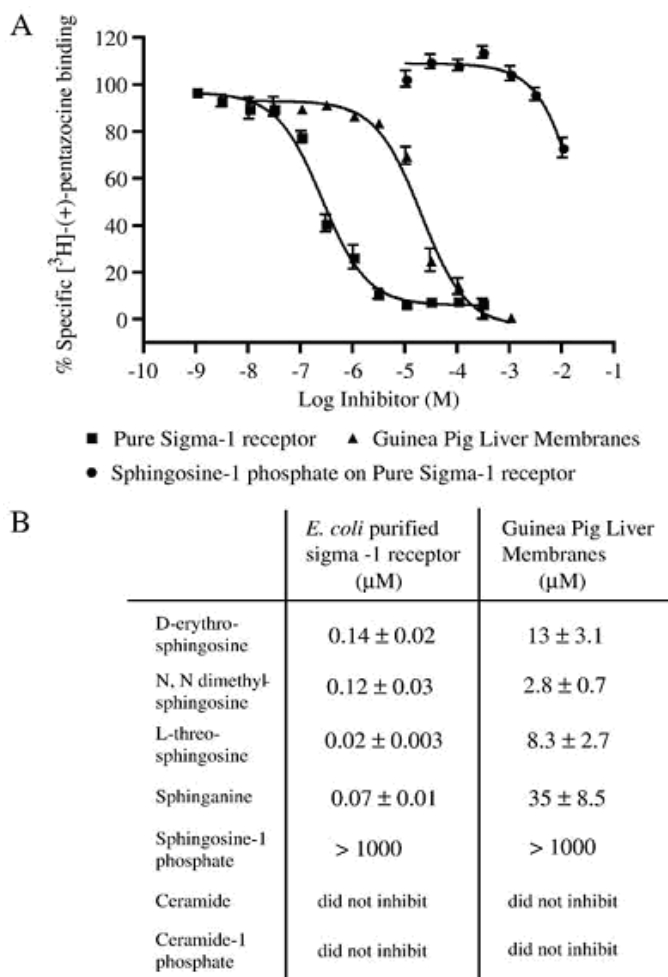


Fig. 1.10 Interazione dei derivati della sfingosina con il recettore σ_1 purificato. **A.** Inibizione del binding della [³H]-(+)-pentazocina da parte della D-eritro-sfingosina. **B.** I valori di K_i degli altri derivati della sfingosina mostrano affinità per il recettore σ_1 .

1.2.4. Ruoli fisiologici del recettore σ_1

Nonostante numerose questioni riguardanti i recettori σ_1 siano ancora irrisolte, è ormai accertato il loro ruolo modulatore nell'ambito di numerosi processi cellulari. Una delle azioni prevalenti del recettore σ_1 è la regolazione dell'attività dei canali ionici sia voltaggio- che ligando- dipendenti, tra cui i canali per Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , i recettori NMDA e i recettori per l'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP_3R).

È stato evidenziato che i recettori σ_1 sono direttamente associati con i canali del potassio [70-71] come risulta dalla loro co-immunoprecipitazione, o interagiscono con essi attraverso componenti associati alla faccia interna della membrana, senza il coinvolgimento di secondi messaggeri. Ciò spiega la riduzione delle correnti del potassio in cellule melanotropiche di rana [72-73] in seguito all'azione degli agonisti selettivi JO-1784 e (+)-pentazocina, effetti ridotti dagli antagonisti σ_1 come NE-100 o l'aloiperidolo.

È stato anche visto che i recettori σ_1 possono incrementare la neurotrasmissione colinergica [74-75] e serotoninergica [76], modulare negativamente il sistema GABAergico [77-78], diminuire il *release* di noradrenalina [79] e modulare la trasmissione [80]. Hanno anche la capacità di potenziare la trasmissione glutammatergica [81] in quanto gli agonisti σ_1 incrementano il *release* spontaneo di glutammato nell'ippocampo e quello indotto dal *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) [82] potenziano l'incremento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a livello piramidale e facilitano la *long term potentiation* (LTP) nell'ippocampo del ratto.

È stato inoltre dimostrato che i ligandi σ_1 riescono a modulare i canali del calcio voltaggio-dipendenti (VOC). Ciò è stato suggerito da studi in cui l'incremento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (concentrazione di calcio intracellulare), mediata dalla depolarizzazione, diminuisce in seguito all'azione dei ligandi σ in colture neuronali [83-84]. In alcuni di questi esperimenti, σ_1 agonisti e σ_1 antagonisti producono lo stesso effetto, probabilmente per la partecipazione del recettore σ_2 .

Va inoltre evidenziato il coinvolgimento del recettore σ_1 in alcune vie di trasduzione del segnale, come quella che riguarda la fosfolipasi-C, la proteina chinasi-C e l'inositolo 1,4,5-trifosfato (PLC/PKC/ IP_3).

Numerosi studi condotti da Hayashi e Su hanno evidenziato il meccanismo molecolare secondo il quale i recettori σ_1 regolano le concentrazioni di calcio intracellulare attraverso un'interazione con il recettore per l'IP3 (IP3R) [85]. Inizialmente è stato proposto un meccanismo di regolazione dei livelli di calcio in cui era coinvolto un complesso trimerico costituito dall'IP3R, il recettore σ_1 (sig-1R) e l'ankirina B, una proteina adattatrice presente nella membrana plasmatica, nel reticolo endoplasmatico (ER) e nell'apparato del Golgi che agisce direttamente sull'organizzazione dei canali ionici, insieme al recettore per l'IP3.

In presenza di un agonista σ_1 , come la (+)-pentazocina, il complesso trimerico si dissocia liberando il dimero ankirina/sig-1R, il quale trasloca dal reticolo endoplasmatico alla membrana plasmatica o nucleare. In questo modo aumenta il *binding* dell'IP3 per il suo recettore, determinando un incremento dell'efflusso di ioni Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico. Al contrario, in presenza di un antagonista σ_1 , come NE-100, il recettore σ_1 si dissocia dall'ankirina, lasciando quest'ultima ancorata al reticolo endoplasmatico insieme al recettore per l'IP3, con conseguente riduzione dell'efflusso di ioni Ca^{2+} (**Fig. 1.11**).

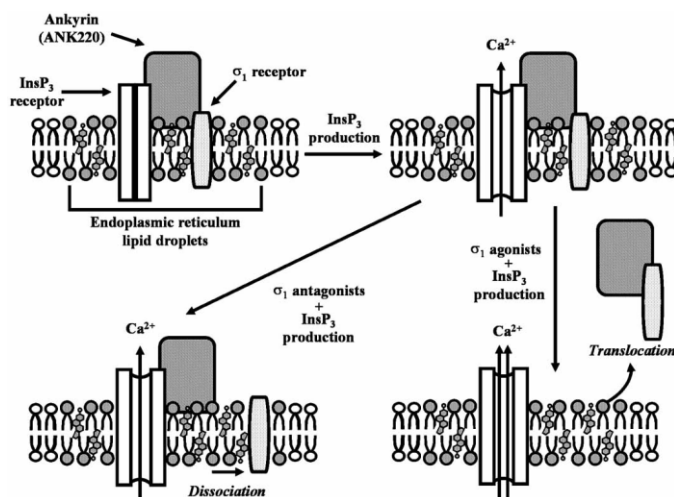


Fig. 1.11 Modello di modulazione del recettore σ_1 sull'efflusso di Ca^{2+} mediato dall'IP3.

Successivamente, lo stesso Hayashi ha evidenziato l'importante ruolo che riveste l'associazione fisica tra il reticolo endoplasmatico (RE) e il mitocondrio, meglio conosciuta come *mitochondria-associated ER membrane* (MAM) [86].

Tale associazione sembra essere vitale nella regolazione del *signaling* del Ca^{2+} e nel metabolismo energetico in quanto all'interno dei mitocondri l'aumento dei

livelli di calcio porta all'attivazione del ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e all'incremento della produzione di ATP.

È stato postulato che il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico verso il mitocondrio avviene mediante l'attivazione dei recettori per l'IP₃, particolarmente abbondanti nella MAM. Il recettore σ_1 esplica la funzione di *chaperone* molecolare in maniera calcio-dipendente, stabilizzando, così, la conformazione di IP₃R₃ sull'interfaccia della MAM. Studi di *immunoblotting*, attraverso il legame della *yellow fluorescent protein* (EYFP) al recettore σ_1 , hanno evidenziato che, sul reticolo endoplasmatico, esso forma un complesso con numerose proteine come BiP (*binding immunoglobulin protein*, *chaperone* regolato dal glucosio, detto anche GRP78) e IP₃R₃. A concentrazioni fisiologiche di calcio ($\geq 0,5$ mM) il complesso Sig-1R-BiP è in uno stato quiescente e il recettore σ_1 non esplica alcuna funzione di *chaperone* molecolare. Al contrario, quando la concentrazione di calcio all'interno del reticolo endoplasmatico si abbassa si ha una rapida dissociazione del recettore σ_1 dalla BiP, con conseguente aumento della sua attività di *chaperone*. Tale deplezione di calcio si verifica, generalmente, in seguito a condizioni di stress del reticolo endoplasmatico, causate, ad esempio, dall'azione della taspigargina (TG), un inibitore della calcio-ATPasi e noto stressore del reticolo endoplasmatico. L'attivazione di questo sistema permette un'efficiente risposta al decremento di calcio che spesso si verifica durante la trasduzione del segnale (**Fig. 1.12**).

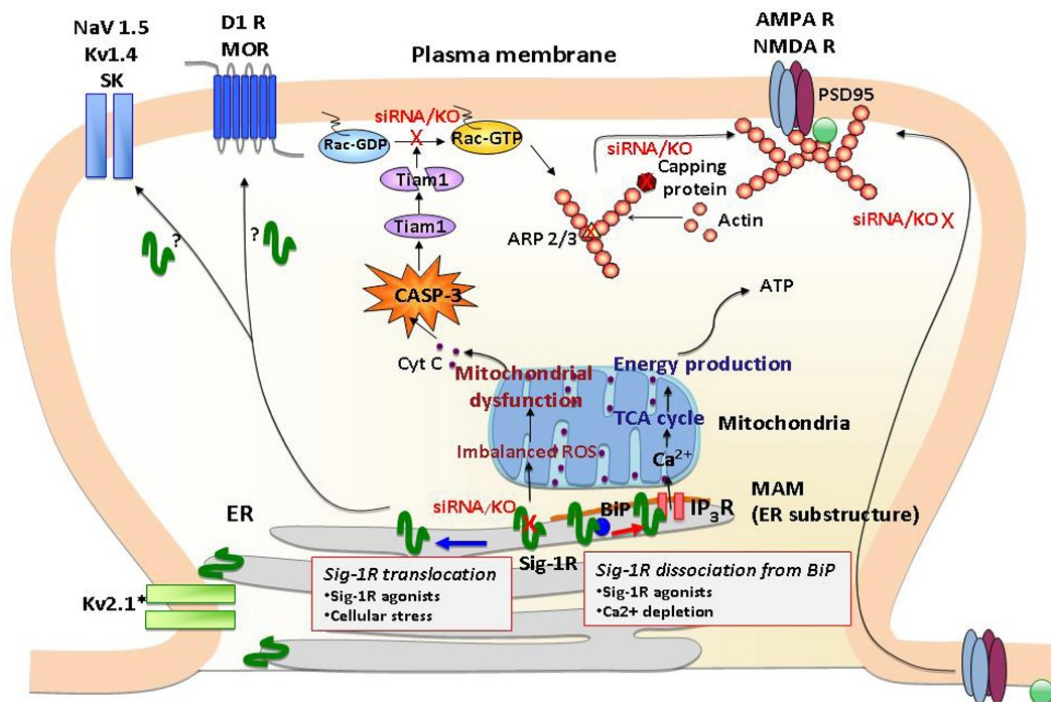


Fig.1.12 Recettore σ_1 come chaperone molecolare. All'interfaccia della MAM, i recettori σ_1 , con l'aiuto di agonisti, si dissociano da Bip e interagiscono con IP_3 , migliorando il signaling del Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico al mitocondrio. In tal modo incrementano la produzione di ATP mitocondriale attraverso il ciclo degli acidi tricarbossilici.

E' importante notare che la (+)-pentazocina, la cocaina e tutti gli agonisti del recettore σ_1 , applicati a concentrazioni prossime ai valori della loro K_i , inducono la dissociazione dei recettori σ_1 dallo chaperone BiP e permettono ai recettori di agire come chaperoni sui recettori IP_3 , stabilizzandoli sulla MAM e aumentando il signaling di Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico al mitocondrio. Quando la concentrazione degli agonisti raggiunge, invece, valori 10 volte la propria K_i , i recettori σ_1 traslocano dalla MAM alla membrana plasmatica, dove inibiscono vari canali ionici interagendo direttamente con essi [87] (Fig.1.12).

Gli antagonisti σ_1 come NE-100 o aloperidolo, invece, non influenzano di per sé l'associazione Sig-1R-BiP, piuttosto ne inibiscono la dissociazione causata dagli agonisti σ_1 .

Il recettore σ_1 , presente a livello della MAM, è implicato nel mantenimento dell'integrità mitocondriale, attenuando la formazione delle specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e favorendo la trascrizione del gene Bcl-2, il quale codifica per una proteina antiapoptotica [87].

1.2.5. Potenzialità terapeutiche del recettore σ_1

L'utilità dei ligandi σ_1 in differenti campi terapeutici è dovuta all'elevata distribuzione dei recettori σ_1 nel SNC ed ai loro effetti modulatori a livello cellulare, biochimico e neurotrasmettitoriale.

Coinvolgimento del recettore σ_1 nei processi di apprendimento e memoria

Le neurotrasmissioni colinergica e glutammatergica giocano un ruolo fondamentale nelle funzioni di apprendimento e memoria. In alcune patologie della memoria, come il morbo di Alzheimer e l'invecchiamento patologico, è stato osservato un deficit dell'attività colinergica corticale [88]. Le disfunzioni nell'apprendimento, indotte da disfunzioni colinergiche, sono attenuate o invertite da alcuni agonisti σ_1 come la (+)-pentazocina, JO-1874 e SA4503 [89]. In aggiunta, i recettori NMDA sono coinvolti nell'induzione di diverse forme di plasticità sinaptica (come la LTP) che sembrano essere importanti per i processi di apprendimento e memoria [90]. A tal proposito, è stato visto che i recettori σ_1 non sono coinvolti nelle funzioni della memoria in condizioni fisiologiche, ma modulano i processi di apprendimento e memoria quando è presente uno squilibrio patologico o farmacologico. Evidenze sperimentali suggeriscono che gli agonisti σ_1 sono efficaci nell'attenuare i deficit dell'apprendimento in alcuni modelli animali. Monnet e Debonnel [91-92] hanno studiato l'effetto di agonisti e antagonisti del recettore sigma-1 sul *firing* neuronale di neuroni della regione CA3 dell'ippocampo indotto dall'attivazione del recettore NMDA in ratti anestetizzati. I dati sperimentali hanno dimostrato che gli agonisti, come la (+)-*cis*-pentazocina, potenziano il *firing* neuronale mentre gli antagonisti, come aloperidolo, NE-100 o BMY-14802 lo riducono, mettendo in evidenza il potenziale ruolo che gli agonisti σ_1 possono avere nella riduzione dei deficit mentali e nelle alterazioni della memoria indotti dai bloccanti del recettore NMDA (es. MK-801).

Schizofrenia e recettore σ_1

Per la loro localizzazione a livello del SNC e la loro capacità di influenzare la neurotrasmissione dopaminergica e glutammatergica, i recettori σ_1 sembra giochino un ruolo nella fisiopatologia della schizofrenia. L'ipotesi dopaminergica della schizofrenia rimane l'ipotesi principale nella fisiopatologia di questo disordine che presenta principalmente sintomi positivi. Inoltre è importante considerare il sistema glutammatergico. Infatti il blocco dei recettori NMDA da parte della PCP induce nell'uomo psicosi simili alla schizofrenia. Poiché numerosi antipsicotici possiedono alta o moderata affinità nei confronti del recettore σ_1 , gli studiosi sono stati spinti ad utilizzare ligandi σ_1 in numerosi modelli animali di schizofrenia. La sintesi di composti ad elevata selettività nei confronti del recettore σ_1 ha permesso di studiare in maniera più approfondita il coinvolgimento di questi recettori nella schizofrenia. In modelli farmacologici di schizofrenia gli antagonisti σ_1 inibiscono la sensibilizzazione alla metamfetamina e alla cocaina, suggerendo che tali composti potrebbero essere utili per il mantenimento della terapia in soggetti schizofrenici [93].

Ruolo del recettore σ_1 nell' ansia e nella depressione

Per la loro capacità di modulare molti sistemi neurotrasmettitoriali e di legare alcuni antidepressivi, i recettori σ_1 sono stati anche studiati come possibili strumenti farmacologici nei disturbi dell'umore. A tal riguardo, una considerazione di notevole importanza è che gli agonisti σ_1 mostrano effetti antidepressivi in numerosi modelli comportamentali, probabilmente perché migliorano le funzioni neuronali serotoninergiche e glutammatergiche così come la loro azione neurotrofica [94]. Grazie al ruolo modulatore del recettore σ_1 , la progettazione di farmaci con affinità sia per il recettore σ_1 che per altri recettori correlati alla depressione e il trattamento combinato tra agonisti σ_1 e farmaci antidepressivi conosciuti, potrebbe offrire buone prospettive in termini di efficacia.

L'attività ansiolitica dei ligandi σ_1 è stata riportata in modelli sperimentali in cui SKF-10,047, JO-1784 e neurosteroidi come pregnenolone e DHEAS attenuavano la soppressione motoria indotta da precedenti shock elettrici. In più

gli effetti degli agonisti σ_1 sulla soppressione motoria venivano invertiti dagli antagonisti σ_1 conosciuti come NE-100 e progesterone.

Recettore σ_1 e sostanze d'abuso

Tra i vari ruoli svolti dai recettori σ_1 è possibile menzionare il loro coinvolgimento negli effetti indotti dalle sostanze d'abuso. Infatti, molte di queste sostanze, quali oppioidi, cocaina, amfetamine e fenciclidine, mostrano un'affinità significativa per i recettori σ_1 ed inoltre l'azione svolta da altre sostanze d'abuso, come alcol e nicotina, può essere modulata da ligandi σ , anche se tali sostanze non interagiscono con il recettore stesso [95]. Nell'ambito delle droghe, la cocaina rappresenta la sostanza più abusata nel mondo. Il suo meccanismo d'azione prevede l'inibizione del trasportatore delle monoammine neuronali ed in modo particolare del sistema di ricaptazione della dopamina a livello dei neuroni mesolimbici. La cocaina media, dunque, un rapido e massivo incremento della neurotrasmissione dopaminergica ed inoltre innesca una serie di modifiche adattative in numerosi circuiti neuronali sottostanti alle proprietà di rinforzo, di ricompensa e di sensibilizzazione della cocaina. Tuttavia, la comprensione degli effetti cocaina-indotti risulta notevolmente complessa per via dei numerosi sistemi biologici implicati, tra questi si ricordano i recettori σ_1 .

L'ipotesi iniziale del coinvolgimento del recettore σ_1 negli effetti mediati dalla cocaina nasce dal fatto che tale droga interagisce con il recettore σ_1 a concentrazione analoga a quella richiesta per inibire il trasportatore della dopamina (DAT), suo principale target farmacologico. La rilevanza fisiologica dell'interazione della cocaina al recettore σ_1 viene inoltre dimostrata dalla capacità degli antagonisti σ_1 di mitigare le azioni della cocaina [96].

Matsumoto e coll. hanno mostrato che il blocco dei recettori σ_1 con antagonisti come aloperidolo, BD 1008 ed BMY 14802 è in grado di inibire significativamente le convulsioni e gli effetti letali indotti da dosi tossiche di cocaina. L'abilità di tali composti di attenuare gli effetti acuti cocaina-indotti sull'apparato locomotore è spesso usata negli studi iniziali di *screening* per evidenziare gli agenti in grado di bloccare l'attività psicostimolante di tale droga. Particolarmente interessanti sono gli studi condotti sui nuovi antagonisti

σ_1 LR132 e YZ-011 nei quali viene mostrata la capacità di tali composti di attenuare nel topo l'effetto letale cocaina-indotto dopo *overdose*, suggerendone una potenziale applicazione clinica. L'antagonismo funzionale del recettore σ_1 può anche essere realizzato attraverso l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (ODN), i quali sono in grado di ridurre il numero dei recettori σ_1 e quindi di attenuare le convulsioni e l'iperattività motoria indotte dalla cocaina [97].

E' stata ipotizzata l'esistenza di un'interazione molecolare e funzionale tra il recettore σ_1 e il recettore D_1 .

In un recente studio condotto da Navarro e coll., mediante l'utilizzo di tecniche BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer-based*) in combinazione con la tecnica BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*), viene documentata l'esistenza di una reale interazione molecolare tra i due recettori. Nello studio condotto vengono effettuate delle misure dei segnali BRET in cellule HEK-293T cotrasfettate con cDNAs per il recettore σ_1 fuso con *la Renilla Luciferasi* (σ_1 R-Rluc), con cDNAs per il recettore D_1 fuso con la *Yellow Fluorescence Protein* (YFP) nella porzione N-terminale e con cDNAs per il recettore D_1 fuso con YFP nella porzione C-terminale (D_1 R-nYFP e D_1 R-cYFP). In tali cellule viene quindi valutato il segnale BRET tra il σ_1 R-Rluc come donatore e tra l'omodimero ricostituito D_1 R-nYFP- D_1 R-cYFP come accettore. Si assiste alla formazione di un eterotrimerico σ_1 R- D_1 R- D_1 R che viene dimostrata da un segnale BRET positivo, tipicamente assente in cellule che esprimono σ_1 R, D_1 R-nYFP e cYFP o σ_1 R, D_1 R-cYFP e nYFP [98](Fig. 1.13).

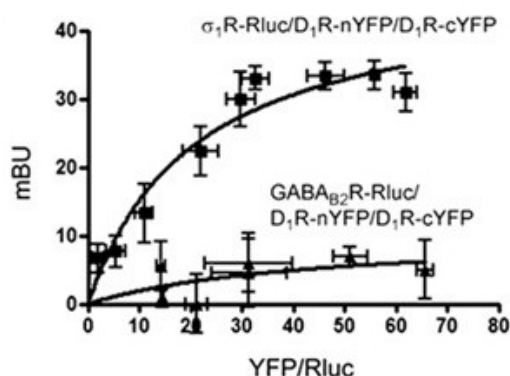


Fig.1.13 Segnale BRET ottenuto utilizzando cellule HEK-293T cotrasfettate con cDNA σ_1 -R-Rluc o cDNA GABA_{B2}-R-Rluc come controllo negativo.

Attraverso i segnali BRET positivi, dovuti alla ricostituzione della YFP associata alle estremità dei due recettori D_1 , ed inoltre attraverso la tecnica BiCF viene validata l'ipotesi dell'interazione tra i recettori σ_1 e D_1 (Fig. 1.14).

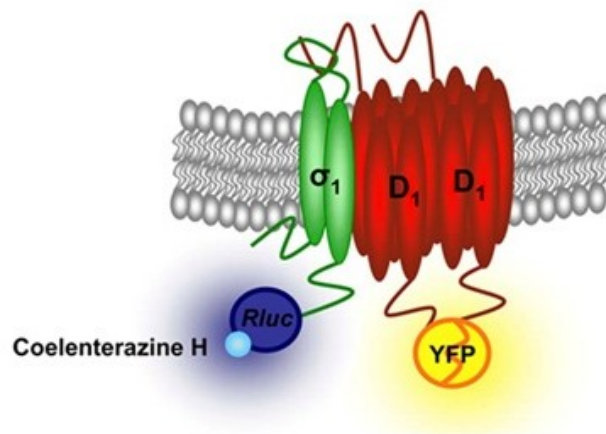


Fig.1.14 Rappresentazione schematica dell'eteromerizzazione dei recettori D_1 e σ_1 in living cells.

L'interazione recettoriale descritta permette di comprendere come i recettori σ_1 siano coinvolti nei meccanismi di rinforzo della cocaina.

Infatti, studi condotti su cellule di CHO, cotrasfettate con cDNA per il recettore D_1 e con siRNA per il recettore σ_1 , hanno permesso di dimostrare che la somministrazione di cocaina, in presenza di un agonista pieno del recettore D_1 , potenzia l'incremento della concentrazione di cAMP agonista D_1 -indotta.

La cocaina agisce, dunque, mediante due differenti meccanismi: il primo DAT-dipendente che porta ad un incremento dei livelli di dopamina, il secondo dipendente dai recettori σ_1 che facilita la neurotrasmissione mediata dal recettore D_1 . Si può concludere dicendo che l'eteromero σ_1 - D_1 può essere considerato un target nel trattamento dell'assuefazione da cocaina e che gli antagonisti del recettore σ_1 possono inibire alcuni comportamenti derivanti dall'abuso da tale droga.

Alla luce di quanto descritto, sembra essere chiaro che gli agonisti σ_1 rappresentano un promettente *tools* farmacologico per i disturbi di ansia, depressione, apprendimento e memoria. Allo stesso tempo alcune scoperte suggeriscono che gli antagonisti σ_1 potrebbero essere potenzialmente utili contro i sintomi della schizofrenia e contro gli effetti deleteri delle droghe d'abuso.

1.2.6. Modello farmacoforico del recettore σ_1

Modello farmacoforico di Gund

Nel 1991 Gund e Sukla presentarono un modello farmacoforico del recettore σ_1 che si basava su quello proposto da Manallack [99] ma riguardava ligandi che non contenevano atomi di azoto o anelli benzenici, come il progesterone. Questo modello è stato formulato prima che si differenziassero i sottotipi recettoriali e nonostante ha evidenziato importanti siti per il *binding* dei ligandi σ non può essere preso in considerazione. Nel 2004 Gund e coll [100] presentano un nuovo modello farmacoforico specifico per il recettore σ_1 .

Utilizzando il programma di *molecular modeling* Sybyl V6.5, lo studio è stato condotto per ciascuna molecola considerando le conformazioni a più basso livello energetico. Questo modello applica il metodo di Lloyd ed Andrews [101] secondo il quale si considera un modello strutturale comune per tutti i composti attivi sul sistema nervoso centrale, costituito da due gruppi di *binding* primario: un anello aromatico ed un atomo di azoto. Da queste ipotesi si è ottenuto un farmacoforo caratterizzato dai punti R1, R2, R3, da un centroide, localizzato su un carbonio dell'anello aromatico e da un atomo di N. I primi due sono costruiti rispettivamente sopra e sotto l'anello benzenico ad una distanza di 3.5 Å e rappresentano l'interazione idrofobica dell'anello aromatico con il recettore; R3 è invece posto a una distanza di 2.8 Å dall'atomo di azoto e rappresenta il sito del recettore deputato all'interazione con tale atomo protonato, mediante un legame a idrogeno.

Il modello di Gund considera anche la presenza di un atomo elettronegativo, come ossigeno o zolfo tra l'anello aromatico e l'atomo di azoto, capace di influenzare l'affinità di legame di ligandi σ_1 molto potenti (Spipethiane, PD144418). Questi gruppi sono responsabili dell'interazione dei ligandi con siti di *binding* secondario.

I composti impiegati per sviluppare il modello farmacoforico per il recettore σ_1 sono stati scelti sulla base della potenza, selettività e diversità strutturale (**Fig.1.15**).

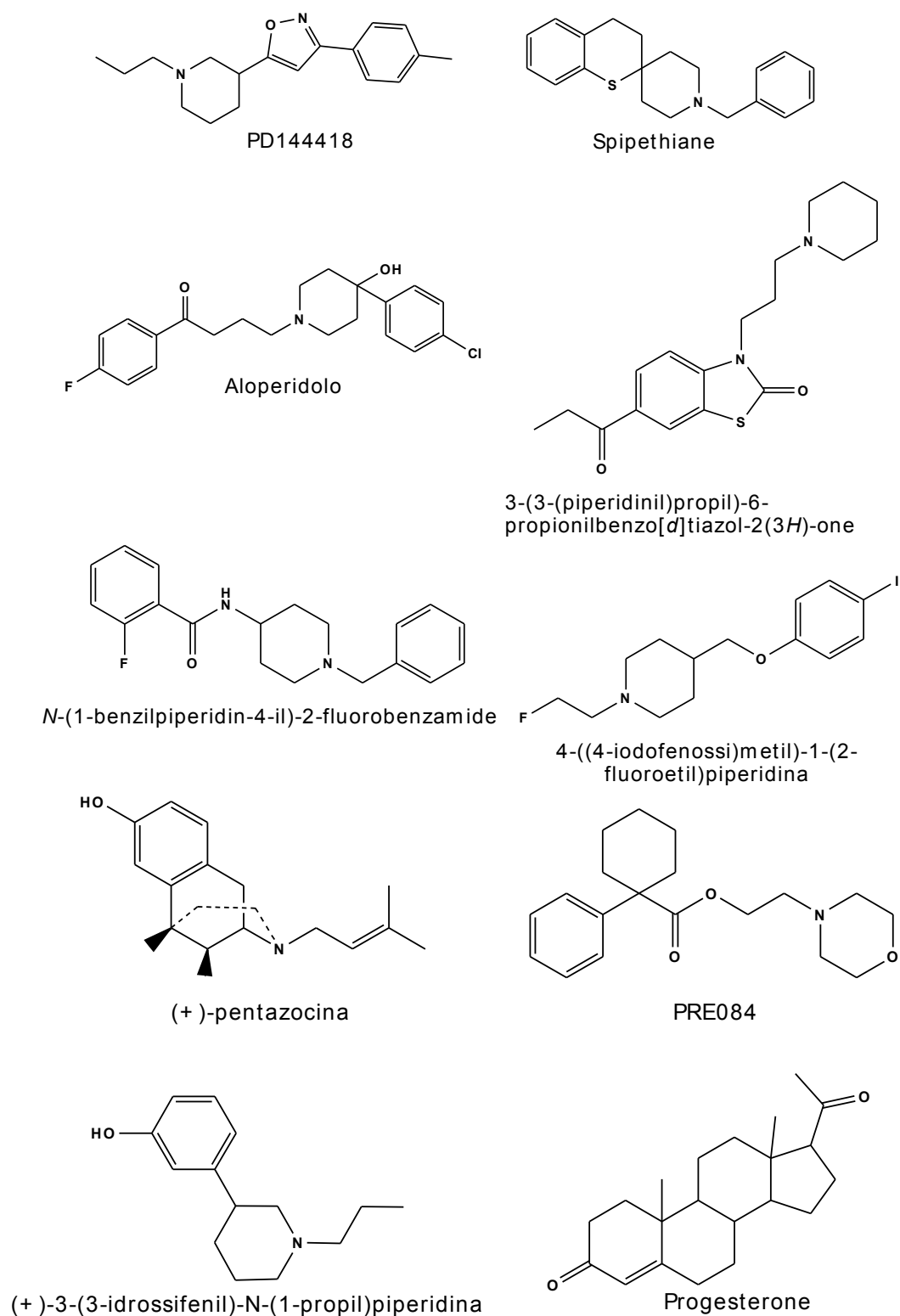


Fig.1.15 Derivati ad attività σ impiegati per la realizzazione del modello farmacoforico.

Sovrapponendo le varie molecole, si sono ricavate le coordinate dei cinque punti ipotetici del modello farmacoforico relativo al recettore σ_1 : R1 (0.85, 7.26, 0.30), R2 (5.47, 2.40, -1.51), R3 (-2.57, 4.81, -7.10), l'atomo di azoto (-0.71,

3.29, -6.40) e il C-center (centroide dell'anello aromatico, di coordinate 3.16, 4.83, -0.60). La distanza tra il C-center e l'atomo di azoto è di 7.14 Å; tra il C-center e R3 di 8.66 Å; tra R3 e l'azoto di 2.80 Å. Gli angoli R1-C-N e C-N-R3 hanno rispettivamente i valori 90.21° e 119.78°, mentre l'angolo diedro R1-C-N-R3 è di 12.00°. In questo modello farmacoforico i siti di *binding* secondario occupati dagli atomi elettronegativi, come l'atomo di ossigeno di PD 144418, l'ossigeno carbonilico dell'aloiperidolo e l'atomo di zolfo dello spipethiane, possiedono le seguenti coordinate (2.33, 5.08, -4.18); la distanza O-C-center è di 3.68 Å, la distanza O-N di 4.17 Å e l'angolo C-O-N è di 130.71° (**Fig.1.16**)

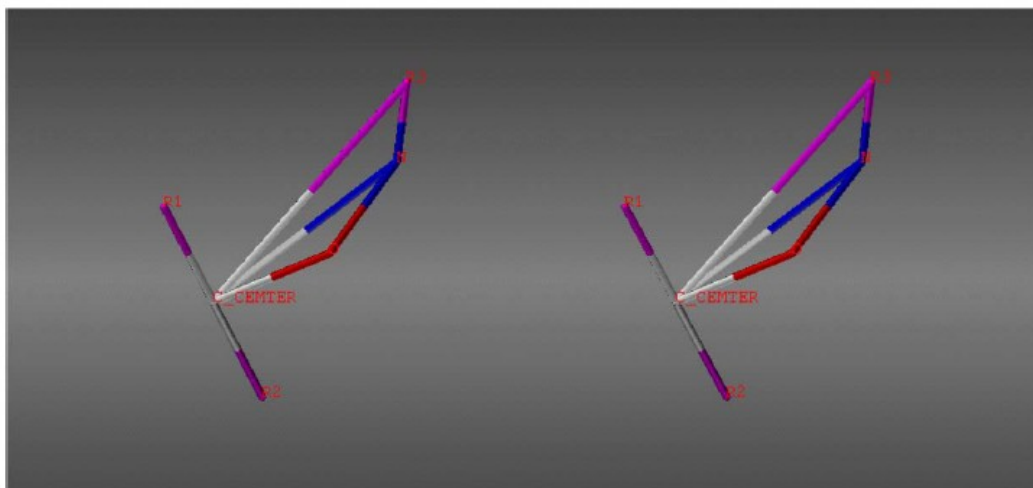


Fig.1.16 Modello farmacoforico del recettore σ_1 Distanze: C-center-N: 7.14 Å; C-center-R3: 8.66 Å; O-N: 4.17 Å; Angoli: R1-C-center-N: 90.21°; C-N-R3: 119.78°; C-O-N: 130.71°; Angolo diedro R1-C-center-N-R3: 12.00°.

Considerando che il modello di Gund tiene conto dei siti di *binding* primario e secondario, affinché un composto presenti un'elevata affinità σ_1 , esso deve adattarsi ad entrambi i siti di *binding*.

Tutte le molecole esaminate mostrano un'ottima sovrapposizione con il modello farmacoforico ideato (**Fig.1.17**); PD144418 è il ligando σ_1 più potente tra i ligandi selettivi ed è quello che si adatta meglio al modello farmacoforico, mentre la pentazocina non si adatta così bene al modello ed infatti mostra una potenza minore rispetto al PD144418.

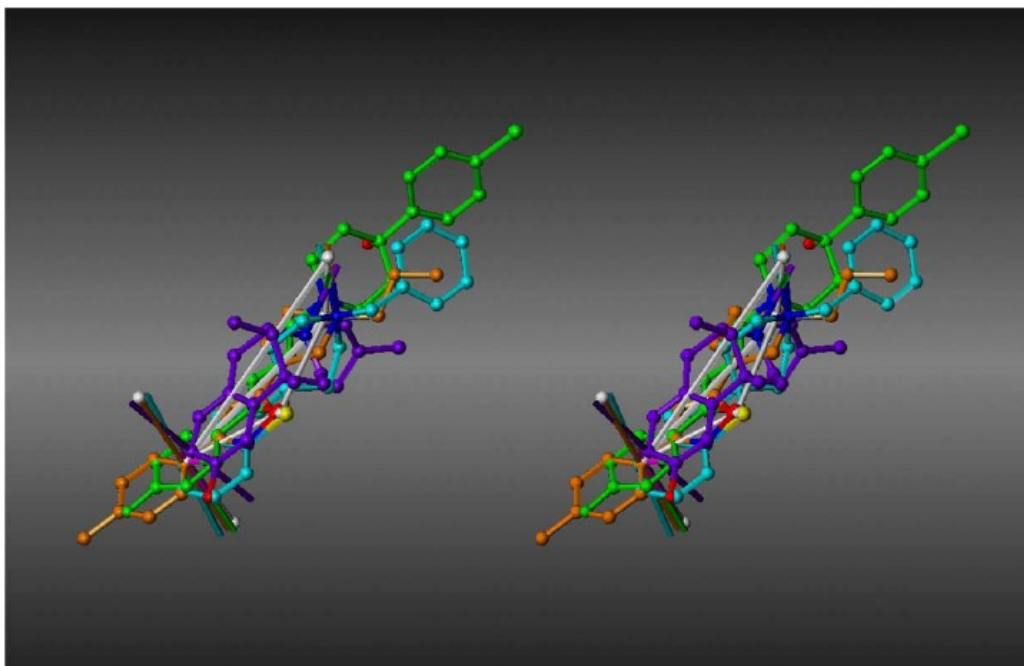


Fig.1.17 Visione stereoscopica della sovrapposizione dei conformeri scelti del 3-(1-piperidinoetil)-6-propilbenzotiazolin-2-one (arancione), N-(N-benzilpiperidin-4-il)-2-fluorobenzamide (azzurro), 1-(2-fluoroetil)-4-[(iodofenossi)metil]piperidina (giallo), (+)-PPP (viola), PRE084 (verde) e del progesterone (magenta) con il modello farmacoforico; gli atomi di azoto sono blu e gli atomi di ossigeno rossi.

Al fine di indagare sul modello 3D-QSAR dei ligandi σ_1 selettivi, lo stesso gruppo di ricerca ha portato avanti uno studio basato sul metodo CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*).

Per questo studio sono stati utilizzati un *training set* di 43 molecole e un *test set* di 5 molecole, tutte appartenenti a tre diverse classi strutturali: derivati dello Spipethiane, analoghi piperazinici e piperidinici e analoghi benzossazolonicici e benzotiazolici [102]

Attraverso un programma denominato DISCOtech (Distance Comparisons). è stato possibile trovare differenti conformeri delle molecole esaminate in limiti di energia ragionevoli (25 kcal/mol) e proporre un modello in accordo con quello precedentemente descritto dagli stessi ricercatori (**Fig.1.18**).

Tutti i farmacofori costruiti a partire dalle tre differenti classi strutturali di composti esaminati in questo studio CoMFA rappresentano un triangolo ai cui vertici sono rappresentati i tre elementi fondamentali:

- il centroide dell'anello aromatico;
- l'atomo di azoto;
- il *lone pair* di elettroni.

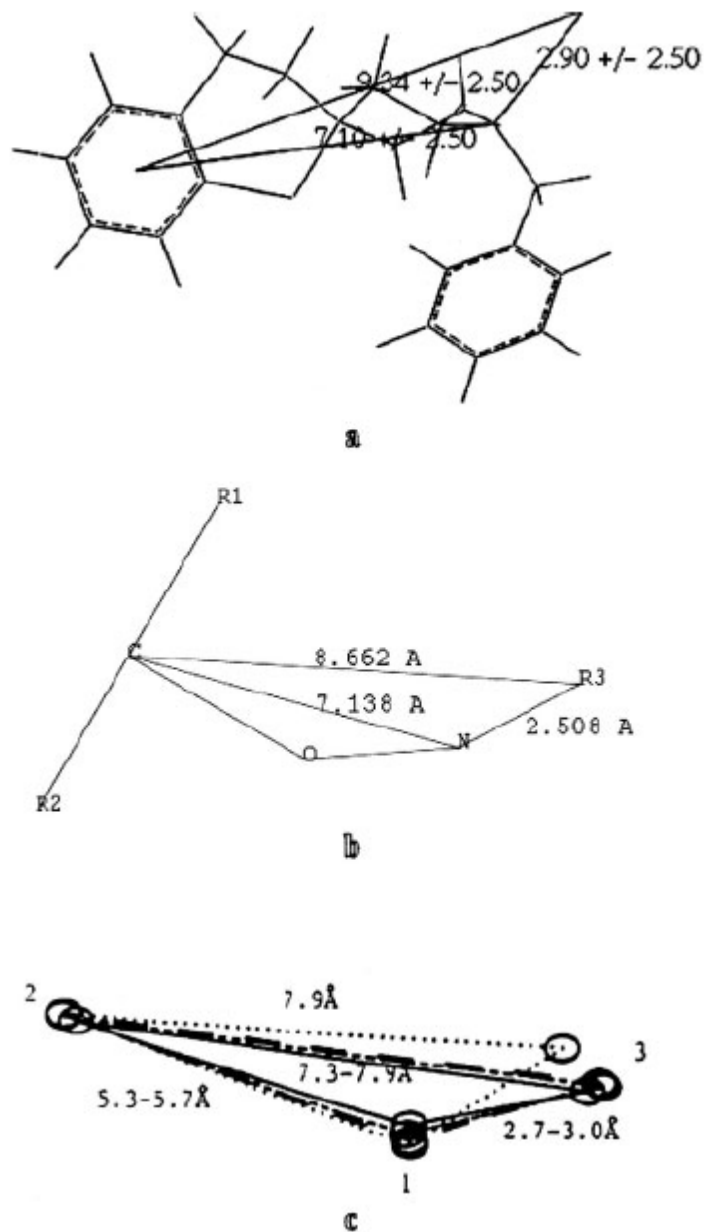


Fig.1.18 Confronto tra il farmacoforo precedente e il farmacoforo DISCOtech.

Modello farmacoforico di Glennon/Ablordeppey

Numerosi studi sono stati condotti nel tentativo di semplificare la struttura delle molecole che possono avere una certa affinità di legame per il recettore σ_1 . Glennon e coll. hanno realizzato un modello farmacoforico basandosi sull'affinità mostrata da strutture feniletilamminiche nei confronti del recettore

σ_1 , affinità che dipende dalla stereochimica e dalla natura dei sostituenti R ed X (Fig.1.19).

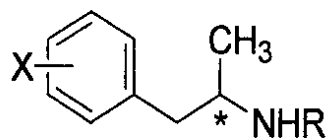


Fig.1.19 Struttura feniletilamminica.

Partendo dal composto (a), al quale è stata riconosciuta un'affinità elevata per il recettore σ ($K_i = 2.6$ nM), è stato notato che la catena pentilica rappresenta una struttura chiave per il legame al recettore σ ; invece, una variazione della lunghezza della catena feniletilica (composto (b), $n=1-4$) non influenza significativamente l'attività σ ($K_i = 2.0-2.7$ nM) (Fig. 1.20).

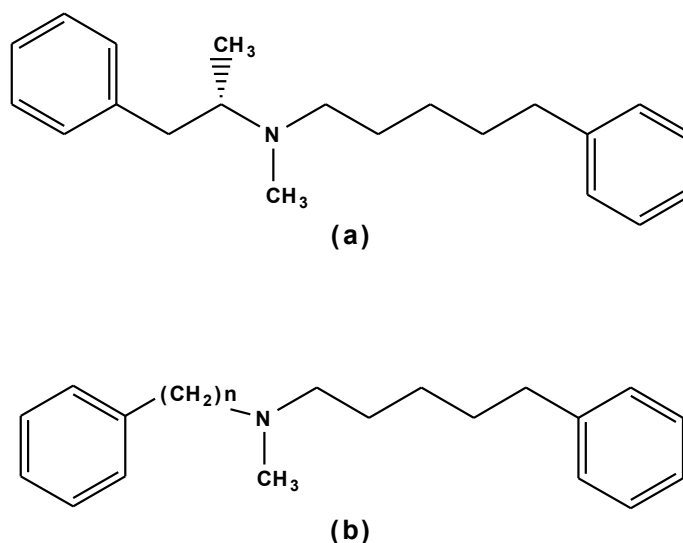


Fig. 1.20 Composto (a) e (b) ad elevata affinità per il recettore σ .

Entrambi gli anelli aromatici potrebbero essere sostituiti con anelli cicloesilici, dimostrando che l'interazione con il recettore è di tipo idrofobico piuttosto che aromatico. Inoltre, eliminando l'anello aromatico della porzione feniletilica viene mantenuta l'affinità σ , come mostrato per i composti (c) e (d) (Fig. 1.21) [103-104].

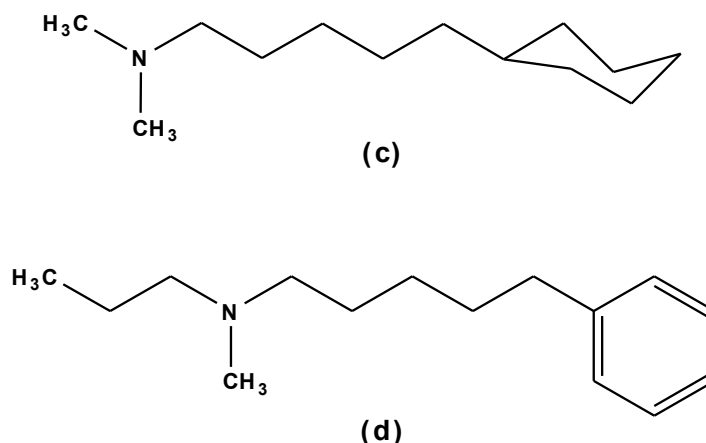


Fig. 1.21 Composto (c) $K_i = 2.6 \text{ nM}$, composto (d) $K_i = 2.4 \text{ nM}$.

Poiché gli anelli fenil-piperidinici e fenil-piperazinici possiedono approssimativamente la stessa dimensione della feniletilammina del composto (a), sono stati valutati composti nei quali l'ammina terziaria viene sostituita da un anello 4-fenilpiperidinico, ottenendo il composto (e), il quale ha mostrato un'affinità per il recettore σ di $0,9 \text{ nM}$ [105]. Inoltre, se si ipotizza che il composto (e) si legni al recettore σ in maniera simile ai derivati fenilpentilamminici, anche in questo caso la rimozione dell'anello aromatico del gruppo fenilpiperidinico non dovrebbe determinare un decremento sostanziale dell'attività σ . Infatti, dalla sostituzione del nucleo aromatico con un atomo di idrogeno si ottiene il composto (f), che mantiene ancora una buona affinità per il recettore σ ($K_i = 1.9 \text{ nM}$)[106](**Fig. 1.22**).

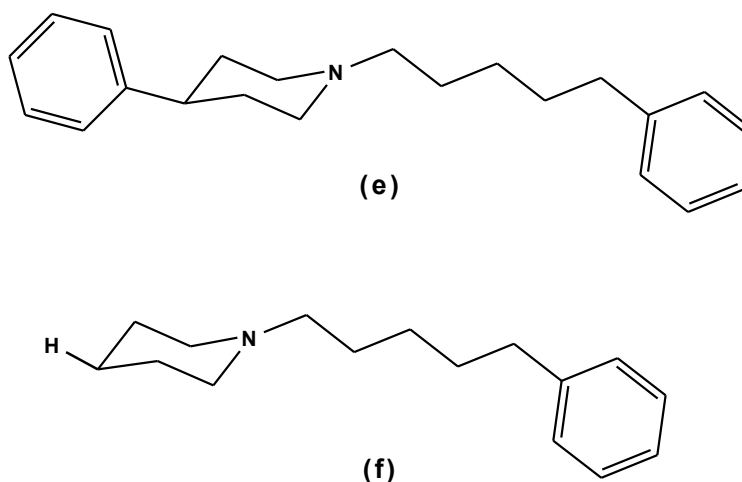
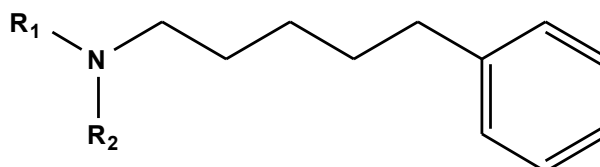


Fig. 1.22 Composti (e) ed (f).

In seguito alla scoperta dei sottotipi recettoriali σ_1 e σ_2 , è stato necessario per Glennon e coll. riesaminare i loro studi sul modello farmacoforico. Ricerche successive, volte all'identificazione di composti con attività prevalentemente σ_1 , hanno dimostrato che i composti **(d)** ed **(f)** possiedono un'elevata affinità nei confronti di tale recettore ($K_i = 0.25$ e $K_i = 0.48$ nM) [107].

Studi condotti su composti fenilpentilamminici variamente sostituiti all'atomo di azoto (**Tab. 1.1**) hanno mostrato l'esistenza nel recettore, accanto al sito di *binding* secondario, di una regione di tolleranza, denominata *region of bulk tolerance*, capace di accogliere diverse strutture idrofobiche più o meno voluminose.



	R_1	R_2	σ_1 K_i (nM)
<i>g</i>			1.00
<i>h</i>			0.76
<i>i</i>	<i>Et</i>	<i>Et</i>	6.00
<i>d</i>	<i>Me</i>	$-(CH_2)_2CH_3$	0.25
<i>j</i>	<i>Me</i>	$-CH_2CH_2Ph$	0.25
<i>k</i>	<i>Me</i>	<i>Me</i>	14.0
<i>l</i>	<i>Me</i>	<i>H</i>	418

Tab.1.1 Affinità σ di composti a struttura fenilpentilamminica.

Come mostra la **Tab. 1.1**, i sostituenti N-metilici dei composti **(k)** ed **(l)** risultano essere troppo corti per una interazione ottimale con il sito di legame idrofobico

del recettore, mentre i sostituenti idrofobici più lunghi presenti nei composti **(d)** e **(j)** garantiscono una buona affinità di legame al recettore.

Sulla base dei dati disponibili è stato quindi postulato un modello farmacoforico per una elevata affinità di legame al recettore σ_1 (**Fig.1.23**).

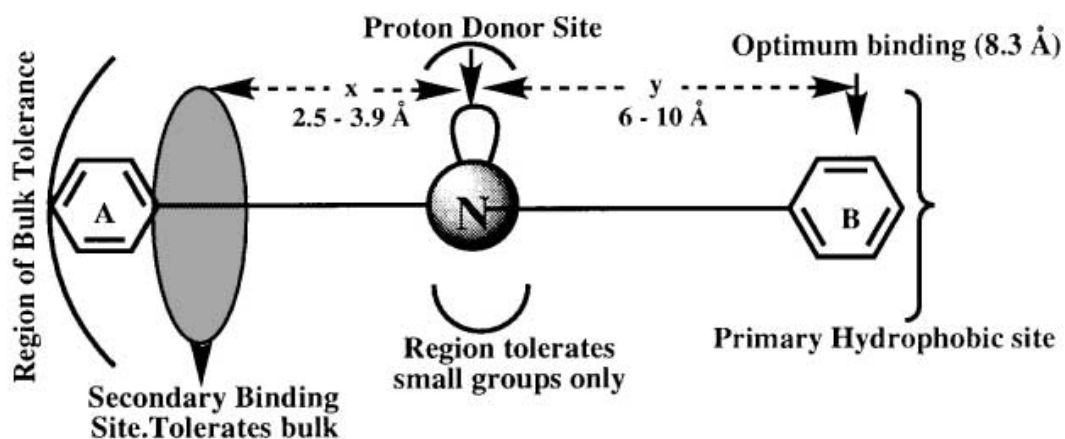


Fig. 1.23 Modello farmacoforico di Glennon.

Nel modello di Glennon viene mantenuto un atomo di azoto che con il suo *lone pair* permette un'interazione con un sito donatore di protoni, una porzione idrofobica **B**, che interagisce con il sito idrofobico primario del recettore e dista dalla funzione amminica 6-10 Å, e una seconda porzione idrofobica **A** distante 2.5-3.9 Å dall'azoto. La riduzione della catena pentilica tra l'anello **B** e l'atomo di azoto determina una diminuzione dell'attività, quindi questa catena sembra essere un ottimo spaziatore tra l'anello e la funzione amminica.

La regione idrofobica secondaria in cui è presente l'anello **A** è più suscettibile a variazioni strutturali e modifiche nella lunghezza della catena, per cui è stata ipotizzata una regione di tolleranza, che si stende oltre il sito di *binding* secondario.

Questo modello permette di sviluppare potenti ligandi selettivi nei confronti del sottotipo recettoriale σ_1 .

1.3. Recettore σ_2

1.3.1. Struttura e distribuzione anatomica del recettore σ_2

A differenza del recettore σ_1 , il recettore σ_2 non è stato ancora clonato ma studi di *photoaffinity labeling* rivelano un peso molecolare di circa 18-21 KDa [108]. Non conoscendo la struttura del recettore non è stato quindi possibile effettuare studi di immunostochimica, come avvenuto invece per il recettore σ_1 . Attraverso studi di *binding* è stata mostrata la co-localizzazione dei due sottotipi recettoriali in molti tessuti, sebbene possano essere presenti in concentrazioni differenti ed è stato visto che numerosi farmaci legano sia il recettore σ_1 che quello σ_2 con simile affinità. Da studi autoradiografici effettuati in presenza di [³H]-DTG risulta che solo poche aree del cervello sono ricche di recettori σ_2 [109-110], essi sono particolarmente presenti in zone associate a funzioni motorie come il cervelletto, la *substantianigra*, il nucleo rosso e i nuclei dei nervi cranici del mesencefalo. Si pensa, infatti, che possano essere implicati nel controllo della postura e dei movimenti [111]. Si potrebbe anche ipotizzare che alcuni effetti collaterali dei neurolettici tipici, sulle alterazioni motorie a lungo termine, possano essere dovuti al *binding* con i recettori σ_2 . Al di fuori del SNC, i recettori σ_2 sono stati individuati anche a livello di fegato, reni, cuore, tessuto endocrino e immunitario [108-112].

1.3.2. Ruoli fisiologici e potenzialità terapeutiche del recettore σ_2 .

Così come i recettori σ_1 , anche i recettori σ_2 sono coinvolti nell'omeostasi del calcio intracellulare, anche se non è ancora del tutto chiaro il loro preciso ruolo in tale processo e sono necessari ulteriori studi al tal riguardo.

Alcuni studiosi hanno evidenziato che l'incremento del calcio intracellulare è dovuto a due differenti tipi di risposta mediati dai ligandi σ_2 . La prima è una risposta immediata, dose-dipendente, che provoca un transitorio aumento del $[Ca^{2+}]_i$ dovuto al rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico. Ciò avviene in assenza di calcio extracellulare e viene eliminato da pretrattamenti con la taspigargina. Un secondo tipo di risposta, caratterizzato da un latente e

sostenuto aumento di $[Ca^{2+}]_i$ proveniente dalle riserve mitocondriali, è generato dalla prolungata esposizione delle cellule a ligandi σ_2 . In questo caso l'aumento di $[Ca^{2+}]_i$ non è influenzato da pretrattamento con la tapsigargina [113].

Risultati discordanti sono stati ottenuti recentemente verificando l'azione del PB28 (**Fig. 1.24**), il più potente agonista σ_2 , su cellule SK-N-SH.

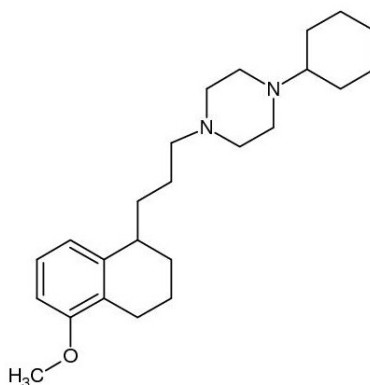


Fig. 1.24 Struttura di PB28.

È stato mostrato che la molecola inibisce il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico, che può invece essere incrementato dalla stimolazione con agonisti fisiologici come l'IP3 o la caffeina. L'azione è relativamente rapida e ciò fa supporre che non sia coinvolta la sintesi di nuove proteine [114]. Altri studi hanno inoltre evidenziato che a livello dei gangli intracardiaci e cervicali di ratto neonato i recettori σ_2 deprimono rapidamente la corrente di calcio dai canali, portando alla conclusione che tali recettori bloccano tutti i vari tipi di canali del calcio trovati nelle cellule [115].

Questi ultimi due risultati supportano l'ipotesi che i recettori σ_2 modulino negativamente il calcio intracellulare, in modo da controbilanciare gli effetti positivi sull'incremento di calcio osservati dopo l'attivazione dei recettori σ_1 .

E' stato anche proposto che l'attivazione dei recettori σ_2 possa dare inizio ad un processo Ca^{2+} -dipendente nelle cellule PC12, il quale può regolare, sotto stimolazione da amfetamine, il rilascio di dopamina attraverso la via Ca^{2+} /calmodulina chinasi II [116].

Alcune evidenze fanno anche supporre che alcuni ligandi σ_2 siano in grado di potenziare la risposta del sistema NMDA.

Un'affermazione certa è, comunque, che i recettori σ_2 sono implicati nei meccanismi di proliferazione cellulare e nella morte apoptotica. Numerosi studi *in vitro*, condotti su cellule C6 di glioma e su altre linee cellulari sia neuronali che non, hanno svelato la citotossicità di alcuni ligandi σ , come ad esempio l'aloiperidolo ridotto o la cicloesandiammina BD614, così come molti neurolettici σ -attivi [117]. Una continua esposizione a composti σ finisce col portare a morte cellulare, con un processo di tipo dose-dipendente, infatti alte dosi causano cambiamenti morfologici e morte in tempi molto brevi. L'osservazione che i recettori σ_2 risultano iper-espressi nelle cellule in rapida proliferazione e le conoscenze sulla capacità degli agonisti σ_2 di indurre apoptosi hanno acceso l'interesse verso queste sostanze come potenziali farmaci antitumorali; è importante notare che gli agonisti σ_2 innescano la morte cellulare attraverso una via apoptotica in qualche modo differente da quelle classiche. Infatti, è stato dimostrato che il processo di morte cellulare è indipendente dal rilascio di citocromo C dai mitocondri e dall'attivazione delle caspasi, e che ciò è anche indipendente dall'attività del gene p53. La capacità degli agonisti σ_2 di innescare l'apoptosi si è rivelata la stessa sia in linee cellulari aventi il gene p53 *wild-type*, sia in cellule che presentano una mutazione in questo gene. Gli inibitori delle caspasi non bloccano gli effetti pro-apoptotici di queste molecole.

Studi successivi hanno messo in evidenza come in questa nuova via apoptotica possano essere coinvolti un incremento nella concentrazione di ceramide e un aumento nella permeabilità delle membrane, dovuto ad un potenziamento dello *stress ossidativo*. In particolare, sembra avere un ruolo importante l'aumento della permeabilità delle membrane lisosomiali e il conseguente rilascio degli enzimi lisosomiali nel citosol. L'importanza della perossidazione lipidica in questo processo è sottolineata dal fatto che antiossidanti di natura lipidica, come α - e γ -tocoferolo sono in grado di fornire una certa protezione dall'azione proapoptotica degli agonisti σ_2 , mentre antiossidanti di natura idrofilica, come N-acetil cisteina e l'estere etilico del glutatione, falliscono in tal senso. Risulta interessante notare come nell'apoptosi indotta da TNF (fattore di necrosi tumorale), le capacità protettive di antiossidanti lipofili e idrofili mostrino un profilo opposto [118-119].

I ligandi σ_2 risultano interessanti come agenti terapeutici, ma anche come agenti diagnostici, ciò dovuto al fatto che i livelli di espressione dei recettori σ_2 siano

10 volte superiori nelle cellule in attiva proliferazione rispetto a cellule quiescenti. Ligandi marcati possono essere, infatti, utilizzati per individuare i tumori in maniera non invasiva, poiché in seguito ad interazione con il recettore vengono internalizzati nella cellula [120-121-122].

Visto il possibile ruolo del recettore σ_2 nella regolazione della proliferazione cellulare si è cercato di determinare il meccanismo o i meccanismi di trasduzione che stanno alla base della sua attivazione. I recettori σ_2 sono stati localizzati con elevata densità nel reticolo endoplasmatico e nel mitocondrio, di conseguenza i loro ligandi devono prima attraversare la membrana cellulare per poter interagire con i recettori presenti negli organelli subcellulari. Ciò è stato dimostrato da una serie di saggi in cui la potenza di una serie di ligandi σ_2 aumentava al crescere della lipofilia.

L'attività dei composti, sia agonisti che antagonisti è inoltre influenzata dal pH, infatti aumentando il pH da 7.2 a 8.2, la deprotonazione ed il conseguente aumento della lipofilia facilitano il passaggio delle molecole attraverso la membrana citoplasmatica con conseguente aumento dell'attività. Gli antagonisti BD1047 e BD1063 molto più idrofili non riescono ad accedere al recettore a pH 7.2, mentre attenuano l'azione degli agonisti a pH 8.2.

E' stata evidenziata la presenza dei recettori σ_2 in vari tessuti come fegato, reni, tessuto endocrino ed immunitario, tessuti nei quali si ha anche un'alta concentrazione del recettore *Fas*, uno dei più importanti protagonisti del processo apoptotico.

I recettori σ_2 mostrano, inoltre, un ruolo neuroprotettivo in alcuni modelli farmacologici e patologici di amnesia. In particolare in un modello di intossicazione da CO, l'antagonista σ_1 selettivo NE-100 è in grado di antagonizzare solo parzialmente gli effetti protettivi di DTG, agonista di entrambi i sottotipi di recettori sigma, mentre l'aloiperidolo, che si comporta da σ_1 -antagonista/ σ_2 -agonista, mostra marcati effetti anti-amnesici in modelli di intossicazione sia da CO sia da trimetilstagno e tale effetto non è contrastato da NE-100. Questi composti sembrano, dunque, esercitare il loro effetto protettivo principalmente attraverso un meccanismo mediato dai recettori σ_2 [123].

1.3.3. Modello farmacoforico del recettore σ_2

Ad oggi sono noti solo pochi ligandi σ_2 selettivi, ma sono stati condotti diversi studi su alcuni di questi al fine di trovare un modello farmacoforico in grado di aprire la strada verso una nuova progettazione di ligandi selettivi per tale recettore.

Come per il recettore σ_1 , il gruppo di ricerca di Gund si è occupato di cercare un modello farmacoforico basato sul metodo CoMFA anche per il recettore σ_2 [124].

Il modello farmacoforico è stato costruito utilizzando il programma DISCOtech su 24 composti (21 molecole per il *training set* e 3 molecole per il *test set*) che presentano affinità per il recettore σ_2 e appartengono a tre differenti classi strutturali: derivati del Trishomocubane, analoghi del Vesamicolo e derivati del 5-(3-idrossifenil)-2-metilmorfan-7-one.

Dopo aver trovato i vari conformeri entro limiti di energia di 35 Kcal/mol, è stato suggerito un modello farmacoforico simile a quello proposto per il recettore σ_1 . Tutti i farmacofori costruiti a partire dalle tre differenti classi strutturali di composti esaminati in questo studio CoMFA rappresentano un triangolo ai cui vertici sono rappresentati i tre elementi fondamentali: un atomo di azoto (B) e due anelli idrofobici (A e C rappresentano i centroidi dei due anelli). Inoltre, il modello per il recettore σ_2 presenta un quarto punto LP, posto fuori dal piano del triangolo e costituito dal *lone pair* dell'atomo di azoto. Le distanze trovate tra i punti del triangolo sono: A-B= 2.93 Å; B-C= 5.19 Å; A-C= 7.77 Å; la distanza tra l'atomo di N e il suo *lone pair* è stata stabilita di 1.4 Å poiché tale distanza fornisce il migliore risultato nello studio CoMFA (**Fig. 1.25**).

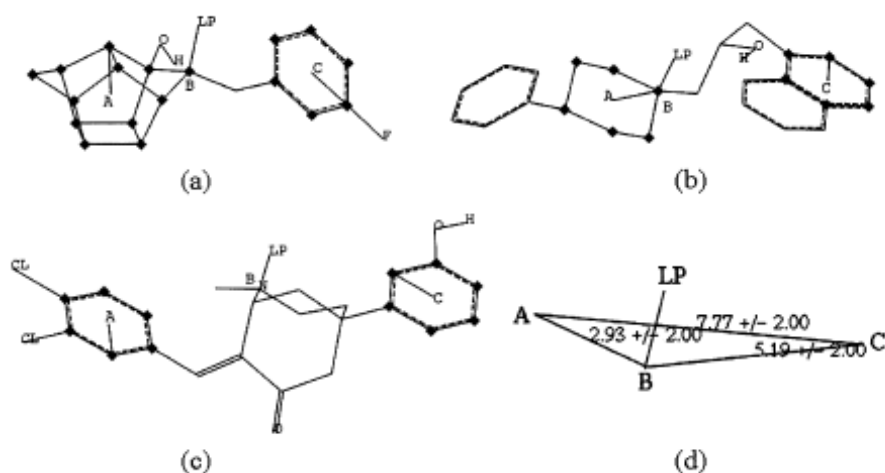


Fig. 1.25 Modello DISCOtech σ_2 .

Questo modello rappresenta un nuovo *trial* per formulare farmacofori affini per il recettore σ_2 .

Nel 2004 Cratteri e coll. hanno sviluppato un modello farmacoforico per il recettore σ_2 basandosi su una serie di derivati α -tropanici attivi come ligandi σ (**Fig. 1.26**). Ciò è stato fatto caratterizzando i composti tramite descrittori GRIND (*GRid INdependent Descriptors*), [125] al fine di ottenere *hits* per la sintesi di nuovi analoghi con un migliorato profilo farmacologico [126].

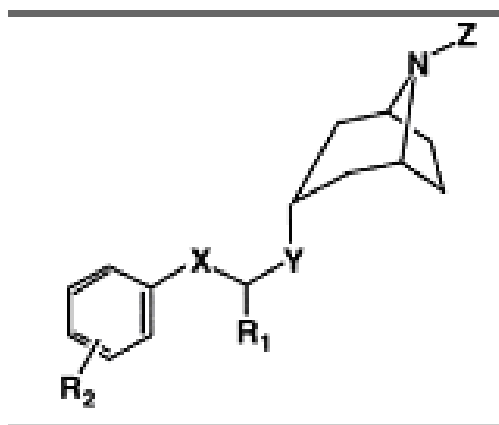


Fig.1.26 Derivati α -tropanici. R_1 = Me, Et, *i*-Pr, Cl, H. R_2 = 4-F; 2-Cl; 3-Cl; 4-Cl; 4-Br; 4 CF₃; 4-CN; 4-*t*Bu; 3,4-Cl₂; 4-Ph; H; 4-CH₃; 4-NO₂; 4-OMe; 4-NMe₂. X= O, S, NH, NMe. Y= CO-O, CH₂O, CONH. Z= Me, Bn

L'analisi 3D dei composti fornisce informazioni utili per trovare alcuni dei requisiti necessari per l'interazione con il recettore σ_2 e disegnare nuove molecole maggiormente potenti e selettive.

Innanzitutto bisogna chiarire che l'enantioselettività non è sempre una peculiarità del recettore σ_2 , infatti in letteratura sono riportati solo pochi ligandi chirali σ_2 che legano il recettore con alta o moderata enantioselettività (Pentazocina e CB64D). Inoltre, si nota che le interazioni con la regione del centro chirale sono principalmente idrofobiche, e possono essere stabilite mediante gruppi arilici o alchilici sul carbonio chirale. Di conseguenza, la distanza tra i gruppi non varia se si considerano gli enantiomeri R o S.

Gli studi SAR, condotti in passato principalmente sui ligandi σ_1 , hanno evidenziato la presenza di un gruppo accettore di legami a idrogeno come elemento farmacoforico essenziale. Nella maggior parte dei casi tale gruppo si identifica con l'atomo di azoto, anche se alcuni composti di natura steroidea, che legano il recettore σ , non presentano questo centro basico.

Tutte le molecole esaminate in questo studio riportano nella loro struttura l'atomo di azoto del nucleo tropanico, mentre alcuni composti possiedono un ulteriore centro ricco di elettroni (il gruppo estereo $Y = O-CO$) capace di comportarsi da gruppo accettore di legami a idrogeno.

Il programma impiegato per la realizzazione del modello ha individuato tre regioni per l'interazione del recettore con i derivati α -tropanici (**Fig. 1.27**):

- Una regione idrofobica-1 per l'interazione con la porzione aromatica
- Una regione idrofobica-2 che interagisce con l'anello tropanico dei ligandi
- Una regione donatrice di legami a idrogeno (HB).

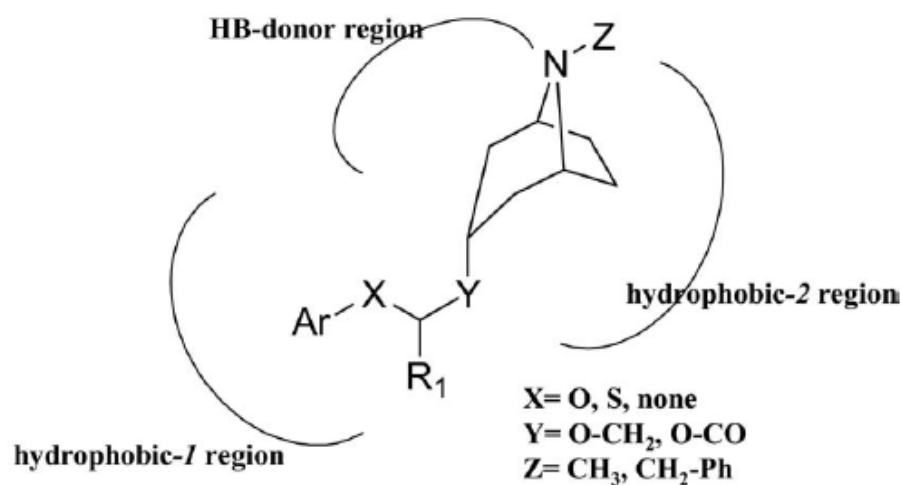


Fig.1.27 Schema del complesso recettore sigma-derivati α -tropanici.

Per comprendere quali requisiti strutturali sono necessari per indirizzare le molecole selettive nei confronti del recettore σ_2 , è stato condotto uno studio su 23 dei α -tropanil derivati, per i quali è stata misurata sia l'attività σ_1 che σ_2 ed è stata utilizzato il rapporto $\text{Log}(K_i\sigma_2/K_i\sigma_1)$ come variabile dipendente. Una distanza di 14-16 Å tra le regioni idrofobiche è associata a composti σ_1 selettivi, mentre una distanza più corta (10.8-13.2 Å) comporta una maggiore affinità per i recettori σ_2 .

La selettività σ_2 sembra essere correlata maggiormente con la distanza tra la regione idrofobica-1 e la regione HB: una distanza di 11.6-13.6 Å sembra essere quella ottimale (**Fig.1.28**).

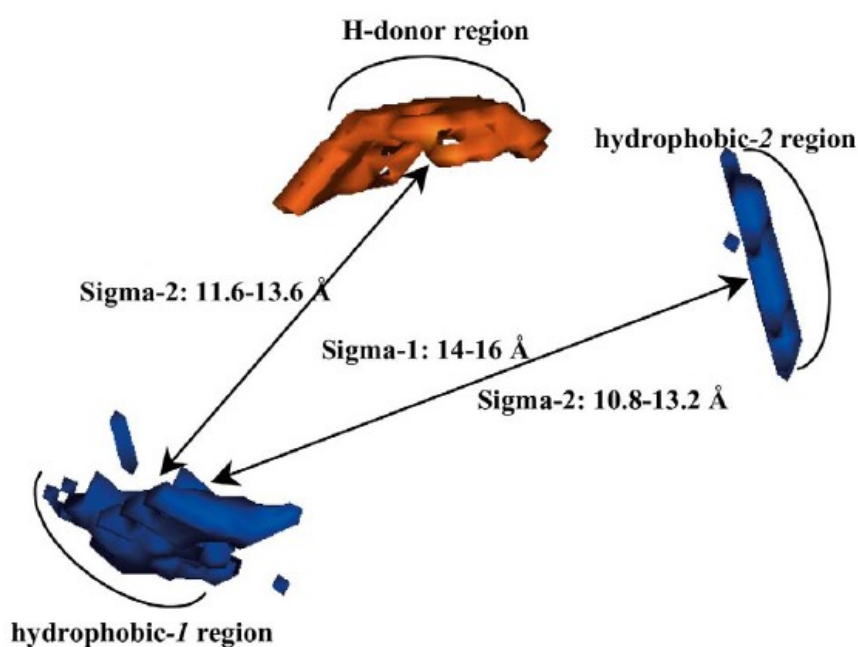


Fig. 1.28 Relazioni geometriche proposte e mappe delle maggiori aree di interazione per i recettori σ

Come mostra la figura, i siti di interazione sono rappresentati da due regioni idrofobiche (in blu) distanti 14-16 Å nel recettore σ_1 e 10.8-13.2 Å nel recettore σ_2 e da un'area donatrice di legami a idrogeno (in rosso), distante circa 11.6-13.6 Å dalla regione idrofobica-1, la quale rappresenta un punto essenziale per il legame dei ligandi σ_2 .

Capitolo 2

Spettroscopia di fluorescenza

Gli elettroni di una molecola possono essere più o meno legati ai nuclei degli atomi poiché possiedono energie diverse. Il numero di energie possibili è discreto e ad ogni livello energetico corrisponde uno stato elettronico.

Alla temperatura ambiente le molecole si trovano principalmente nel più basso livello vibrazionale dello stato elettronico fondamentale, S_0 . Quando la molecola assorbe luce di un'adeguata lunghezza d'onda (freccia blu- **Fig.2.1**), può essere eccitata ad un livello vibrazionale del primo stato elettronico eccitato, S_1 . L'assorbimento di un fotone avviene in circa 10^{-15} secondi (s). Il fluoroforo eccitato perderà energia e rilascerà in circa 10^{-12} s al livello vibrazionale più basso dello stato eccitato S_1 , dal quale ritornerà ad un altro livello vibrazionale dello stato fondamentale S_0 emettendo così un fotone (fluorescenza-freccia verde **Fig. 2.1**) [127].

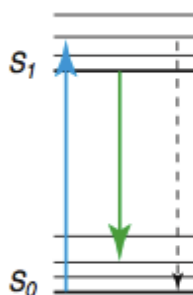


Fig.2.1 Le linee orizzontali rappresentano gli stati vibrazionali; la freccia blu indica la luce assorbita; la freccia verde indica la fluorescenza.

Come mostrato in **Fig. 2.2** in una molecola che si trova allo stato elettronico fondamentale (S_0), gli elettroni sono appaiati con spin opposti e lo spin totale è uguale a zero. La molecola si trova in uno stato di singoletto, poiché, in presenza di campi magnetici, manifesta un solo livello energetico. Una molecola in questo stato si chiama diamagnetica.

Quando si verifica il fenomeno dell'assorbimento si ha lo spostamento di un elettrone allo stato eccitato S_1 . Nel caso più probabile, in questa transizione lo spin totale non cambia, la vita media dello stato eccitato è molto breve, 10^{-5} - 10^{-8} s e la transizione sarà singoletto-singoletto. Con minore probabilità può succedere che, nel passaggio allo stato eccitato, si abbia l'inversione dello spin dell'elettrone e la molecola passi dallo stato di singoletto a quello di tripletto, a minore energia, così chiamato in quanto, in presenza di un campo

magnetico, può manifestare tre livelli energetici. Parleremo quindi di una transizione singoletto-tripletto. La vita media dello stato eccitato di tripletto varia da 10^{-4} ad alcuni secondi e in questo caso la molecola è paramagnetica.

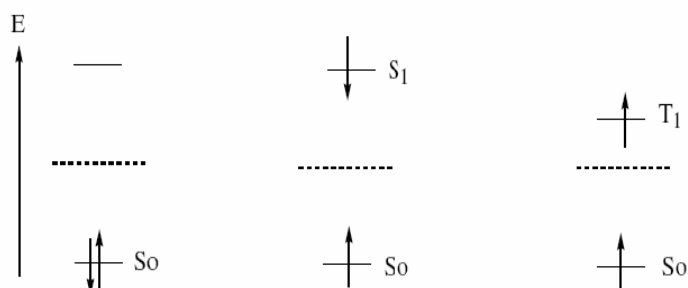


Fig. 2.2

Una volta che la molecola ha assorbito la radiazione incidente, può andare incontro a due tipi di processi:

- La maggior parte delle molecole trasferisce l'eccesso di energia all'intorno con un processo non radioattivo: l'energia emessa sotto forma di calore, permette alle molecole circostanti di compiere vibrazioni, rotazioni e traslazioni.
- Una piccola parte delle molecole, invece, subisce un decadimento radioattivo dove l'energia in eccesso viene liberata sotto forma di fotoni. Pertanto, una molecola eccitata si trova in uno degli stati vibrazionali di un livello superiore ed essendo soggetta a collisioni con le molecole circostanti, rilascia parte della sua energia sotto forma non radioattiva e scende nella scala dei livelli vibrazionali.

Il comportamento delle molecole fino a questo punto è indistinto; la prima differenza dipende dalle molecole circostanti: se queste sono in grado di assorbire la restante energia in eccesso della molecola eccitata questa completa il suo rilassamento in modo non radioattivo, altrimenti se ciò non avviene si possono verificare i fenomeni di fluorescenza e fosforescenza, entrambi processi radioattivi.

In **Tab. 2.1** e in **Fig. 2.3** sono riportate le transizioni possibili all'interno di una molecola organica dopo assorbimento di fotoni e le energie associate ai differenti tipi di transizione.

Orbitale	Transizione elettronica	Esempio
$\pi - \pi^*$	Passaggio di un elettrone da un orbitale legante π ad un orbitale antilegante π^*	Doppio legame C=C
$n - \pi^*$	Passaggio di un elettrone non legante p a un orbitale antilegante π^*	Gruppi carbonilici C=O, composti azotati
$\sigma - \sigma^*$	Passaggio di un elettrone legante σ a un orbitale antilegante σ^*	Legame semplice C-C
$n - \sigma^*$	Passaggio di un elettrone non legante a un orbitale antilegante σ^*	Seconda transizione del butanone

Tab.2.1

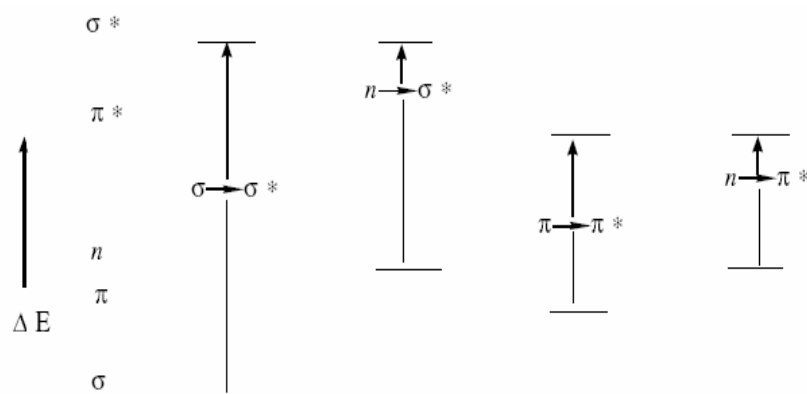


Fig. 2.3

Nella fluorescenza, la radiazione emessa è generata in virtù di transizioni tra stati con la stessa molteplicità di spin, quindi, singoletto-singoletto ($S_1 - S_0$).

Nella fosforescenza, invece, la transizione coinvolta comporta variazione della molteplicità di spin e sono quindi transizioni tripletto-singoletto ($T_1 - S_0$).

Poiché la transizione più energeticamente favorita è quella che mostra conservazione dello spin, per ottenere il fenomeno della fosforescenza dovremo passare dapprima attraverso una transizione singoletto-singoletto, poi attraverso un decadimento dallo stato di singoletto eccitato a quello di tripletto e infine si ritornerà allo stato fondamentale con l'emissione di fosforescenza.

Il diagramma di Jablonski (**Fig. 2.4**) riassume le trasformazioni energetiche che si verificano per assorbimento di una radiazione di sufficiente energia in una molecola.

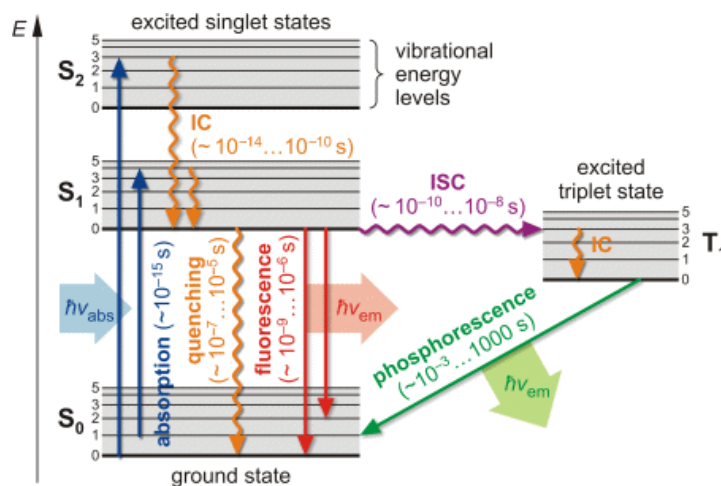


Fig. 2.4 Diagramma di Jablonski.

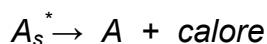
Il processo favorito sarà quello in cui il meccanismo di ritorno allo stato fondamentale a partire dallo stato eccitato ha la minima vita media. Si osserverà quindi il fenomeno della fluorescenza quando questo processo è più rapido degli altri.

2.1. Processi che competono con la fluorescenza

Affinché un processo possa competere con la fluorescenza, esso deve avvenire in un tempo minore o uguale a quest'ultima e quindi deve possedere costanti cinetiche maggiori. Sarà, infatti, il rapporto tra la fluorescenza e tutti questi altri processi a determinare la resa quantica, ed, in definitiva, il fatto che una molecola sia, o meno, fluorescente.

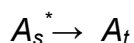
Questi processi sono: la conversione interna, lo scambio intersistemico (*intersystem crossing*) e il trasferimento di energia.

Conversione interna



La conversione interna consiste nel ritorno allo stato fondamentale accompagnato da emissione di calore. In genere si tratta di un processo poco efficiente che rende conto solo di una piccola parte dell'energia restituita dalla molecola eccitata all'ambiente.

Scambio intersistemico



Consiste nel passaggio delle molecole eccitate da uno stato di singoletto ad uno di tripletto (**Fig. 2.5**). Ciò implica ovviamente un cambiamento di molteplicità e quindi si tratta di una transizione fundamentalmente proibita.

Tuttavia, spesso, gli stati di tripletti (e quelli di singoletti) nelle molecole non sono *puri* cioè possono avere una certa percentuale dell'altro stato a causa dell'*accoppiamento spin-orbital*. Tale accoppiamento è dato dall'influenza esercitata dal momento magnetico dovuto all'orbitazione dell'elettrone intorno al nucleo, sul momento magnetico dovuto alla rotazione dell'elettrone sul proprio asse (**Fig. 2.6**).

In seguito all'inversione di spin, le molecole, che in questo modo occupano lo stato di tripletto, possono emettere una radiazione luminosa che non sarà più di fluorescenza ma di fosforescenza.

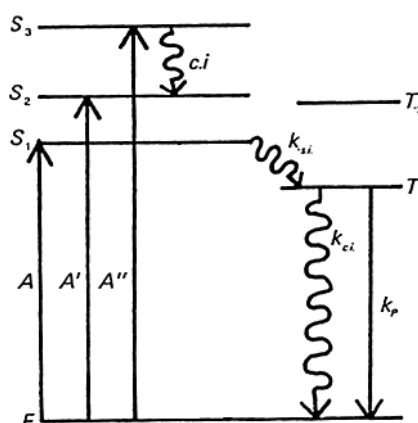


Fig. 2.5 Fenomeno dell'*intersystem crossing*.

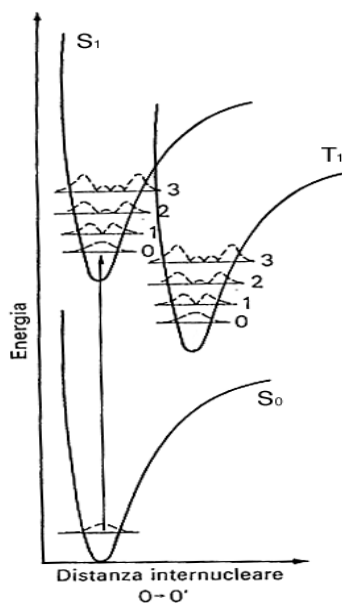


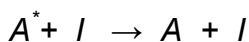
Fig. 2.6 Accoppiamento spin orbital: lo stato di singoletto non è puro ma interseca lo stato di tripletto a minore energia.

A questo proposito è opportuno ricordare che la presenza in vicinanza dell'elettrone coinvolto nel processo, di un nucleo di metallo pesante produce un aumento dell'accoppiamento *spin-orbital*, con aumento, quindi, dello scambio intersistemico (*effetto da metallo pesante*).

Trasferimento di energia

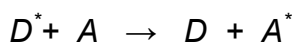
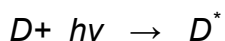
Questo processo può essere di tipi: collisionale e non collisionale.

Nel primo caso il processo è bimolecolare, coinvolge un inibitore e dipende dalla sua concentrazione. Il processo può essere descritto così:



La molecola eccitata ritorna così allo stato fondamentale senza emissione di radiazione.

Il processo non collisionale avviene invece tra un donatore D e un accettore A secondo questo schema:



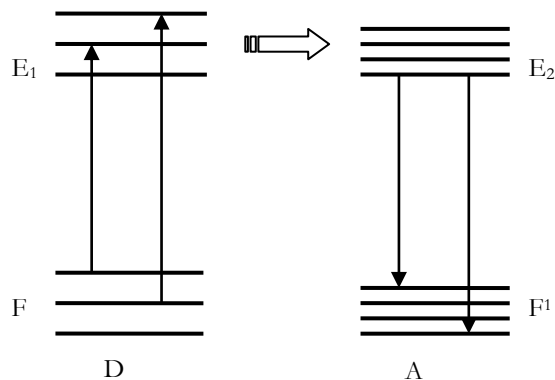


Fig. 2.7

Pertanto l'energia assorbita dal donatore D che passa dallo stato fondamentale allo stato eccitato E₁, viene trasferita allo stato eccitato E₂ dell'accettore A, che emette la sua fluorescenza tornando allo stato fondamentale F¹ (**Fig.2.7**)

2.2.Variabili che influenzano la fluorescenza

Resa quantica

La resa quantica viene comunemente espressa come il rapporto tra il numero di fotoni emessi e il numero di fotoni assorbiti. E' un numero compreso tra zero e uno, così sostanze chiaramente fluorescenti, come la fluoresceina, hanno un rendimento pari a uno.

$$\Phi = \frac{\text{Molecole fluorescenti}}{\text{Molecole eccitate}} \quad \Phi = 1 \text{ Fluoresceina}$$

Tipo di transizione

Il fenomeno della fluorescenza è legato all'assorbimento di radiazioni ultraviolette con $\lambda > 250$ nm. Radiazioni a energia superiore portano alla rottura dei legami. La fluorescenza è legata principalmente a transizioni $\pi-\pi^*$ o $n-\pi^*$, a seconda di quale delle due abbia energia minore.

Empiricamente si osserva che la fluorescenza si presenta più comunemente in composti nei quali la transizione ad energia più bassa è del tipo $\pi - \pi^*$. La resa

quantica di questo tipo di transizione è maggiore sia perché c'è una più alta probabilità che avvenga (la vita dello stato eccitato di una transizione $\pi-\pi^*$ è di 10^{-9} - 10^{-7} secondi contro i 10^{-7} - 10^{-5} secondi dello stato eccitato di una transizione $n-\pi^*$), sia perché i processi che competono con la fluorescenza avvengono con minore facilità.

Struttura

I composti che presentano una maggiore fluorescenza sono quelli contenenti gruppi funzionali aromatici con livelli di bassa energia per le transizioni $\pi-\pi^*$. Pertanto, tutti gli idrocarburi aromatici non sostituiti danno fluorescenza e la resa quantica aumenta col numero degli anelli e il grado di condensazione. Anche i composti contenenti gruppi carbonilici alifatici e salicilici o strutture con doppi legami ad elevata coniugazione possono presentare fluorescenza, ma il loro numero è ridotto rispetto a quello dei sistemi aromatici.

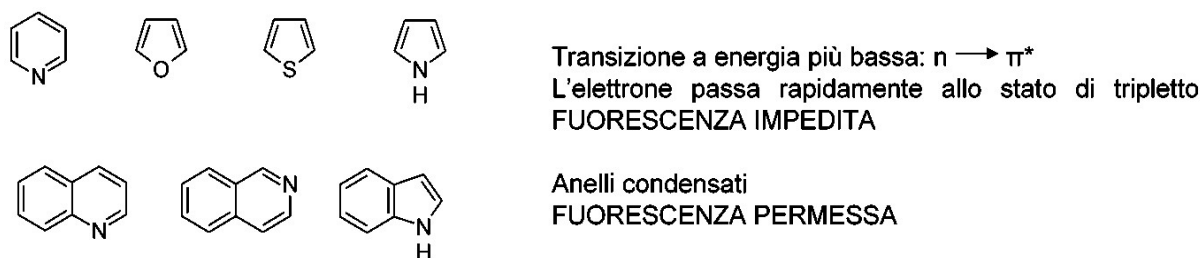
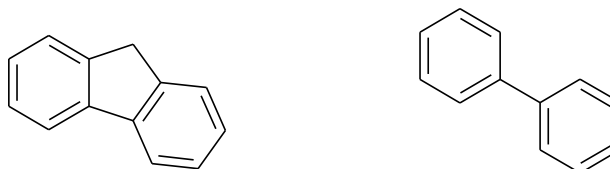


Fig. 2.8

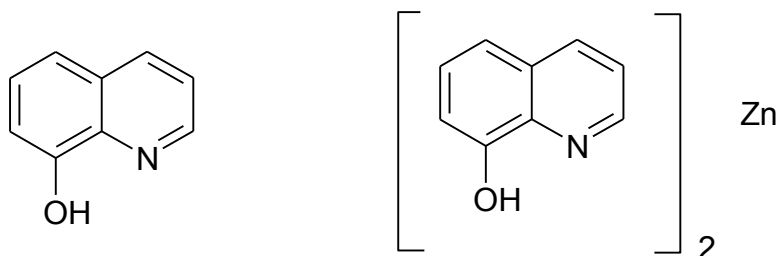
Rigidità strutturale

Nelle molecole flessibili c'è una maggiore probabilità che avvenga un processo di conversione interna con conseguente disattivazione non radiante. Quindi la rigidità strutturale determina un aumento della fluorescenza.



Fluorene $\Phi = 1$ Biphenile $\Phi = 0.2$

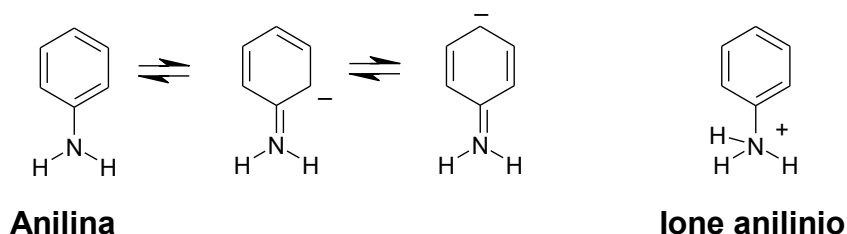
In alternativa, per aumentare la rigidità strutturale di una molecola flessibile si può farla adsorbire su una superficie solida oppure formare chelati a struttura rigida.



8-idrossichinolina

Influenza del pH

Nei composti aromatici contenenti sostituenti acidi o basici, il fenomeno della fluorescenza è fortemente influenzato dal pH. Sia la lunghezza d'onda che l'intensità dell'emissione sono diverse per la forma dissociata e indissociata e questo dipende dalla possibilità di un numero diverso di forme di risonanza associate con le forme acide o basiche delle molecole.



Anilina

ione anilinio

La possibilità di più forme di risonanza rende stabile lo stato eccitato e favorisce il fenomeno della fluorescenza.

Questo effetto può essere sfruttato per la rivelazione del punto finale delle titolazioni acido-base, quando passando dalla forma indissociata a quella dissociata si ha lo spostamento della lunghezza d'onda di fluorescenza dall'ultravioletto al visibile.

Effetto degli atomi pesanti

La presenza di atomi pesanti comporta una riduzione del fenomeno della fluorescenza a causa dell'incremento dell'effetto di *intersystem crossing*.

Anche la presenza di molecole paramagnetiche come l'ossigeno dell'aria determina lo stesso effetto.

Inoltre, la presenza di un gruppo carbonilico sull'anello benzenico riduce il fenomeno della fluorescenza poiché è favorita la transizione $n-\pi^*$, avente una bassa resa quantica, rispetto alla transizione $\pi-\pi^*$.

Temperatura, viscosità e solvente

L'aumento della temperatura comporta la riduzione del fenomeno della fluorescenza perché aumenta la possibilità di trasferimento dell'energia per conversione interna, cioè per collisione delle molecole con quelle del solvente e degli altri soluti presenti in soluzione.

Inoltre all'aumentare della temperatura diminuisce la viscosità e poiché la riduzione della viscosità comporta anch'essa una riduzione della fluorescenza i fenomeni sono connessi fra loro.

Anche il tipo di solvente influenza l'intensità della fluorescenza. Solventi come il CBr_4 o Etl riducono la fluorescenza di un determinato soluto per la presenza di atomi pesanti. Un effetto analogo si riscontra in presenza di O_2 in soluzione.

2.3. Spettrofluorimetri

Lo spettrofluorimetro è costituito da una sorgente di radiazione elettromagnetica (L), da un primo monocromatore (M_1) per selezionare la lunghezza d'onda della radiazione incidente, dalla cella per il campione (S), dal secondo monocromatore (M_2) per selezionare una lunghezza d'onda dello spettro di emissione e dal rilevatore (PM). Quest'ultimo è posizionato a 90° rispetto alla direzione del raggio incidente, poiché altrimenti la radiazione non assorbita che prosegue in quella direzione "accecherebbe" il rilevatore. (**Fig. 2.9**).

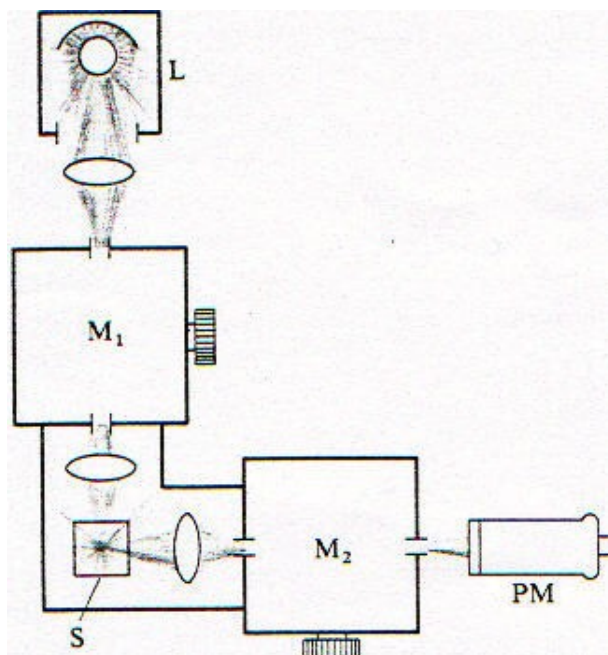


Fig. 2.9 Schematizzazione di uno spettrofluorimetro

Per questi strumenti devono essere utilizzate cuvette di quarzo con quattro pareti ottiche, diverse da quelle usate per la spettrofotometria che ne hanno solo due.

Un tipico spettro di fluorescenza presenta tre proprietà principali: è simmetrico, la fluorescenza (in verde **Fig. 2.10**) viene emessa in ritardo rispetto all'assorbimento (in blu **Fig. 2.10**) e l'energia della luce fluorescente (E_1) è quasi sempre minore di quella della luce eccitante (E). Quindi la lunghezza d'onda della luce eccitante è quasi sempre minore di quella della luce emessa (*legge di Stokes*).

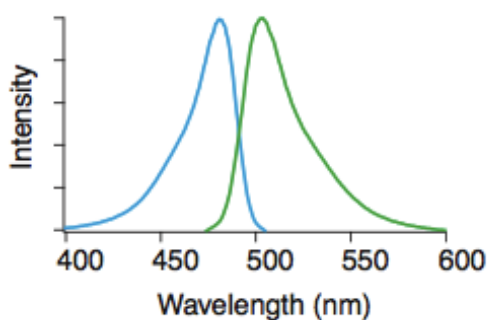


Fig. 2.10 Tipico spettro di fluorescenza

Esistono però zone dello spettro per le quali quanto detto non è valido, le *zone di anti-Stokes*. Ciò è dovuto al fatto che alcune molecole che al momento dell'eccitamento si trovano a livelli vibrazionali superiori allo 0, vanno incontro ad una transizione di fluorescenza di tipo $0 \rightarrow 0$ cioè cadono dal livello vibrazionale 0 del primo stato eccitato al livello vibrazionale 0 dello stato fondamentale: per questo caso particolare $E < E_1$ [128].

2.4. Fluorescenza: applicazioni

In virtù della sua grande sensibilità, le applicazioni pratiche della fluorescenza sono numerosissime, si estendono nel campo della chimica clinica, della chimica analitica e della biologia molecolare.

Dosaggio delle catecolamine

Le catecolamine si trovano nelle urine come tali in quantità molto piccole (15-80 μg nelle 24 ore). In caso di tumore del tessuto cromaffine delle surrenali tale quantità può salire a valori di circa 2000 μg . La diagnosi di questo tumore si basa sulla determinazione dell'adrenalina e della noradrenalina eliminate con le urine. A tale scopo le catecolamine vengono estratte dalle urine mediante adsorbimento su opportuno mezzo, ad esempio allumina, e, dopo averle eluite, esse vengono ossidate con ferricianuro di potassio. Infine la loro fluorescenza viene misurata eccitando a 410-420 nm.

Questo metodo fluorimetrico è l'unico che permetta una determinazione semplice e accurata delle catecolamine in dosi piccole [128].

Determinazione della struttura terziaria delle proteine

Le proteine semplici contengono tre potenziali nuclei fluorescenti: fenilalanina, tiroxina e triptofano.

Quando questi aminoacidi sono incorporati all'interno di un polipeptide la loro fluorescenza sarà fortemente influenzata dal ripiegamento della proteina: se infatti si trovano lontano dal solvente la loro fluorescenza avrà minore intensità rispetto a quella in cui tali aminoacidi sono a contatto con il solvente.

Pertanto si suole fare dapprima uno spettro in un determinato solvente con la proteina in condizioni native, poi per aggiunta di solfato di ammonio si forza la proteina ad aprirsi e ad esporre tutte le sue parti al solvente (fenomeno del *salting out*) e si effettua un nuovo spettro. Dal confronto dei due spettri (**Fig. 2.11**) è possibile risalire sia alla presenza di tali aminoacidi sia alla loro localizzazione all'interno della proteina [128].

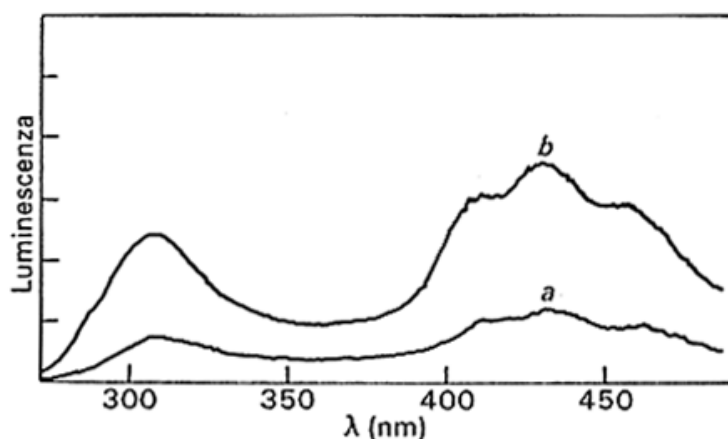


Fig.2.11

Dosaggi immunologici

Uno dei primi e più importanti dosaggi immunologici di tipo competitivo è stato il RIA (*Radio Immuno Assay*), in cui l'antigene presente nei campioni da analizzare compete con una quantità fissa di antigene marcato, in presenza di una quantità limitante di anticorpo. Tuttavia, raggiunto l'equilibrio, per effettuare la misurazione finale, fatta per scintillazione, è indispensabile separare l'antigene libero da quello legato all'anticorpo e ciò potrebbe costituire un problema sia da un punto di vista pratico, in quanto richiede tempo, sia da un punto di vista della riproducibilità poiché parte della soluzione può venir persa in queste procedure.

L'inconveniente può essere risolto marcando l'antigene con un fluoroforo anziché con il radioattivo e misurando quindi la fluorescenza associata al complesso antigene-anticorpo. Dal momento che le misure di fluorescenza non

prevedono processi di separazione (proprio per questo motivo vengono chiamati dosaggi omogenei), viene ridotto il tempo di analisi e assicurata la riproducibilità del dosaggio.

Citometria a flusso

La citometria a flusso è attualmente utilizzata soprattutto per la rapida individuazione della presenza di determinanti antigenici, di membrana o citoplasmatici, effettuata con metodi di immunofluorescenza, ma viene anche impiegata per misurare, a livello di singole cellule, una serie di parametri che comprendono il volume e la granulosità cellulare, il contenuto di DNA e di RNA, le proteine deputate all'uptake di farmaci, il calcio, la permeabilità di membrana, le attività enzimatiche e il pH intracellulare. Per alcuni di tali parametri (ad esempio il volume) l'informazione è ricavata dalla luce diffusa (*scattering*) della cellula che attraversa il fascio laser di eccitazione, per altri si usa la proprietà posseduta dalla sostanza in esame (ad esempio derivati antraciclinici) di emettere fluorescenza in seguito all'eccitazione, per altri ancora la rivelazione viene effettuata mediante sonde, come anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi.

Attualmente comunque la citometria a flusso viene utilizzata maggiormente nello studio della proliferazione cellulare di cellule neoplastiche effettuando un'analisi quantitativa del contenuto di DNA e la discriminazione di cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare.

Infatti, quando un pool di cellule viene lasciato incubare per un certo tempo con un agente derivatizzante fluorescente per il DNA, è possibile che queste manifestino una fluorescenza, qualora eccitate con un laser, proporzionale al loro contenuto di DNA. E' il caso dello ioduro di propidio, colorante di natura fenantridinica, che quando si intercala nel DNA a doppia elica, forma un complesso sufficientemente stabile che emette una fluorescenza rossa quando eccitato. Mediante questa colorazione è possibile discriminare in una popolazione eterogenea, cellule con diverso contenuto di DNA e quindi valutare la distribuzione delle cellule in base al loro contenuto di DNA e se eventualmente, in seguito a trattamenti farmacologici, si sono manifestate alterazioni a livello del ciclo cellulare.

Fluorescenza e microscopia

La microscopia ottica è senza dubbio la tecnica di osservazione più indicata, forse l'unica, che permette di visualizzare e di seguire eventi dinamici ed interazioni fra diversi compartimenti cellulari mantenendone inalterate, per quanto possibile, la vitalità e la funzionalità. Esistono diversi metodi di osservazione in microscopia ottica, ciascuno dei quali ha un suo campo di applicazione, come ad esempio la microscopia in contrasto di fase, il contrasto interferenziale differenziale (DIC), il campo scuro, la polarizzazione, la stereomicroscopia e la microscopia a fluorescenza. A questo proposito, differenti tipi di molecole fluorescenti o fluorocromi emettono luce di diverso colore, ed è possibile così marcare differenti compartimenti cellulari per studiarne la morfologia, la distribuzione e l'interazione o, nel caso di analisi in vivo, la loro dinamica e funzionalità.

2.5. Fluorescenza polarizzata

La fluorescenza oggi riveste un ruolo di primo piano nei saggi di binding perché permette di effettuare i vari processi con un notevole risparmio di tempo e quindi adatta agli screening ad alta risoluzione. Basti pensare che gli step di separazione e di lavaggio che sono dispendiosi, lenti e causa di probabili errori vengono evitati; inoltre poiché nei saggi biologici è richiesta una concentrazione dell'ordine dei nanomolari, l'elevata sensibilità della fluorescenza permette di applicarla con notevole sicurezza in tali tecniche.

Paragonando le potenzialità dei metodi fluorescenti ai classici metodi basati sulla radioattività ci rendiamo ancor meglio conto di quanto detto. Per esempio, 10 fmol di trizio danno approssimativamente 5 conte per secondo in un classico contatore β , mentre la stessa quantità di un composto fluorescente può dare fino a 3 milioni di conte per secondo in uno strumento opportuno.

La tecnica della fluorescenza polarizzata (FP) è già ampiamente usata nei saggi in clinica diagnostica per effettuare i saggi di immunobinding, ma più di recente, con l'avvento dei *microplates*, sta conoscendo largo utilizzo nella scoperta di nuovi farmaci.

Se una soluzione di una molecola fluorescente viene eccitata da una luce linearmente polarizzata solo le molecole il cui momento dipolare è orientato in

modo approssimativamente parallelo al vettore elettrico della luce incidente saranno eccitate. Pertanto, se durante l'eccitazione l'orientazione della molecola non cambia, l'emissione di fluorescenza sarà anch'essa polarizzata. Al contrario, se la molecola va incontro ad un processo di riorientazione durante lo stato eccitato, l'emissione fluorescente sarà depolarizzata. L'eccitazione preferenziale rispetto ad altre, in un campione disordinato, a seconda dell'orientazione relativa dei rispettivi momenti di transizione con il campo elettrico, è detto fotoselezione. Questo processo è schematizzato in **Fig.2.12**.

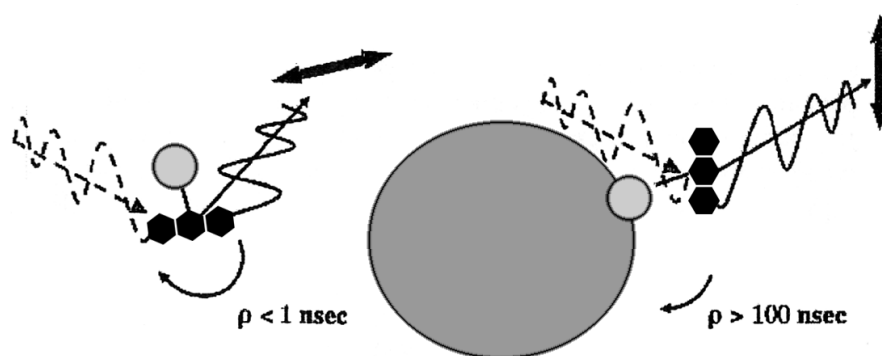


Fig. 2.12

Un composto fluorescente legato ad una macromolecola (un recettore ad esempio) risulta congelato in una specifica orientazione e permette quindi l'emissione di luce fluorescente. Questo è il principio base su cui si fondano i saggi di binding con la tecnica della fluorescenza polarizzata.

La lettura però della luce uscente richiede una strumentazione che differisce dai classici spettrofluorimetri seppure viene conservata lo stesso angolo di rivelazione pari a 90° . Al classico schema dello spettrofluorimetro bisogna interporre tra monocromatore di eccitamento e campione e tra campione e monocromatore di emissione altri due polarizzatori (*prismi di Nicol*), montati in modo che il loro orientamento possa essere rispettivamente parallelo e perpendicolare (**Fig2.13**).

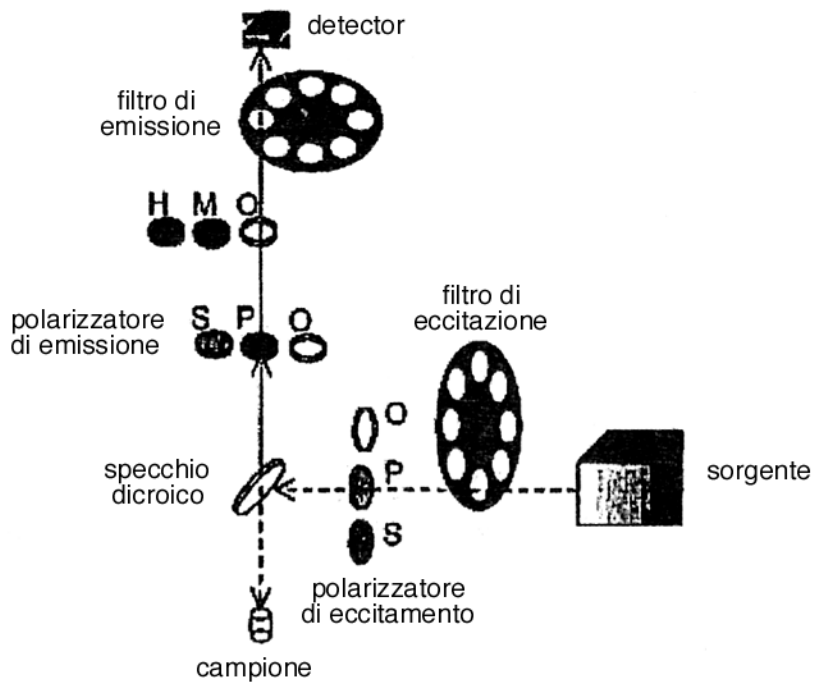


Fig. 2.13

La luce alla corretta lunghezza d'onda è linearmente polarizzata e focalizzata contro il campione in esame e l'intensità di fluorescenza è quantificata dopo il passaggio attraverso un filtro polarizzante, come uno specchio dicroico.

Si misurano le intensità di fluorescenza con il polarizzatore di emissione orientato parallelamente $I_{||}$ e perpendicolarmente I_{\perp} al polarizzatore di eccitazione e vengono valutati l'anisotropia r o la polarizzazione P .

Un composto fluorescente complessato con una molecola ad elevato peso molecolare darà un alto valore di anisotropia, al contrario lo stesso fluorescente complessato con una molecola a basso peso molecolare fornirà un basso valore di anisotropia.

Dal momento che nei saggi di binding le molecole complessanti sono rappresentati dai recettori di membrana, quindi macromolecole ad elevato peso molecolare, si otterranno degli alti valori di anisotropia, e quindi facilmente elaborabili [129].

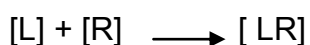
Infine, un ulteriore vantaggio della fluorescenza polarizzata che ne accresce la sua sensibilità è dato dal fatto che questi saggi sono poco suscettibili ai

fenomeni di quenching o alla compresenza di composti colorati, poiché l'anisotropia è una quantità intrinseca mentre la fluorescenza no.

2.6. Saggio di binding fluorescente

Il saggio di binding con composti fluorescenti segue le stesse regole e principi dei classici saggi con sostanze radioattive.

La reazione tra un ligando (L) e un recettore (R) può essere così schematizzata:



Dove [L] è la concentrazione del ligando, [R] è la concentrazione del recettore e [LR] è la concentrazione del complesso ligando-recettore.

La formazione del complesso LR è una reazione reversibile che possiede una costante di equilibrio:

$$K_a = [LR] / [R] [L]$$

K_a viene definita costante di affinità ed indica quanto la reazione è spostata verso destra ed è quindi correlata alla forza del legame del ligando al recettore. Negli studi di binding si utilizza invece la costante di dissociazione K_D della reazione inversa e cioè:

$$K_D = [R] [L] / [LR] = 1 / K_a$$

L'esecuzione degli studi di *binding* comporta l'incubazione di una preparazione contenente il recettore in esame, anche non purificato, con un ligando di tale recettore, marcato con un isotopo radioattivo, in condizioni di tempo, temperatura e pH controllati.

Durante il periodo di incubazione, una porzione del ligando L forma con il recettore una certa quantità di complesso RL; al termine dell'incubazione, si separa con metodi opportuni L rimasto libero da RL, che naturalmente è radioattivo, e si misura la radioattività associata al complesso ligando-recettore. Dall'elaborazione dei dati di radioattività legata si possono ricavare i parametri caratteristici dell'interazione.

Il ligando deve essere marcato ad alta attività specifica (con ^3H o ^{125}I generalmente) per assicurare sensibilità alla metodica. Il tempo di incubazione

deve essere sufficiente al raggiungimento dell'equilibrio, se i parametri che si cerca di determinare sono appunto quelli dell'equilibrio (K_d o B_{max}), oppure è variabile negli studi volti a determinare le caratteristiche cinetiche.

La separazione del complesso RL dal ligando rimasto libero si può eseguire con vari metodi, che non devono modificare la concentrazione di RL raggiunta.

Nel caso di cellule intatte, o di recettori associati alla membrana cellulare, il metodo più usato consiste nel filtrare il campione alla fine dell'incubazione; le cellule (o membrane) e quindi il recettore (R e RL) vengono trattenuti dal filtro, mentre L passa attraverso di esso.

Si misura quindi la radioattività associata al filtro, che permette di calcolare [RL] per ogni concentrazione di L utilizzata, e quindi, almeno in teoria, di costruire curve (Fig. 2.14).

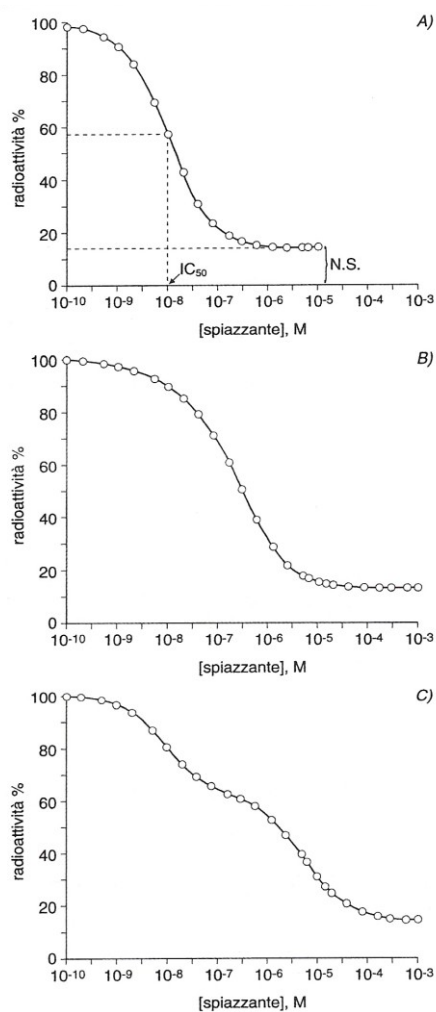


Fig. 2.14

In realtà, la curva che si ottiene risulta piuttosto simile alla curva 1 (**Fig. 2.15**).

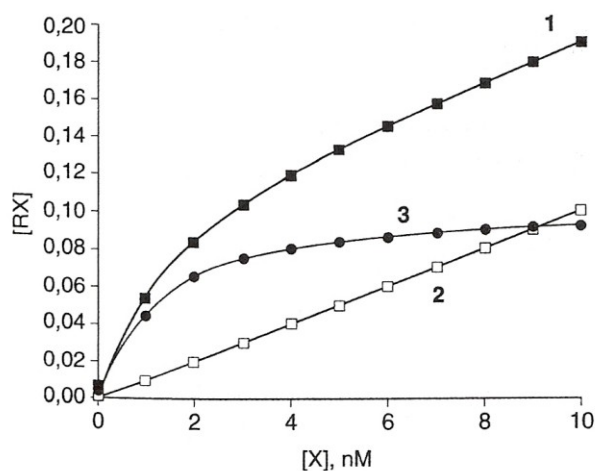


Fig. 2.15 Calcolo del legame specifico a partire dal legame totale e del legame non specifico in un esperimento di *binding* per spiazzamento.

Invece di raggiungere un *plateau*, le curve di *binding* ottenute nella pratica tendono a salire in modo rettilineo.

Questa discrepanza fra teoria e pratica è dovuta all'esistenza di un compartimento a cui il ligando si lega in modo non saturabile; il legame non saturabile, dovuto sia al preparato biologico, sia al sistema di separazione di RL da L, viene definito *binding* non specifico, e si misura valutando il legame residuo di ogni concentrazione di ligando radioattivo in presenza di un forte eccesso (almeno 100 volte rispetto al ligando marcato) di ligando non marcato (**Fig. 2.15** curva 2).

In quest'ultima situazione, infatti, il ligando marcato viene spiazzato da tutti i siti saturabili, compresi quelli recettoriali. Calcolando la differenza fra le curve 1 e 2, si ottiene la curva 3 di *binding* specifico.

Quindi attraverso l'esecuzione di un esperimento di *binding* all'equilibrio, si possono costruire curve come quelle mostrate in **Fig. 2.14**.

Da un punto di vista pratico, la fluorescenza polarizzata semplifica notevolmente il lavoro in più punti di vista:

- vengono eliminati i processi di lavaggio e di filtrazione con notevoli vantaggi, infatti quest'ultima operazione può essere la causa principale di errori se non viene svolta da operatori esperti.

- non si usano sostanze radioattive con maggiore sicurezza del personale addetto ai lavori

- tramite l'uso dei *microplates*, particolari dispositivi contenenti centinaia di pozzetti, è possibile saggiare numerosissimi campioni contemporaneamente. Inoltre quello che andremo a misurare non sarà più la radioattività associata al complesso [RL], bensì la sua anisotropia.

Tuttavia un accorgimento deve essere affrontato: dal momento che non si esegue una filtrazione, i valori di anisotropia che si ottengono sono dati da entrambe le specie fluorescenti presenti in soluzione e cioè la frazione di ligando libero e la frazione legata. Per ovviare a questo inconveniente si devono applicare le seguenti equazioni che permettono di discriminare l'anisotropia del complesso [LR] da quella del solo ligando:

$$[LR] = [\lambda (r_{\max} - r) / (r - r_{\min}) + 1]^{-1}$$

$$[LR] = \{[\lambda (3000 - P_{\min}) (P_{\max} - P) / (3000 - P_{\max}) (P - P_{\min})] + 1\}^{-1}$$

dove r o P è l'anisotropia misurata.

r_{\min} (o P_{\min}) rappresenta l'anisotropia del ligando libero, r_{\max} (o P_{\max}) è l'anisotropia ottenuta al 100% del binding, ovvero quando tutte le molecole sono legate al recettore; mentre λ che è la quantità di fluorescenza molare è data dall'espressione $\lambda = Q_b / Q_f$ dove Q_f e Q_b sono le intensità di fluorescenza rispettivamente del ligando libero e legato diviso il valore della concentrazione molare del ligando stesso [133].

Per quanto riguarda la tipologia dei saggi di binding radioattivi possiamo distinguere due diversi tipi di protocolli sperimentali:

- esperimenti di binding di saturazione
- esperimenti di binding per spiazzamento o competizione

entrambe le due procedure possono essere applicate alla fluorescenza polarizzata.

Nella procedura tradizionale, gli esperimenti di saturazione utilizzano concentrazioni crescenti di ligando marcato, mentre negli esperimenti di spiazzamento (**Fig. 2.16**) tutti i campioni contengono la stessa concentrazione di ligando marcato e concentrazioni crescenti di ligando non marcato. Gli esperimenti di spiazzamento ci consentono di valutare l'affinità di un ligando per un recettore utilizzando un altro ligando radioattivo che si lega allo stesso recettore.

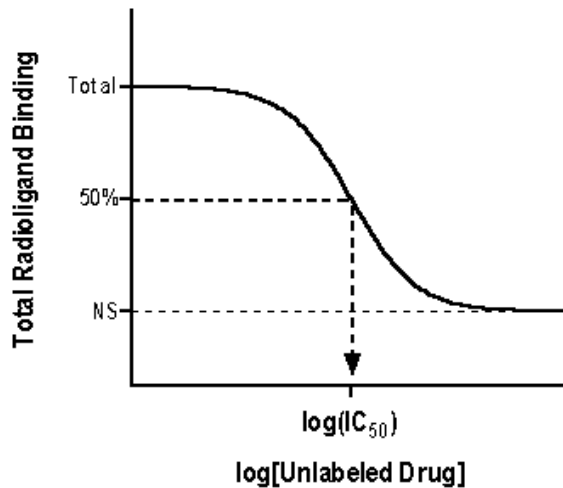


Fig. 2.16

La K_D del ligando non marcato in genere viene indicata con K_i , per indicare che ci si riferisce al ligando che inibisce il legame del composto marcato, e viene calcolata a partire dalla IC_{50} , tramite l'equazione di Cheng e Prusoff [130]:

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_D)$$

Gli esperimenti per competizione offrono notevoli vantaggi rispetto a quelli per saturazione, perché permettono di utilizzare sia una minore quantità di ligando radioattivo, sia di diminuire il numero di campioni per esperimento, a parità di concentrazioni di ligando.

La fluorescenza polarizzata allarga ancora di più gli orizzonti, perché oltre a poter analizzare tantissimi campioni tutti contemporaneamente, offre maggiori sicurezze in quanto il ligando fluorescente va a sostituire il ligando radioattivo. Avremo quindi che la competizione sarà tra il fluoroforo e la sostanza incognita da testare, la lettura dei risultati verrà svolta con opportuni spettrofluorimetri e dai risultati si potranno costruire curve di affinità in cui nelle ascisse verrà riportata la concentrazione e nelle ordinate il valore di anisotropia.

Pertanto la ricerca e la sintesi di nuovi ligandi fluorescenti altamente selettivi nei confronti di una specie recettoriale, da usare come standard, costituisce la base e il presupposto per lo sviluppo di questa nuova tecnica.

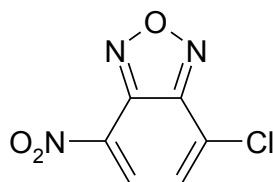
Capitolo 3

Progettazione razionale

Un prerequisito per l'applicazione delle tecniche di fluorescenza è che le molecole d'interesse devono essere fortemente fluorescenti e distinguibili dalla fluorescenza naturale di fondo. Solo raramente un ligando è fluorescente di per sé e i recettori sono normalmente indistinguibili dall'autofluorescenza cellulare. Pertanto queste molecole devono essere marcate da un adeguato marker fluorescente. Molti sforzi sono stati dedicati alla sintesi di ligandi fluorescenti che seguono il profilo farmacologico dei ligandi non marcati [131]. Una delle strategie utilizzate è quella di legare covalentemente un fluoroforo attraverso reazioni chimiche standard a un particolare gruppo funzionale nella molecola target [132-133]

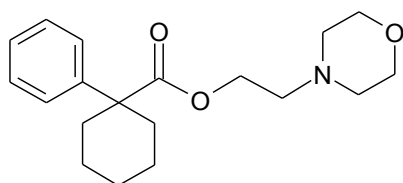
Prendendo in considerazione i recettori σ , la progettazione e la sintesi di composti fluorescenti, in grado di legare tali recettori con alta affinità, potrebbe essere utile a fornire informazioni di localizzazione, *trafficking* cellulare e biologico-molecolari. Considerando che i recettori σ_1 sono coinvolti nei disturbi cognitivi, nella depressione e nella schizofrenia e che i recettori σ_2 , invece, sono overespressi in linee cellulari tumorali, ligandi σ fluorescenti potrebbero essere utili alla diagnosi di patologie neurodegenerative e tumorali. Inoltre per meglio chiarire il coinvolgimento fisiologico e patologico dei recettori σ_1 e σ_2 nella crescita delle cellule tumorali, un ligando fluorescente potrebbe rappresentare un potenziale *tool* molecolare per lo studio della vitalità cellulare.

Considerato il basso peso molecolare della maggior parte dei ligandi σ selettivi, l'inserimento di *probes* fluorescenti ingombranti ed ad alto peso molecolare potrebbe comportare una perdita di affinità. Allo scopo di evitare ciò, sono stati progettati una serie di potenziali ligandi σ fluorescenti aventi come *probe* fluoroforo il nucleo 4-nitro-2,1,3-benzossadiazolico (NBD).

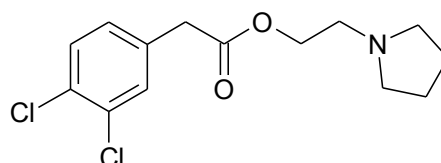


NBD- chloride

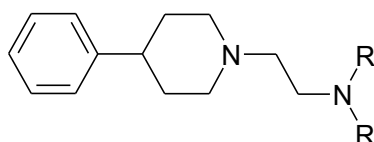
Questo nucleo, pur avendo una bassa resa quantica in soluzione acquosa, consta di ridotto ingombro sterico e quindi di basso impatto sull'affinità del ligando. Inoltre, diventa altamente fluorescente in solventi non polari, quando è legato alla membrana cellulare o inserito in una tasca idrofobica della proteina. Le molecole progettate e sintetizzate sono strutturalmente correlate ai ligandi σ selettivi denominati PRE-084, AC-915 e a derivati a nucleo 4-fenilpiperidinico e piperazinico con elevata affinità presenti in letteratura.



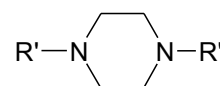
PRE-084



AC-915



4-Fenilpiperidine

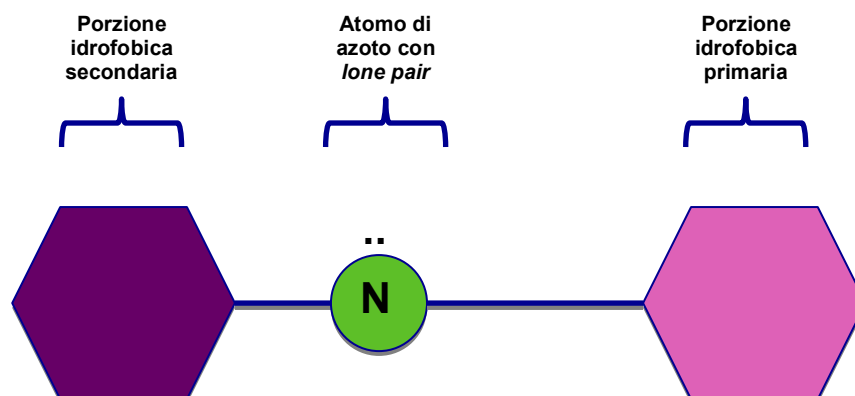


Piperazine

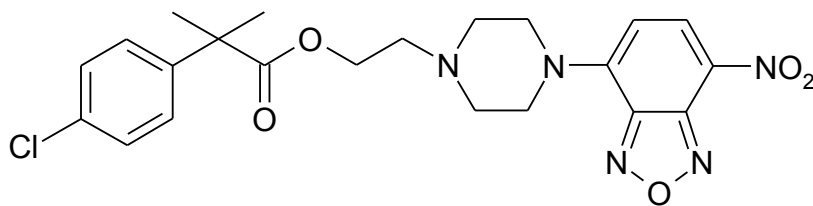
Ricordando che le caratteristiche strutturali per un'alta affinità di binding verso i recettori σ prevedono la presenza di:

- un atomo di azoto
- una regione idrofobica primaria
- una regione idrofobica secondaria

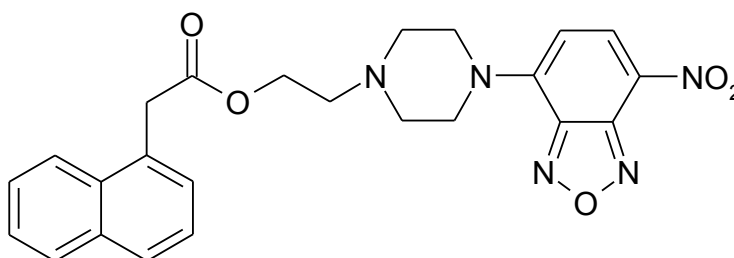
MODELLO FARMACOFORICO



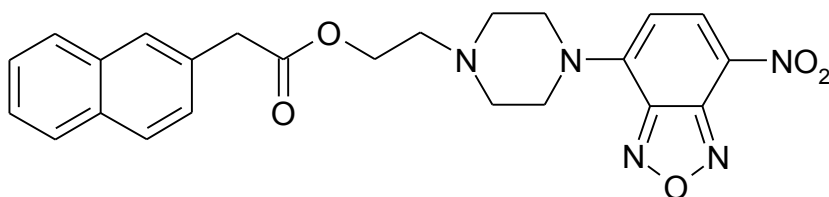
le molecole progettate e sintetizzate sono le seguenti:



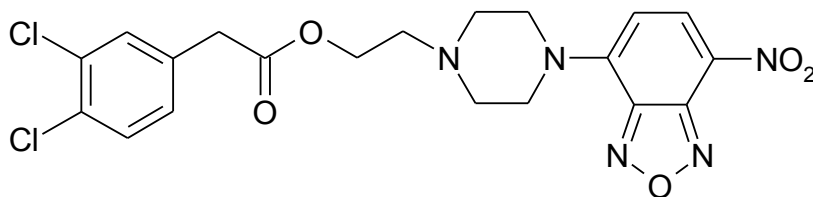
MRMA-1



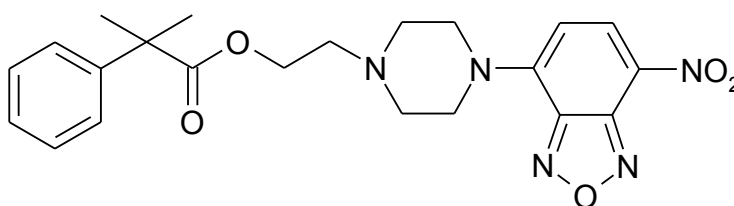
MRMA-2



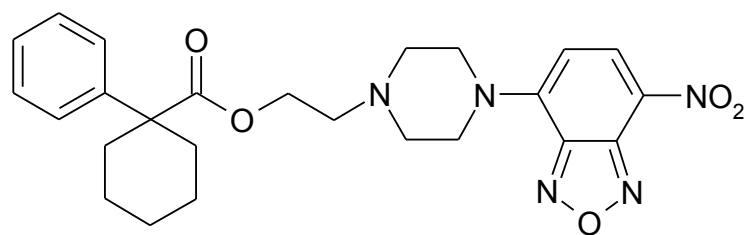
MRMA-3



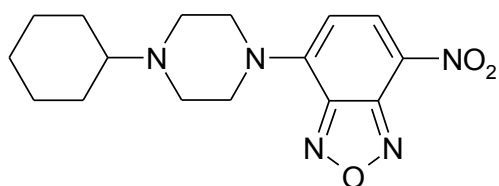
MRMA-4



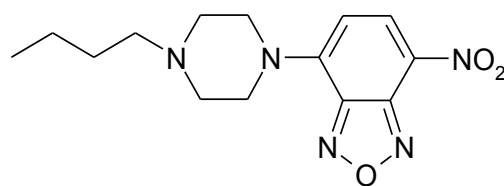
MRMA-5



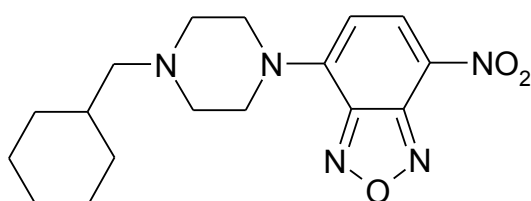
MRMA-6



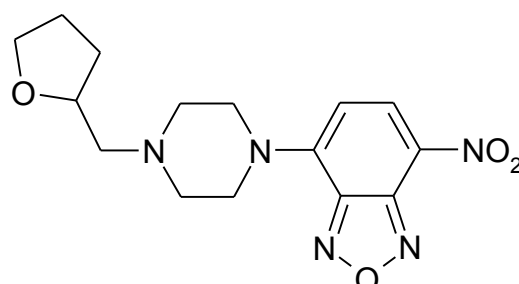
MRMA-7



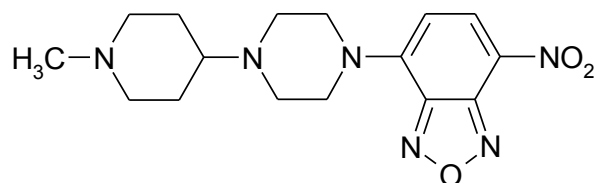
MRMA-8



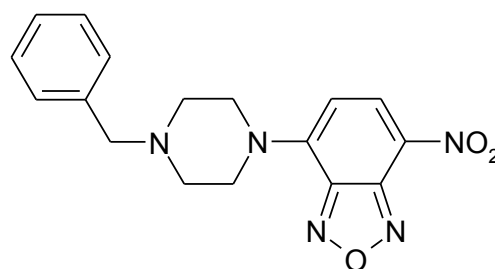
MRMA-9



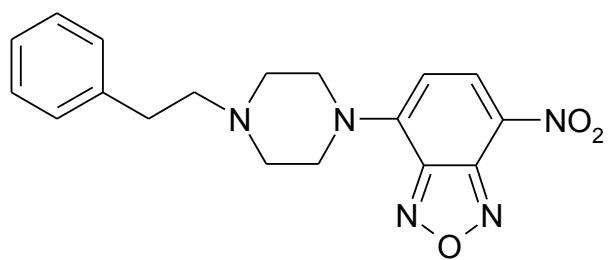
MRMA-10



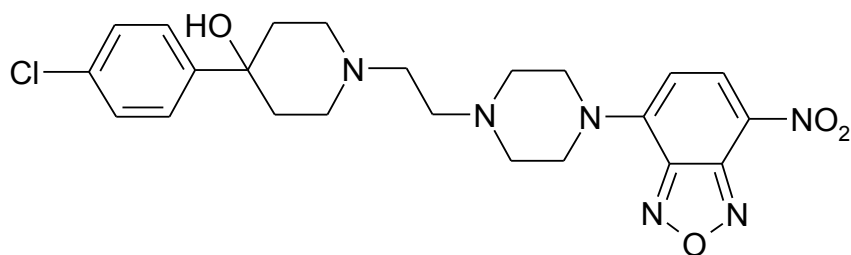
MRMA-11



MRMA-12



MRMA-13



MRMA-14

Capitolo 4

Parte sperimentale chimica

4.1. Materiali e metodi

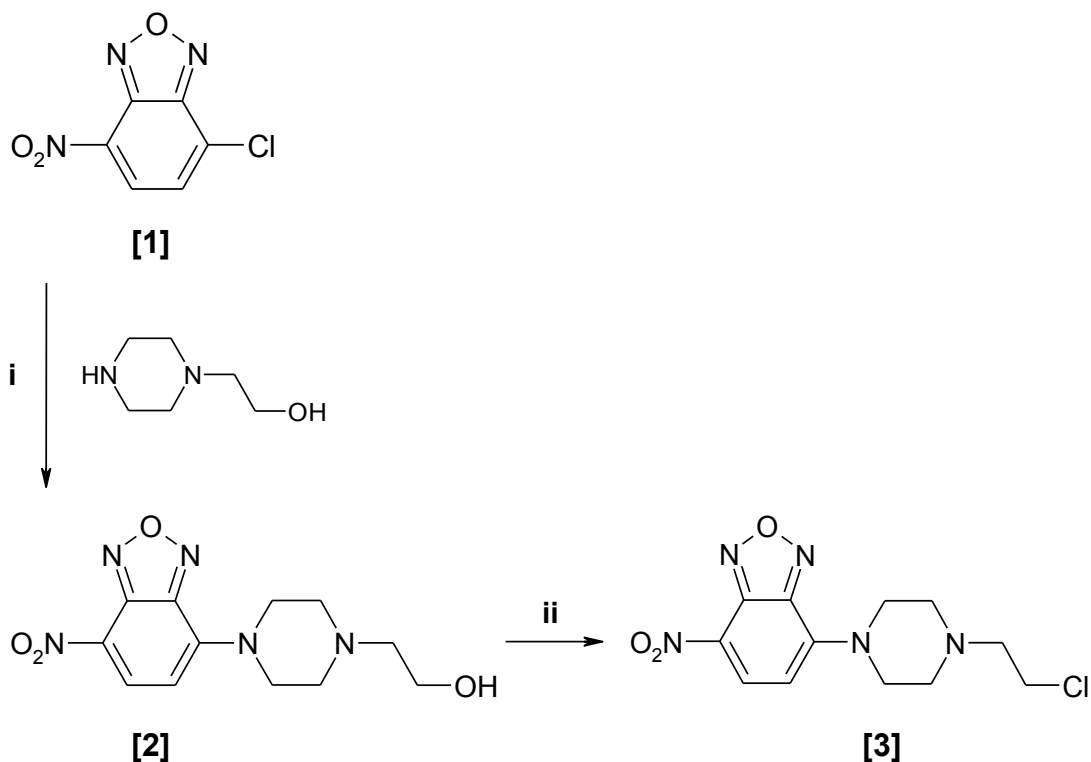
I punti di fusione dei composti sintetizzati sono stati determinati mediante un apparecchio BUCHI 530 utilizzando un tubo capillare aperto e sono non corretti. Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Inova 200 MHz, e sono stati eseguiti in una soluzione di CDCl_3 contenenti lo 0,03% di TMS (tetrametilsilano). La purificazione dei prodotti è stata eseguita mediante "flash chromatography" utilizzando colonne in vetro del diametro compreso tra 1 e 8 cm, impaccate con gel di silice Si 60 0.040-0.063 mm 230-400 mesh ASTM (Merck). La purezza dei composti sintetizzati è stata verificata tramite cromatografia su strato sottile (TLC), su foglio di alluminio al gel di silice 60 F₂₅₄ (Merck) e mediante analisi elementare, CHN, utilizzando lo strumento "ELEMENTAL ANALYZER CHNS-0 EA1106", Carlo Erba (con valori sperimentali con scarto non superiore al $\pm 0,4\%$).

4.2. Discussione chimica

Il 2-[4-(7-nitro-benzo[1,2,5]ossadiazol-4-il)-piperazin-1-il]-etanolo **[2]** è stato ottenuto partendo da una soluzione di 4-cloro-7-nitro-2,1,3-benzossadiazolo (NBD-cloruro) **[1]** in THF a cui è stato aggiunta lentamente a 0°C una soluzione di 2-piperazinil-1-etanolo [134].

Il 4-[4-(2-cloroetil)piperazin-1-il]-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazolo **[3]** è stato ottenuto aggiungendo all'intermedio **[2]** il cloruro di tionile a 0°C e portando poi a refluxo la soluzione per 2h [135](**Schema 1**).

Schema 1

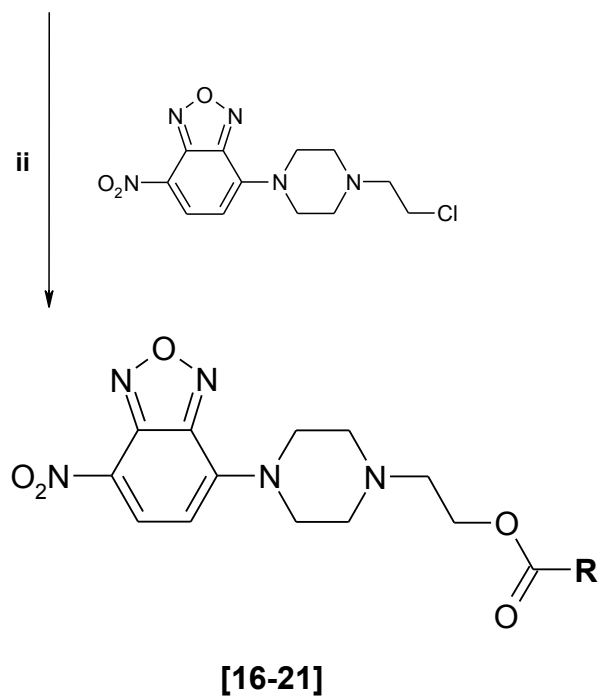
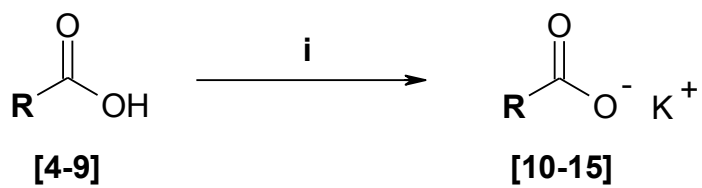


(i) THF , 0°C

(ii) SOCl₂ , CH₂Cl₂ , reflux

I sali potassici **[10-15]** sono stati ottenuti salificando i rispettivi acidi **[4-9]** con bicarbonato di potassio in soluzione acquosa. La sintesi degli esteri finali **[16-21]** viene effettuata solubilizzando il cloruro **[3]** in isopropanolo anidro e aggiungendo goccia a goccia una soluzione isopropanolica del rispettivo sale potassico **[10-15]** e la soluzione finale viene portata a refluxo a per 48 h [136] (**Schema 2**).

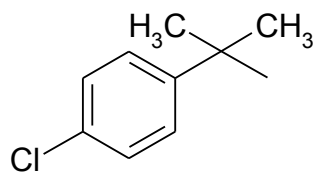
Schema 2



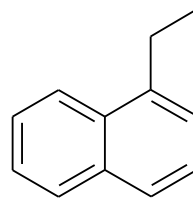
(i) $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{H}_2\text{O}$, reflux

(ii) $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$, reflux

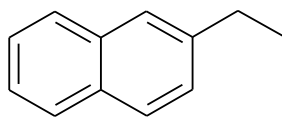
R



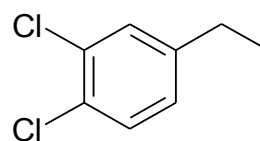
[4]



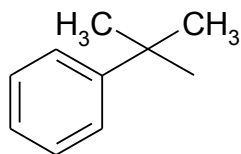
[5]



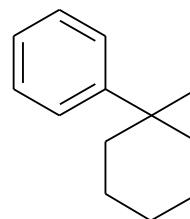
[6]



[7]

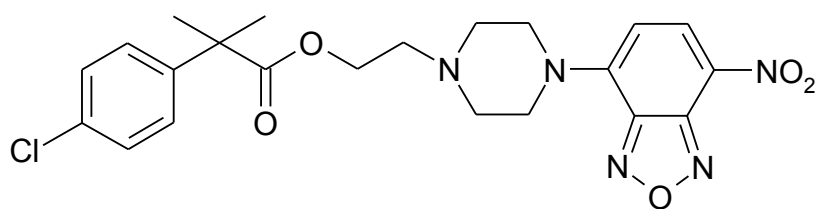


[8]

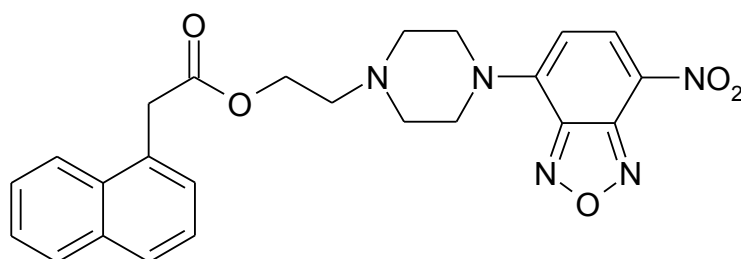


[9]

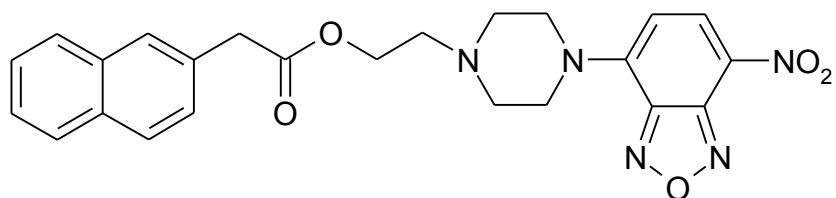
I prodotti finali che ne derivano sono i seguenti:



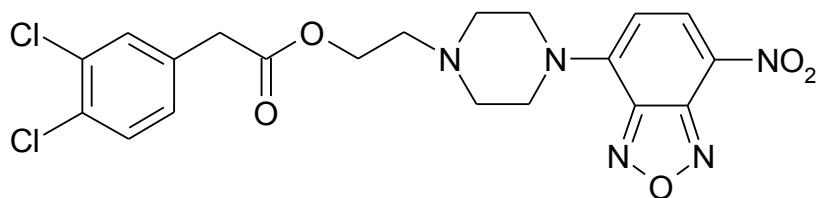
[16]



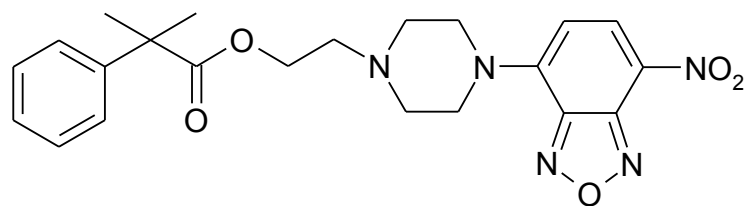
[17]



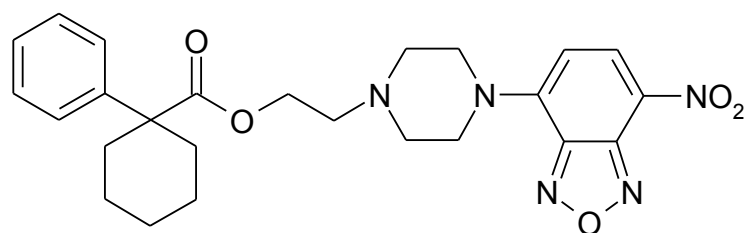
[18]



[19]



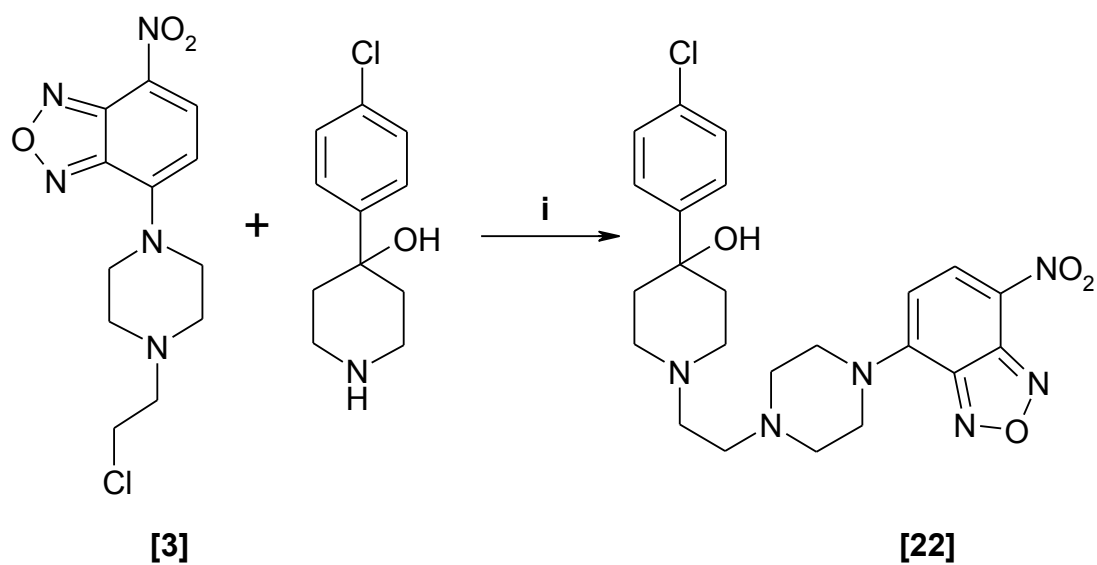
[20]



[21]

Il composto finale **[22]** è stato ottenuto per trattamento dell'ammina commercialmente disponibile 4-(4-clorofenil)piperidin-4-olo con l'intermedio **[3]**[138] (**Schema 3**).

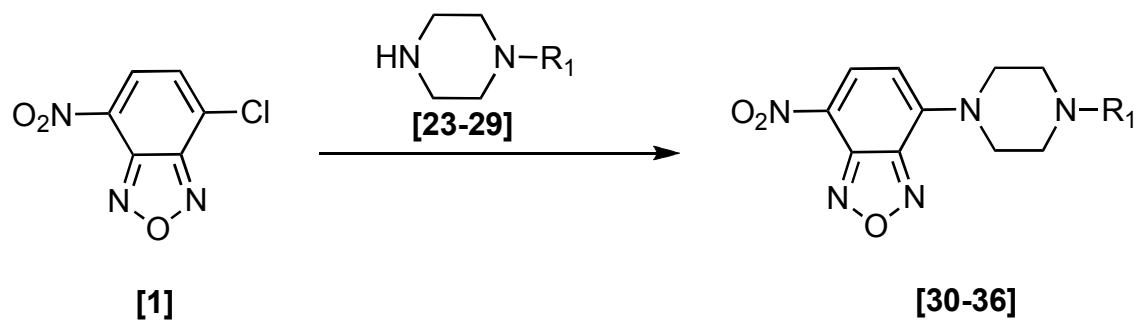
Schema 3



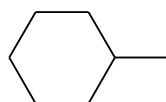
(ii) $\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$, reflux

I composti finali **[30-36]** sono state sintetizzate per trattamento delle rispettive ammine commerciali **[23-29]** con il cloruro **[3]** [136] (**Schema 4**)

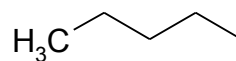
Schema 4



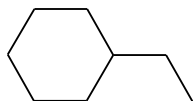
R₁



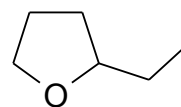
[23]



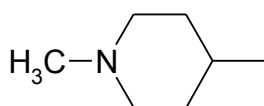
[24]



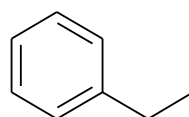
[25]



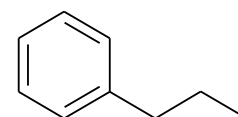
[26]



[27]

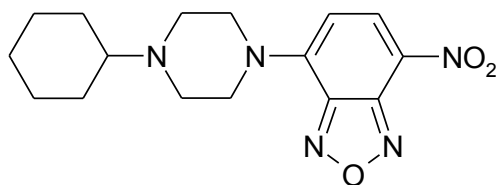


[28]

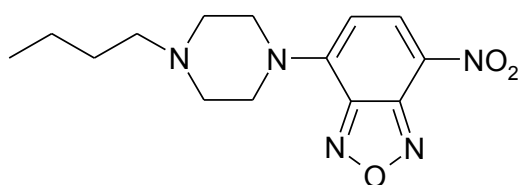


[29]

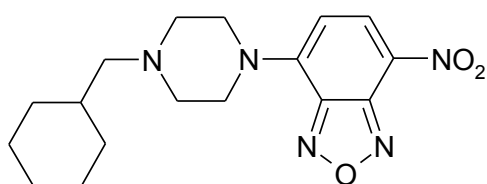
I prodotti finali che ne derivano sono i seguenti:



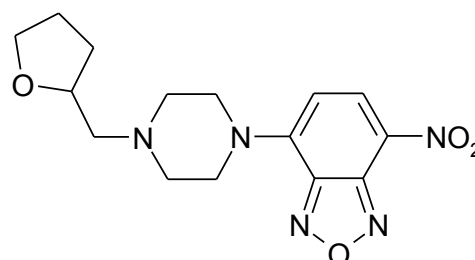
[30]



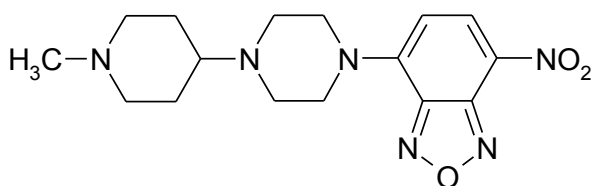
[31]



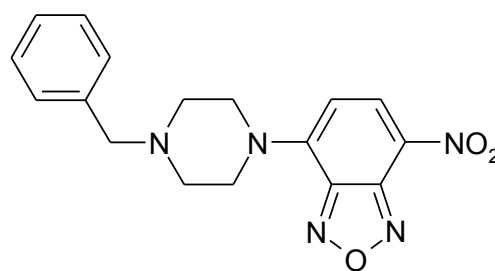
[32]



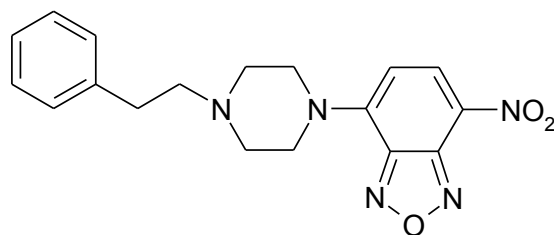
[33]



[34]



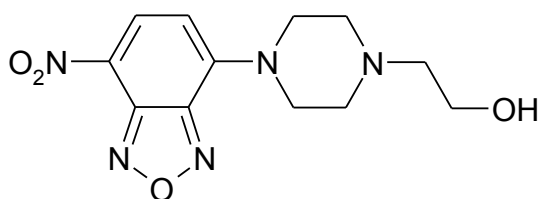
[35]



[36]

4.3. Sintesi

2-[4-(7-NITRO-BENZO[1,2,5]OSSADIAZOL-4-IL)-PIPERAZIN-1-IL]- ETANOLO



[2]

Una soluzione di 4-cloro-7-nitro-benzo[2,1,3]ossadiazolo **[1]** (2.2 g, 11 mmol) in THF anidro (80 ml) viene lentamente aggiunta ad una soluzione tetraidrofuranica di 2-piperazinil-1-etanolo (5 g, 38.4 mmol) a 0° C. Il colore della soluzione cambia istantaneamente dall'arancio al rosso. Dopo aver evaporato il solvente, il prodotto viene disciolto nella minima quantità di metanolo/acetone (1:1) e la soluzione viene fatta gocciolare in cloroformio (500 ml).

La miscela viene quindi trattata con acqua, la fase organica viene anidrificata con sodio solfato anidro e purificata mediante flash cromatografia su colonna utilizzando come eluente una soluzione 9:1 di cloroformio/etanolo.

Si sono ottenuti 3 g di un prodotto solido rosso con una resa del 92%.

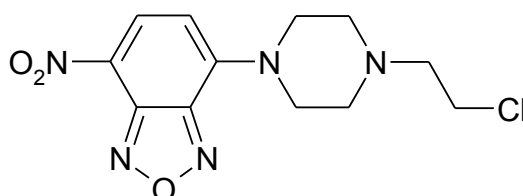
¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.44 (d, 1H, $J=8.8$ Hz); 6.32 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 4.14 (t, 4H, $J=5.0$ Hz)
3.72 (t, 2H, $J=5.4$ Hz); 2.8 (t, 2H, $J=5.0$ Hz) 2.67 (t, 4H, $J=5.2$ Hz)

¹³C NMR (CDCl₃)

δ = 138.22; 132.04; 125.69; 125.57; 120.08; 102.67; 59.20; 57.95; 52.48;
49.34

**4-[4-(2-CLOROETIL)-PIPERAZIN-1-IL]-7-NITRO
BENZO[1,2,5]OSSADIAZOLO**



[3]

Ad una soluzione di 2-[4-(7-nitro-[2,1,3]benzossadiazolo-4-il)-piperazin-1-il]-etanolo (200 mg, 0.682 mmol) **[2]** in diclorometano anidro (10 ml) viene aggiunto SOCl_2 , (0.2 ml, 309 mg, 2.6 mmol), a 0°C. Quindi la soluzione viene portata dapprima a refluxo per due ore e poi lasciata una notte alla temperatura di 35° C.

La soluzione viene quindi distillata sotto vuoto, il solido lavato più volte con etere per eliminare l'eccesso di SOCl_2 e poi decantato. Viene quindi portato di nuovo sotto vuoto spinto fino ad ottenere 200 mg di un prodotto solido di colore arancio con una resa del 94%.

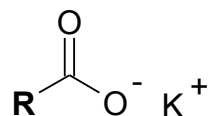
$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$

δ = 8.57 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 6.22 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 4.07 (t, 4H, $J=4.8$ Hz); 3.58 (t, 2H, $J=6.6$ Hz); 2.78 (t, 2H, $J=6.8$ Hz); 2.74 (t, 4H, $J=5.2$ Hz)

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$

δ = 144.96; 144.58; 135.83; 135.11; 123.02; 102.52; 59.08; 52.42; 49.23; 40.77

SALE POTASSICO DEGLI ACIDI



[10-15]

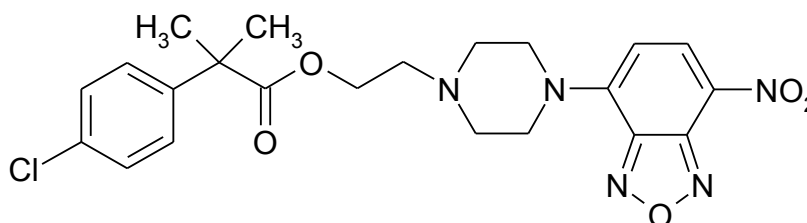
Ad una soluzione di bicarbonato di potassio disciolto in acqua alla temperatura di 120° C viene aggiunta lentamente una soluzione acquosa dell'acido da salificare. Si lascia a refluxo per un'intera notte fino a quando la soluzione non appare perfettamente limpida.

A fine reazione si distilla sotto vuoto e il precipitato viene lavato più volte con etere e qualche goccia di metanolo, quindi decantato. Si lascia il prodotto sotto un leggero flusso di azoto per far evaporare l'etere residuo e si essicca nuovamente sotto vuoto spinto.

Il prodotto di colore bianco che si ottiene viene conservato in *vial* e lasciato sotto vuoto per un'intera notte ad una temperatura di 45° C.

2-[4-(7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOL-4-IL)PIPERAZIN-1-IL]ETIL 2-(4-CLOROFENIL)-2-METILPROPIONATO

MRMA1



[16]

Ad una soluzione di 4-[4-(2-cloroetil)piperazin-1-il]-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[3]** (200 mg, 6.42×10^{-4} mol) in isopropanolo (100 ml), mantenuta sotto agitazione e riscaldamento, viene lentamente aggiunta goccia a goccia una soluzione isopropanolica (100 ml) di 2-(4-clorofenil)-2-metilpropanoato di potassio (0.760 g, 3.20 mmol). La soluzione cambia istantaneamente colore da arancione a rosso e viene lasciata a refluxo per 48 ore.

Si distilla sotto vuoto l'isopropanolo e il prodotto solido viene ripreso con diclorometano quindi lavato con acqua basica per NaHCO_3 e infine seccato su Na_2SO_4 .

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando come eluente cloroformio.

Si sono ottenuti 0.320 g di prodotto pulito con una resa dell'80%.

Il prodotto ottenuto infine è stato trasformato nel rispettivo cloridrato in etanolo assoluto tramite gorgogliamento di HCl gassoso puro.

^1H NMR (CHCl_3) (base libera)

δ = 8.39 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 7.45-7.18 (m, 4H) 6.27 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 4.24 (t, 2H, $J=5.4$ Hz) 3.99-3.95 (m, 4H) 2.64 (t, 2H, $J=5.4$ Hz) 2.60-2.55 (m, 4H) 1.59 (s, 6H).

^{13}C NMR (CDCl_3) (base libera)

δ = 174.97;144.78; 144.69; 144.58; 143.02; 136.22; 131.52; 128.29; 127.91; 123.00; 104.83; 59.73; 53.90; 50.49; 46.00; 45.76; 25.98

p.f. (cloridrato) 211-215°C

MICROANALISI

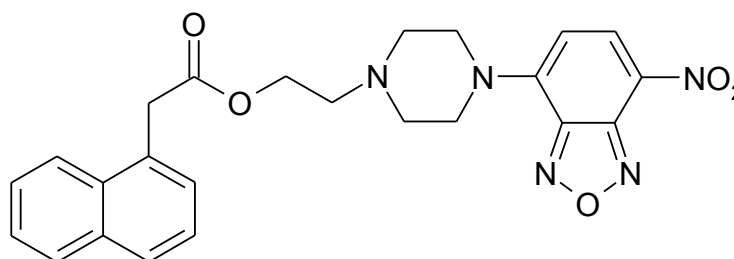
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	52.16	51.77	+ 0.39
% N	14.07	13.72	+ 0.35

% H	4.49	4.94	- 0.45
-----	------	------	--------

Formula: C₂₂H₂₄ClN₅O₅ · HCl (PM = 510.38)

2-[4-(7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOL-4-IL)PIPERAZIN-1-IL]ETIL 1-NAFTILACETATO

MRMA2



[17]

Ad una soluzione di 4-[4-(2-cloroetil)piperazin-1-il]-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[3]** (200 mg, 6.42 x 10⁻⁴ mol) in isopropanolo (100 ml), mantenuta sotto agitazione e riscaldamento, viene lentamente aggiunta goccia a goccia una soluzione isopropanolica (100 ml) di 1-naftilacetato di potassio (0.720 g, 3.20 mmol). La soluzione cambia istantaneamente colore da arancione a rosso e viene lasciata a reflusso per 48 ore.

Si distilla sotto vuoto l'isopropanolo e il prodotto solido viene ripreso con diclorometano quindi lavato con acqua basica per NaHCO₃ e infine seccato su Na₂SO₄.

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando come eluente una soluzione 9:1 di diclorometano/etanolo.

Si sono ottenuti 0.294 g di prodotto pulito con una resa dell'82%.

Il prodotto ottenuto infine è stato trasformato nel rispettivo cloridrato in etanolo assoluto tramite gorgogliamento di HCl gassoso puro.

¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.42 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 8.07 (m, 1H); 7.82 (m, 1H); 7.48 (m, 4H); 7.25 (s, 1H); 6.15 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 4.25 (t, 2H, $J=5.0$ Hz); 4.10 (s, 2H); 3.73 (t, 4H, $J=4.5$ Hz); 2.57 (t, 2H, $J=4.8$ Hz); 2.36 (t, 4H, $J=4.8$ Hz)

^{13}C NMR (CDCl_3)

δ = 174.07; 171.21; 144.73; 138.00; 137.23; 135.06; 133.75; 132.08; 130.54; 128.73; 128.17; 128.06; 126.36; 125.84; 125.53; 123.88; 102.32; 62.19; 56.07; 52.36; 49.09; 39.47

p.f.(cloridrato) 196-202°C

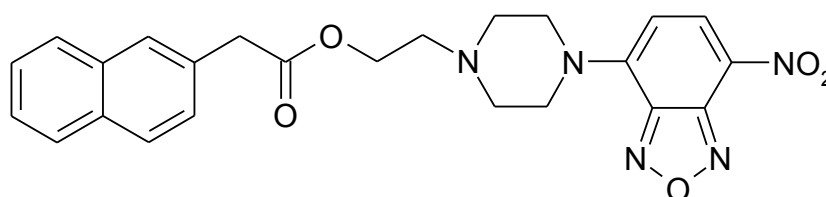
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	57.54	57.89	- 0.35
% N	14.28	14.06	+ 0.22
% H	4.85	4.86	- 0.01

Formula: $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$ (PM = 497.46)

2-[4-(7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOL-4-IL)PIPERAZIN-1-IL]ETIL 2-NAFTILACETATO

MRMA3



[18]

Ad una soluzione di 4-[4-(2-cloroetil)-piperazin-1-il]-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[3]** (200 mg, 6.42×10^{-4} mol) in isopropanolo (100 ml), mantenuta sotto agitazione e riscaldamento, viene lentamente aggiunta goccia a goccia una soluzione isopropanolica (100 ml) di 2-naftilacetato di potassio (0.720 g, 3.20 mmol). La soluzione cambia istantaneamente colore da arancione a rosso e viene lasciata a refluxo per 48 ore.

Si distilla sotto vuoto l'isopropanolo e il prodotto solido viene ripreso con diclorometano quindi lavato con acqua basica per NaHCO_3 e infine seccato su Na_2SO_4 .

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando come eluente una soluzione 9:1 di diclorometano/etanolo.

Si sono ottenuti 0.305 g di prodotto pulito con una resa dell'85%.

Il prodotto ottenuto infine è stato trasformato nel rispettivo cloridrato in etanolo assoluto tramite gorgogliamento di HCl gassoso puro.

^1H NMR (CDCl_3)

δ = 8.38 (d, 1H, $J=8.0$ Hz); 7.79 (m, 3H); 7.45 (m, 3H); 6.03 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 5.30 (s, 2H); 4.29 (t, 2H, $J=5.4$ Hz); 3.78 (m, 6H); 2.66 (t, 2H, $J=5.2$ Hz); 2.52 (t, 4H, $J=5.2$ Hz)

^{13}C NMR (CDCl_3)

δ = 171.24; 169.11; 144.71; 141.10; 139.22; 135.02; 133.33; 132.37; 131.50; 128.21; 128.02; 127.64; 127.55; 127.43; 126.31; 125.93; 102.38; 62.23; 56.08; 52.54; 49.06; 41.78

p.f.(cloridrato) 210-214°C

MICROANALISI

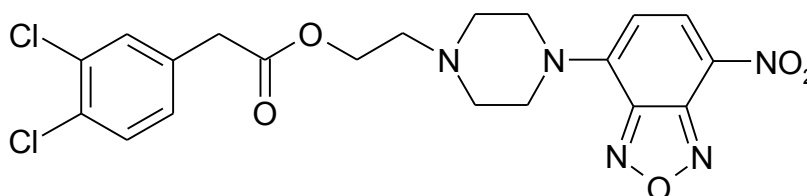
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	57.75	57.89	- 0.24

% N	14.37	14.06	+ 0.31
% H	4.76	4.86	- 0.10

Formula: C₂₄H₂₃N₅O₅ · HCl (PM = 497.46)

2-[4-(7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOL-4-IL)PIPERAZIN-1-IL]ETIL 3,4-DICLOROBENZOATO

MRMA4



[19]

Ad una soluzione di 4-[4-(2-cloroetil)-piperazin-1-il]-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[3]** (200 mg, 6.42 x 10⁻⁴ mol) in isopropanolo (100 ml), mantenuta sotto agitazione e riscaldamento viene lentamente aggiunta goccia a goccia una soluzione isopropanolica (100 ml) di 3,4-diclorobenzoato di potassio (0.7354 g, 3.20 mmol). La soluzione cambia istantaneamente colore da arancione a rosso e viene lasciata a refluxo per 48 ore.

Si distilla sotto vuoto l'isopropanolo e il prodotto solido viene ripreso con diclorometano quindi lavato con acqua basica per NaHCO₃ e infine seccato su Na₂SO₄.

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando come eluente una miscela 9:1 di cloroformio/etanolo.

Si sono ottenuti 0.294 g di prodotto pulito con una resa del 79%.

Il prodotto ottenuto infine è stato trasformato nel rispettivo cloridrato in etanolo assoluto tramite gorgogliamento di HCl gassoso puro.

¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.43 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 7.42 (dd, 1H, $J=1.2$ $J=6.4$ Hz); 7.26 (d, 1H, $J=0.5$ Hz); 7.14 (dd, 1H, $J=1.2$ $J=2.4$ Hz); 6.29 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 4.29 (t, 2H, $J=5.4$ Hz); 4.03 (t, 4H, $J=5.0$ Hz); 3.62 (s, 2H); 2.70 (m, 6H)

^{13}C NMR (CDCl_3)

δ = 167.29 138.22 134.38 133.29 132.49 132.04 131.88 129.66 125.69
125.57 120.08 85.16 62.49 59.06 56.73 45.34 40.84

p.f.(cloridrato)215-218°C

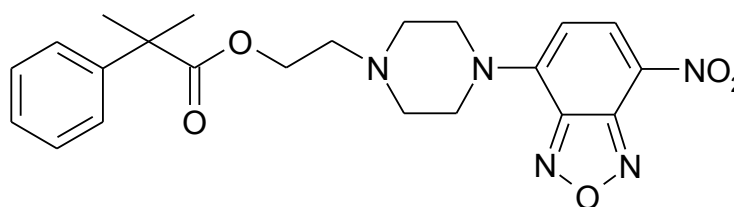
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	46.20	46.49	- 0.29
% N	13.73	13.55	+ 0.18
% H	3.79	3.90	- 0.11

Formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$ (PM = 516.77)

2-[4-(7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOL-4-IL)PIPERAZIN-1-IL]ETIL 2-METIL-2-FENILPROPIONATO

MRMA5



[20]

Ad una soluzione di 4-[4-(2-cloroetil)-piperazin-1-il]-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo [3] (200 mg, 6.42×10^{-4} mol) in isopropanolo (100 ml),

mantenuta sotto agitazione e riscaldamento, viene lentamente aggiunta goccia a goccia una soluzione isopropanolica (100 ml) di 2-metil-2-fenilpropanoato di potassio (0.650 g, 3.20 mmol). La soluzione cambia istantaneamente colore da arancione a rosso e viene lasciata a refluxo per 48 ore.

Si distilla sotto vuoto l'isopropanolo e il prodotto solido viene ripreso con diclorometano quindi lavato con acqua basica per NaHCO_3 e infine seccato su Na_2SO_4 .

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando come eluente una soluzione 9:1 di diclorometano/etanolo.

Si sono ottenuti 0.246 g di prodotto pulito con una resa del 72%.

Il prodotto ottenuto infine è stato trasformato nel rispettivo cloridrato in etanolo assoluto tramite gorgogliamento di HCl gassoso puro.

^1H NMR (CDCl_3)

δ = 8.41 (d, 1H, $J=7.4$ Hz); 7.41-7.23 (m, 5H); 6.24 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 4.24 (t, 2H, $J=5.2$ Hz); 3.95 (t, 4H, $J=5.2$ Hz); 2.62 (t, 2H, $J=5.2$ Hz); 2.54 (t, 4H, $J=5.0$ Hz); 1.60 (s, 6H)

^{13}C NMR (CDCl_3)

δ = 170.50; 141.04; 138.22; 132.04; 128.96; 128.06; 127.50; 125.69; 125.57; 120.08; 85.16; 63.50; 59.06; 56.73; 50.34; 45.34; 27.77

p.f.(cloridrato) 214-217°C

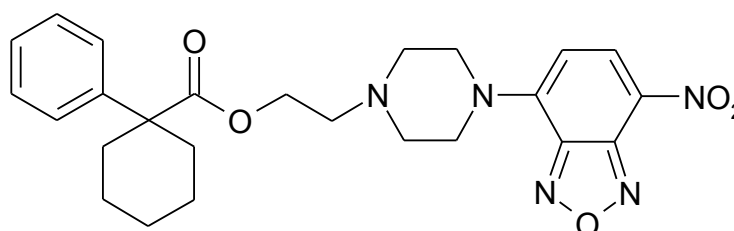
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	55.66	55.52	+ 0.14
% N	14.29	14.71	- 0.42
% H	5.72	5.51	+ 0.21

Formula: $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$ (PM = 475.94)

2-[4-(7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOL-4-IL)PIPERAZIN-1-IL]ETIL-1-FENILCICLOESAN CARBOSSILATO

MRMA6



[21]

Ad una soluzione di 4-[4-(2-cloroetil)-piperazin-1-il]-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[3]** (200 mg, 6.42×10^{-4} mol) in isopropanolo (100 ml), mantenuta sotto agitazione e riscaldamento, viene lentamente aggiunta goccia a goccia una soluzione isopropanolica (100 ml) di 1-fenil-cicloesancarbossilato di potassio (0.6552 g, 3.20 mmol). La soluzione cambia istantaneamente colore da arancione a rosso e viene lasciata a reflusso per 48 ore.

Si distilla sotto vuoto l'isopropanolo e il prodotto solido viene ripreso con diclorometano quindi lavato con acqua basica per NaHCO_3 e infine seccato su Na_2SO_4 .

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando come eluente una miscela 9:1 di cloroformio/etanolo.

Si sono ottenuti 0.251 g di prodotto pulito con una resa del 68%.

Il prodotto ottenuto infine è stato trasformato nel rispettivo cloridrato in etanolo assoluto tramite gorgogliamento di HCl gassoso puro.

$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$

δ = 8.38 (d, 1H, $J=7.6$ Hz); 7.45-7.18 (m, 5H); 6.23 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 4.24 (t, 2H, $J=5.4$ Hz); 3.94 (t, 4H, $J=5$ Hz); 2.62 (t, 2H, $J=5.0$ Hz); 2.53 (t, 4H, $J=4.8$ Hz); 1.8-1.25 (m, 10H)

^{13}C NMR (CDCl_3)

δ = 174.91; 145.03; 144.72; 144.70; 143.59; 135.12; 128.36; 126.74; 125.98; 123.20; 102.36; 61.79; 56.11; 52.42; 50.70; 49.32; 34.47; 25.50; 23.52

p.f.(cloridrato) 225-228°C

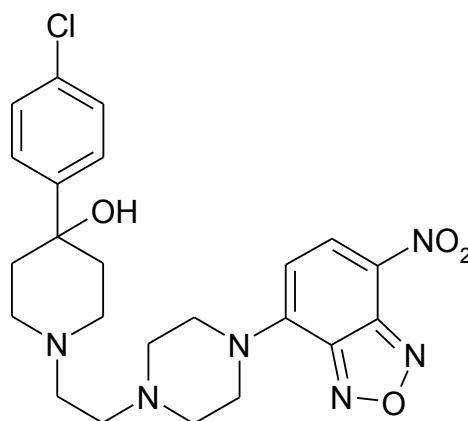
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	57.97	58.19	- 0.22
% N	13.98	13.57	+ 0.41
% H	5.98	5.86	+ 0.12

Formula: $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot \text{HCl}$ (PM = 516.00)

4-(4-CLOROFENIL)-1-{2-[4-(7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOL-4-IL)PIPERAZIN-1-IL]ETIL}-4-OSSIPIPERIDINA

MRMA14



[22]

Ad una soluzione di 4-[4-(2-cloroetil)-piperazin-1-il]-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[3]** (200 mg, 6.42×10^{-4} mol) in isopropanolo (100 ml), mantenuta sotto agitazione e riscaldamento, viene lentamente aggiunta goccia a goccia con una soluzione isopropanolica (100 ml) di 4-(4-clorofenil)-4-ossipiperidina (0.680 g, 3.20 mmol). La soluzione cambia istantaneamente colore da arancione a rosso e viene lasciata a refluxo per 48 ore.

Si distilla sotto vuoto l'isopropanolo e il prodotto solido viene ripreso con diclorometano quindi lavato con acqua basica per NaHCO_3 e infine seccato su Na_2SO_4 .

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia flash su colonna utilizzando come eluente una soluzione 9:1 di cloroformio/metanolo.

Il prodotto ottenuto infine è stato trasformato nel rispettivo cloridrato in etanolo assoluto tramite gorgogliamento di HCl gassoso puro.

$^1\text{H NMR (CDCl}_3)$

δ = 8.41 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 7.47-7.27 (m, 4H); 6.31 (d, 1H, $J=9.0$ Hz); 4.13 (t, 4H, $J=4.2$ Hz); 2.86-2.55 (m, 12H); 2.14-1.70 (m, 5H)

$^{13}\text{C NMR (CDCl}_3)$

δ = 149.05; 145.25; 144.72; 136.25; 130.74; 128.30; 127.69; 126.80; 121.00; 103.47; 69.34; 58.77; 55.48; 53.33; 50.09; 49.58; 38.48

p.f.(cloridrato) 190-194°C

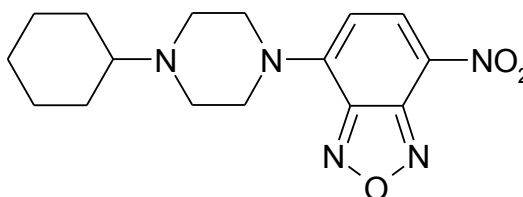
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	53.17	52.78	+ 0.39
% N	15.94	16.06	- 0.12
% H	5.63	5.39	+ 0.24

Formula: $C_{23}H_{27}ClN_6O_4 \cdot HCl$ (PM = 523.42)

4-(4-CICLOESILPIPERAZIN-1-IL)-7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOLO

MRMA7



[30]

Una soluzione di 4-cloro-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[1]** (0.4136 g, 2.073 mmol) in THF anidro (100 ml) viene lentamente aggiunta ad una soluzione tetraidrofuranica di 1-cicloesilpiperazina (0.2907 g, 1.727 mmol) a 0° C. Il colore della soluzione cambia istantaneamente dall'arancio al rosso.

Viene distillato il THF e il grezzo viene ripreso con cloroformio, lavato con acqua, la fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro e purificata tramite flash cromatografia su colonna usando come eluente una soluzione 9:1 di cloroformio/etanolo.

Si ottengono 415 mg di un precipitato rosso con una resa del 72%.

¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.35 (d, 1H, J=9.0 Hz); 6.24 (d, 1H, J=9.0 Hz); 4.07 (t, 4H, J=5.0 Hz); 2.78 (t, 4H, J=5.0 Hz); 1.84-1.03 (m, 10H)

¹³C NMR (CDCl₃)

δ = 145.14; 144.81; 144.76; 135.21; 102.24; 96.99; 63.32; 49.96; 48.68;
28.86; 26.12; 25.66

p.f. 240-246°C

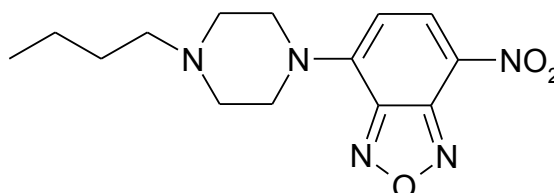
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	57.66	57.99	- 0.33
% N	21.25	21.13	+ 0.12
% H	6.64	6.39	+ 0.25

Formula: C₁₆H₂₁N₅O₃ (PM = 331.38)

4-(4-BUTILPIPERAZIN-1-IL)-7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOLO

MRMA8



[31]

Una soluzione di 4-cloro-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[1]** (0.4373 g, 2.20 mmol) in THF anidro (100 ml) viene lentamente aggiunta ad una soluzione

tetraidrofuranica di 1-butilpiperazina (0.260 g, 1.826 mmol) a 0° C. Il colore della soluzione cambia istantaneamente dall'arancio al rosso.

Viene distillato il THF e il grezzo viene ripreso con cloroformio, lavato con acqua, la fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄anidro e purificata tramite flash cromatografia su colonna usando come eluente una soluzione 9:1 di cloroformio/etanolo.

Si ottengono 468 mg di un precipitato rosso con una resa del 83%.

¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.41 (d, 1H, J=9.0 Hz); 6.30 (d, 1H, J=9.0 Hz); 4.13 (t, 4H, J=5.2 Hz); 2.69 (t, 4H, J=5.2 Hz); 2.43 (t, 2H, J=7.8 Hz); 1.60-1.25 (m, 4H); 0.95 (t, 3H, J=7.2 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃)

δ = 166.41; 145.16; 144.81; 135.15; 129.97; 102.39; 57.69; 52.74; 49.45; 28.87; 20.56; 13.98

p.f. 250-255°C

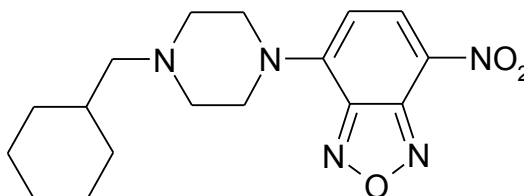
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	55.38	55.07	+ 0.31
% N	22.54	22.94	- 0.40
% H	6.38	6.27	+ 0.11

Formula: C₁₄H₁₉N₅O₃ (PM = 305.34)

**4[4-(CICLOESILMETIL)PIPERAZIN-1-IL]-7-NITRO-2,1,3-
BENZOSSADIAZOLO**

MRMA9



[32]

Una soluzione di 4-cloro-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[1]** (0.3687 g, 1.848 mmol) in THF anidro (100 ml) viene lentamente aggiunta ad una soluzione tetraidrofuranica di 1-(cicloesilmetil)piperazina (0.2814 g, 1.54 mmol) a 0° C. Il colore della soluzione cambia istantaneamente dall'arancio al rosso.

Viene distillato il THF e il grezzo viene ripreso con cloroformio, lavato con acqua, la fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro e purificata tramite flash cromatografia su colonna usando come eluente cloroformio.

Si ottengono 412 mg di un precipitato rosso con una resa del 77%.

¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.42 (d, 1H, J=9.0 Hz); 6.29 (d, 1H, J=9.0 Hz); 4.12 (t, 4H, J=5.0 Hz); 2.65 (t, 4H, J=5.0 Hz); 2.21 (d, 2H, J=7.2 Hz); 1.83-0.82 (m, 11H)

¹³C NMR (CDCl₃)

δ = 145.18; 144.79; 135.80; 135.21; 123.13; 102.30; 65.09; 53.12; 49.48; 34.94; 31.69; 26.68; 26.02

p.f. 230-237°C

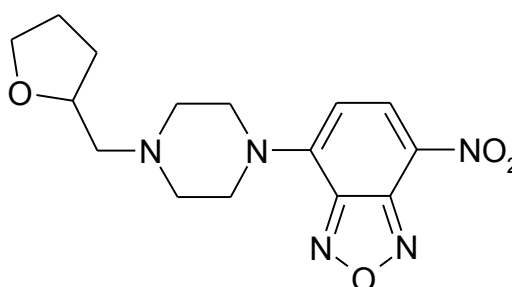
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	58.93	59.12	- 0.26
% N	20.45	20.28	+ 0.17
% H	6.92	6.71	+ 0.21

Formula: C₁₇H₂₃N₅O₃ (PM = 345.40)

4-NITRO-7-[4-(TETRAIDROFURAN-2-METIL)PIPERAZIN-1-IL]-2,1,3-BENZOSSADIOLO

MRMA10



[33]

Una soluzione di 4-cloro-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[1]** (0.3057 g, 1.800 mmol) in THF anidro (100 ml) viene lentamente aggiunta ad una soluzione tetraidrofuranica di 1-(2-tetraidrofuranimetil)piperazina (0.2814 g, 1.54 mmol) a 0° C. Il colore della soluzione cambia istantaneamente dall'arancio al rosso. Viene distillato il THF e il grezzo viene ripreso con cloroformio, lavato con acqua, la fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro e purificata tramite flash cromatografia su colonna usando come eluente cloroformio. Si ottengono 490 mg di un precipitato rosso con una resa del 81%.

¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.42 (d, 1H, $J=8.8$ Hz); 6.30 (d, 1H, $J=9.2$ Hz); 4.16-3.73 (m, 7H); 2.80 (t, 4H, $J=5.2$ Hz); 2.58-2.47 (m, 2H); 2.11-1.47 (m, 4H)

^{13}C NMR (CDCl_3)

δ = 171.41; 145.14; 144.78; 137.20; 135.18; 102.37; 76.47; 68.31; 62.81; 53.23; 49.35; 30.18; 25.36

p.f. 223-227°C

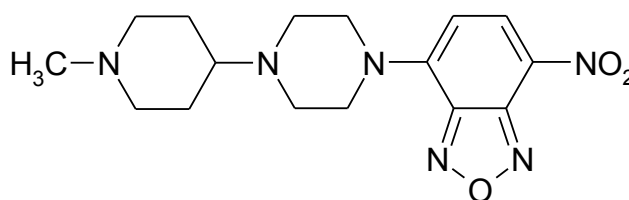
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	53.71	54.05	- 0.34
% N	20.95	21.01	- 0.06
% H	6.00	5.75	+ 0.25

Formula: $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_4$ (PM = 333.35)

4-[4-(1-METILPIPERIDIN-A-IL)PIPERAZIN-1-IL]-7-NITRO-2,1,3-BENZOSSADIAZOLO

MRMA11



[34]

Una soluzione di 4-cloro-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[1]** (0.2976 g, 1.6237 mmol) in THF anidro (100 ml) viene lentamente aggiunta ad una soluzione tetraidrofuranica di 1-(1-metilpiperidin-4-il)piperazina (0.390 g, 1.948 mmol) a 0° C. Il colore della soluzione cambia istantaneamente dall'arancio al rosso.

Viene distillato il THF e il grezzo viene ripreso con cloroformio, lavato con acqua, la fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro e purificata tramite flash cromatografia su colonna usando come eluente una soluzione 8:2 di cloroformio/metanolo più due gocce di ammoniacca.

Si ottengono 400 mg di un precipitato rosso con una resa del 70%.

1H NMR (CDCl₃)

δ = 8.42 (d, 1H, J=9.0 Hz); 6.30 (d, 1H, J=9.0 Hz); 4.12 (t, 4H, J=4.8 Hz); 2.98-2.79 (m, 7H); 2.30 (s, 3H); 2.05-1.60 (m, 6H)

13C NMR (CDCl₃)

δ = 175.00; 162.20; 149.70; 145.98; 135.41; 102.56; 61.49; 55.39; 50.03; 49.01; 46.28; 28.29

p.f. 280-284°C

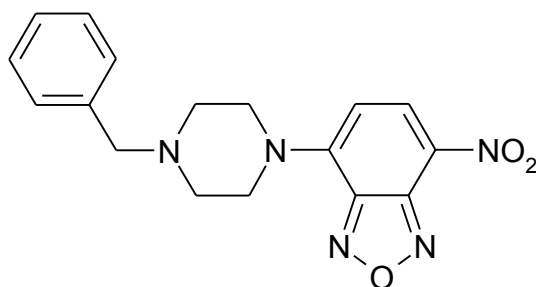
MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	55.75	55.48	+ 0.27
% N	24.17	24.26	- 0.09
% H	6.22	6.40	- 0.18

Formula: C₁₆H₂₂N₆O₃ (PM = 346.39)

4-(4-BENZILPIPERAZIN-1-IL)-7-NITRO-2,1,3- BENZOSSADIAZOLO

MRMA12



[35]

Una soluzione di 4-cloro-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[1]** (0.4132 g, 2.071 mmol) in THF anidro (100 ml) viene lentamente aggiunta ad una soluzione tetraidrofuranica di 1-benzilpiperazina (0.3042 g, 1.726 mmol) a 0° C. Il colore della soluzione cambia istantaneamente dall'arancio al rosso.

Viene distillato il THF e il grezzo viene ripreso con cloroformio, lavato con acqua, la fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro e purificata tramite flash cromatografia su colonna usando come eluente cloroformio. Si ottengono 430 mg di un precipitato rosso con una resa del 73%.

¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.41 (d, 1H, J=8.8 Hz); 7.36-7.23 (m, 5H); 6.28 (d, 1H, J=9.2 Hz); 4.12 (t, 4H, J=5.0 Hz); 3.61 (s, 2H); 2.71 (t, 4H, J=5.0 Hz)

¹³C NMR (CDCl₃)

δ = 145.00; 144.12; 137.15; 129.20; 128.10; 126.90; 125.69; 125.57; 120.08; 102.08; 62.70; 59.20; 46.69

p.f. 176-180°C

MICROANALISI

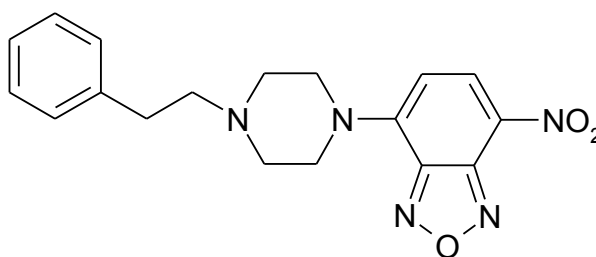
	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	59.84	60.17	- 0.33

% N	20.93	20.64	+ 0.29
% H	5.00	5.05	+ 0.05

Formula: C₁₇H₁₇N₅O₃ (PM = 339.36)

4-NITRO-7-[4-(2-FENILETIL)PIPERAZIN-1-IL]-2,1,3-BENZOSSADIAZOLO

MRMA13



[35]

Una soluzione di 4-cloro-7-nitro-[2,1,3]-benzossadiazolo **[1]** (0.3741 g, 1.875 mmol) in THF anidro (100 ml) viene lentamente aggiunta ad una soluzione di 1-fenetilpiperazina (0.2973 g, 1.562 mmol) disciolta nella minima quantità di THF e a 0° C. Il colore della soluzione cambia istantaneamente dall'arancio al rosso. Viene distillato il THF e il grezzo viene ripreso con cloroformio, lavato con acqua, la fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro e purificata tramite flash cromatografia su colonna usando come eluente cloroformio. Si ottengono 395 mg di un precipitato rosso con una resa del 71%.

¹H NMR (CDCl₃)

δ = 8.42 (d, 1H, J=9.0 Hz); 7.35-7.22 (m, 5H); 6.31 (d, 1H, J=9.0 Hz); 4.15 (t, 4H, J=5.0 Hz); 2.91-2.68 (m, 8H)

¹³C NMR (CDCl₃)

δ = 145.22; 144.01; 136.80; 129.07; 128.63; 126.05; 125.69; 125.57;
120.08; 102.08; 59.05; 58.20; 45.69; 34.16

p.f. 193-197°C

MICROANALISI

	TROVATO	CALCOLATO	DIFFERENZA
% C	61.63	61.18	+ 0.45
% N	19.70	19.82	- 0.12
% H	5.32	5.42	- 0.10

Formula: C₁₈H₁₉N₅O₃ (PM = 353.38)

Capitolo 5

Parte sperimentale biologica

5.1. Materiali e metodi

Per i saggi di binding sono stati utilizzati i radioligandi [3H]DTG (30 Ci/mmol) e (+)-[3H]pentazocina (34 Ci/mmol) acquistati dalla Perkin-Elmer Life Sciences (Zaventem, Belgium). ((±)-[3H]Emopamil (83 Ci/ mmol) è stato acquistato da American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO). La (+)-pentazocina è stata acquistata dalla Sigma- Aldrich-RBI s.r.l. (Milano, Italia). DTG e ((±)-ifenprodil sono stati acquistati dalla Tocris Cookson Ltd., UK. I maschi di guinea pig e i ratti Wistar Hannover (250-300 g) provengono dalla Harlan, Italia.

Il terreno di cultura utilizzato per le cellule Caco-2(carcinoma del colon umano) è stato preparato con DMEM addizionato con il 10% di siero bovino fetale, 50.000 UL⁻¹di penicillina e streptomina 80 µM. Le culture sono state riposte in un incubatore a 37°C in atmosfera contenente 5% di CO₂ . le cellule sono state trattate una volta a settimana con tripsina /EDTA (0.25%/ 0.04%) e il terreno è stato cambiato due volte a settimana.

5.2. Saggio di binding con radioligandi

Di tutti i composti sintetizzati è stata valutata l'affinità in vitro nei confronti dei recettori σ_1 e σ_2 utilizzando saggi di binding con radiotraccianti. Per il recettore σ_1 lo specifico radioligando utilizzato è stato la (+)-[3H]pentazocina((+)-[2S-(2R,6R,11R)]-1,2,3,4,5,6-esaidro-6,11-dimetil-3-(3-metil-2-butenil)-2,6-metano-

3-benzazocin-8-olo) e il tessuto utilizzato è costituito da membrane di cervello di Ginea Pig senza cervelletto; per quanto riguarda il recettore σ_2 , il radiotracciante utilizzato è stato $la[{}^3H]$ -DTG (1,3-di-2-tolilguanidina) in presenza di (+)-pentazocina $1 \mu M$ per mascherare i recettori σ_1 e il tessuto utilizzato è costituito da membrane di fegato di ratto. Le concentrazioni richieste per inibire il 50% del binding specifico del radioligando (IC_{50}) sono state determinate usando da sei a nove differenti concentrazioni del composto da testare in due o più esperimenti con i campioni in duplicato. I valori di K_d , B_{max} e della costante d'inibizione apparente (K_i) sono stati determinati attraverso curve non lineari, usando il programma Prism, versione 3.0 (GraphPad).

5.3. Saggio di permeabilità

Il saggio di permeabilità è stato effettuato su un monostrato di cellule di Caco-2. Le cellule Caco-2 sono state raccolte con tripsina-EDTA e seminate su una piastra a 96 pozzetti (*MultiScreen Caco-2 assay system*) con una densità di 10.000 cellule / pozzetto. Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 48 ore per i primi 6 giorni e successivamente ogni 24 ore. Dopo 21 giorni in cultura, il monostrato di Caco-2 è stato utilizzato per gli esperimenti di permeabilità.

La permeabilità apparente (P_{app}) viene misurata, considerando il flusso dal compartimento apicale a quello basolaterale (AB) e dal compartimento basolaterale a quello apicale (BA) (**Fig.4.1**), a 120 minuti e a varie concentrazioni della molecola (1-100 μM)[137-138].

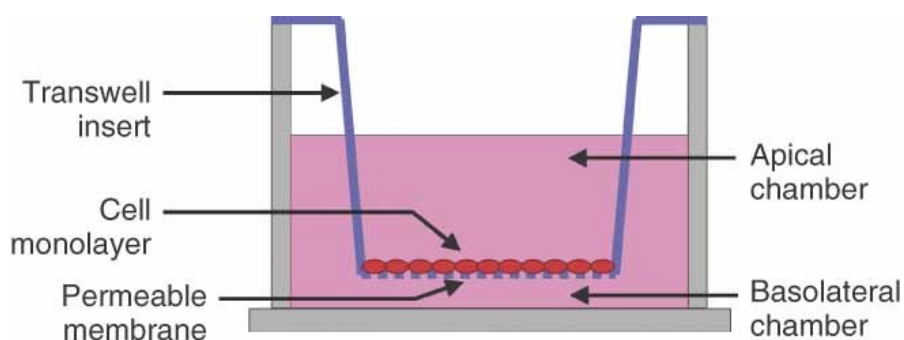


Fig. 5.1 Rappresentazione schematica di un monostrato di cellule Caco-2 in una piastra a doppio pozzetto

I composti sono stati disciolti in una soluzione salina (HBSS, pH 7,4) e quindi filtrati. Dopo 21 giorni di crescita cellulare, il mezzo è stato rimosso dal lato apicale (superiore) e dal lato basolaterale (piastra inferiore). I pozzetti superiori sono stati riempiti con 75 μ l e quelli inferiori con 250 μ l di tampone HBSS. Questa procedura è stata ripetuta due volte, e le piastre sono state incubate a 37 ° C per 30 min.

Dopo il tempo d'incubazione, il buffer HBSS è stato rimosso e nei pozzetti superiori sono stati aggiunti 75 μ l di soluzione con il composto. HBSS senza il composto è stato aggiunto alla piastra sottostante (250 μ l). Le piastre sono state incubate a 37 ° C per 120 min. Dopo il tempo di incubazione, i campioni sono stati rimossi dal compartimento apicale e da quello basolaterale (piastra accettore). La concentrazione dei composti è stata analizzata utilizzando la spettroscopia UV-vis. La permeabilità apparente (P_{app}), in unità di nm / s, è stata calcolata utilizzando la seguente equazione:

$$P_{app} = \left(\frac{V_A}{area \times time} \right) \times \left(\frac{[drug]_{acceptor}}{[drug]_{initial}} \right)$$

□

dove V_A è il volume (in ml) del pozzetto accettore, *area* è la superficie della membrana (0,11 cm² del pozzetto), *time* è il tempo di trasporto totale in secondi (7200 s), $[drug]_{acceptor}$ è la concentrazione del composto misurata mediante spettroscopia UV; $[drug]_{iniziale}$ è la concentrazione iniziale del composto ($1 \cdot 10^{-4}$ M) nei pozzetti apicale o basolaterale [138].

Capitolo 6

Parte sperimentale spettroscopica

6.1. Materiali e metodi

Per l'acquisizione degli spettri di assorbimento è stato utilizzato uno spettrofotometro Beckman DU 650. Gli spettri di fluorescenza sono stati eseguiti utilizzando uno Spex Fluorolog-2 (modello F-111; SLITS 5/5; S/R mode; response time 0,5 s). Per il calcolo della resa quantica è stato utilizzato il solfato di chinino come standard, acquistato dalla Sigma-Aldrich-RBI s.r.l. (Milano, Italia).

6.2. Spettroscopia di fluorescenza

Gli spettri di assorbimento UV-vis dei composti MRMA6, 7, 11, 13 e 14 sono stati registrati in cloroformio, etanolo e PBS ad una concentrazione del composto dell'ordine di 10^{-5} M.

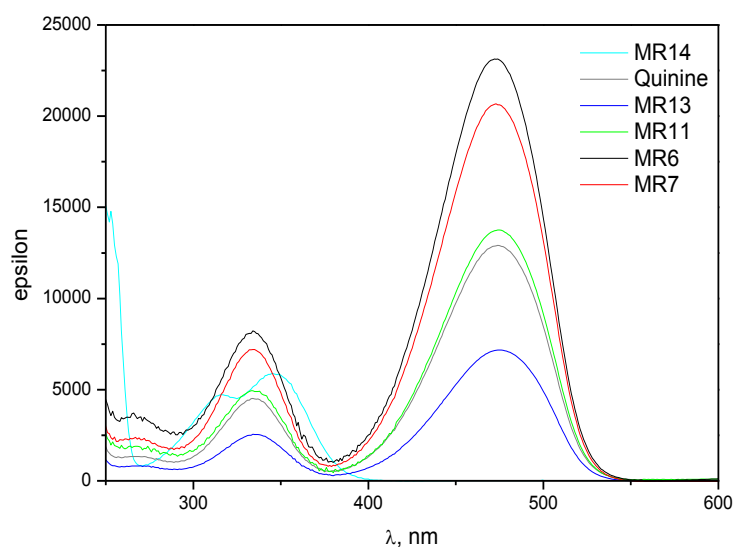


Fig.6.1 Spettri di assorbimento dei composti MRMA 6-7-11-13-14 in etanolo e dello standard solfato di chinino in H_2SO_4 0,5 M con una concentrazione di $1,25 \cdot 10^{-4}$ M.

Sono stati studiati inoltre gli spettri di emissione dei suddetti composti solubilizzati in etanolo e in cloroformio.

La resa quantica di fluorescenza è stata calcolata prendendo come composto di riferimento il solfato di chinino disciolto in H_2SO_4 0,5 M. Sono state preparate varie diluizioni dello standard tali che l'assorbanza, nella lunghezza d'onda di eccitazione, corrispondesse a quella dei composti da testare. Avendo confermato che l'efficienza di emissione dello standard aveva un andamento lineare in tutto il range testato (da $A= 0,03$ a $A= 0,15$) (**Fig. 4.3**) si è potuto procedere al calcolo della resa quantica.

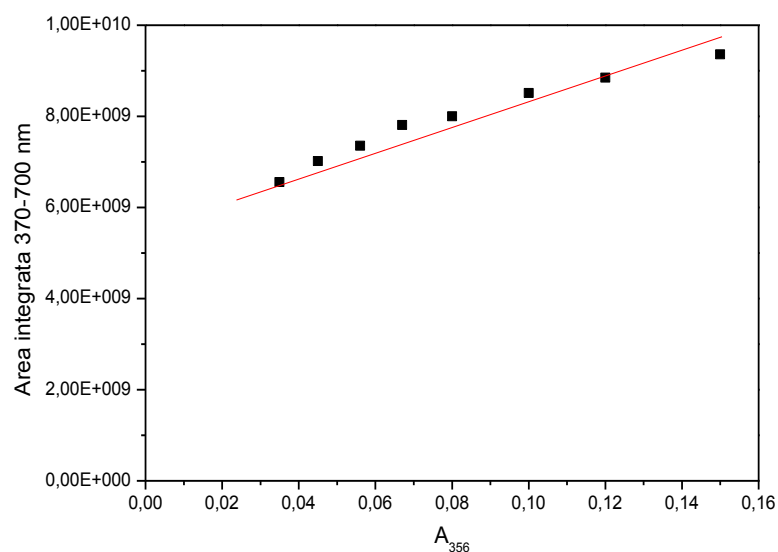


Fig.6.2 Curva di taratura.

E' stato inoltre tenuto conto degli indici di rifrazione (η) dei solventi utilizzati sia per lo standard che per i composti. Gli indici sono rispettivamente 1,34, 1,36 e 1,44 in H₂SO₄ 0,5 M, EtOH e CHCl₃.

La resa quantica è stata calcolata effettuando un confronto diretto tra l'area integrata di emissione dello standard da 370 a 700 nm, e l'area integrata di emissione di ogni singolo composto, sempre da 370 a 700 nm tramite la seguente equazione:

$$\Phi_{\text{camp}} / \Phi_{\text{stand}} = (\bar{A}_{\text{camp}} / \bar{A}_{\text{stand}}) (\eta_{\text{camp}} / \eta_{\text{stand}})$$

Dove Φ_{camp} e Φ_{stand} sono le rese quantiche rispettivamente del campione e dello standard, \bar{A}_{camp} e \bar{A}_{stand} sono le aree integrate e η_{camp} e η_{stand} sono gli indici di rifrazione.

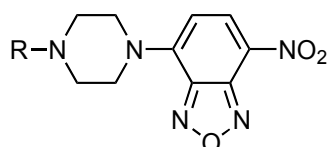
Capitolo 7

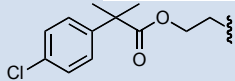
Risultati e discussione

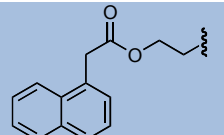
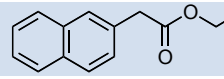
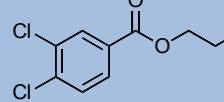
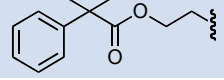
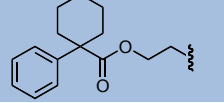
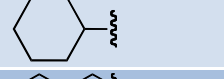
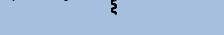
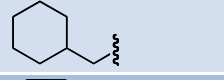
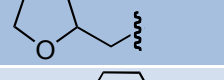
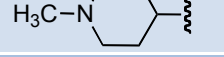
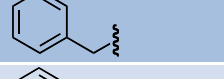
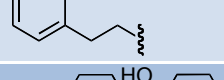
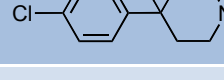
7.1. Affinità di binding

I risultati farmacologici dei saggi di binding per i recettori σ sono stati espressi in termini di K_i e sono riportati in tabella (**Tab. 7.1**). Come si può evincere da questi dati, i derivati a struttura esterea (MRMA1-6), strutturalmente correlati ai ligandi σ_1 seletivi PRE-084 e AC-915, presentano una bassa o trascurabile affinità verso entrambi i sottotipi recettoriali ad eccezione del composto MRMA6

che presenta una discreta selettività verso i recettori σ_2 ed una affinità simile a quella del DTG. Inoltre, per quanto riguarda i derivati piperazinic MRMA7-14, risultano possedere una maggiore affinità per i sottotipi σ_1 . Fra questi, la maggiore affinità σ_1 è posseduta dal ligando con un sostituito fenilico all'azoto basico (MRMA13, $K_i = 31.6$ nM), simile a quella del PRE-084. Tuttavia, la semplice modifica con un sostituito benzilico riduce di circa 16 volte l'affinità verso i recettori σ_1 . Contrariamente a ciò, nel derivato con un sostituito cicloesilico (MRMA7, $K_i = 48.5$ nM) l'allungamento della catena comporta una riduzione dell'affinità σ_1 (MRMA9, $K_i = 127$ nM). Anche i derivati a struttura 4-fenilpiperidinica (MRMA14, $K_i = 41$ nM) ed N-metilpiperidinica (MRMA11, $K_i = 32.3$ nM), con un ulteriore centro basico, presentano una buona affinità verso i recettori σ_1 . Tuttavia, fra questi derivati, solo il composto MRMA11 presenta un'interessante selettività per i recettori σ_1 .



Composto	R	Binding (K_i , nM)	
		σ_1	σ_2
MRMA1		355	278

MRMA2		>5000 (24%)	>10000 (39%)
MRMA3		>5000 (13%)	>10000 (28%)
MRMA4		>5000 (23%)	393
MRMA5		2172	>10000 (36%)
MRMA6		>5000 (42%)	56.8
MRMA7		48.5	313
MRMA8		264	358
MRMA9		127	381
MRMA10		944	>10000 (44%)
MRMA11		32.3	577
MRMA12		526	4690
MRMA13		31.6	225
MRMA14		41.0	211
PRE-084		33.5	>10000 (29%)
DTG		61	42

Tab. 7.1 Valori delle K_i (costante di inibizione) dei composti MRMA1-14

7.2 Permeabilità cellulare

Per i composti MRMA6, 7, 11, 13 e 14, che hanno evidenziato una maggiore affinità per i recettori σ , è stata studiata la permeabilità cellulare attraverso un monostrato di cellule Caco-2. La permeabilità apparente (P_{app}) è stata determinata considerando il flusso sia dal compartimento apicale a quello basolaterale (AB), sia dal compartimento basolaterale a quello apicale (BA).

I composti che presentano un rapporto BA/AB ≤ 2 sono considerati composti non-trasportati dalla glicoproteina P (P-gp). Al contrario, i derivati con un rapporto BA/AB > 2 sono considerati substrati della P-gp [137-138].

I cinque composti sottoposti ad analisi hanno mostrato un rapporto BA/AB > 2 (**Tab. 7.2**) cosicché essi possono essere definiti substrati trasportati dalla P-gp. In accordo con la letteratura, il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica è prevenuto per i substrati della P-gp. Tali composti attraverserebbero quindi la membrana ematoencefalica quando tutti i siti della P-gp verrebbero saturati. Quindi tali composti potrebbero essere utilizzati come *tools* diagnostici nella rilevazione di tumori in organi periferici che presentano un'elevata concentrazione di recettori σ .

	PappAB(nm/sec)	PappBA(nm/sec)	BA/AB	ϵ	λ (nm)
MRMA6	575	2059	3.6	26220	230
MRMA7	363	1581	4.4	15170	484
MRMA11	356	2083	5.8	26110	496
MRMA13	558	2028	3.6	25030	230
MRMA14	280	2182	7.8	28290	498

Tab. 7.2 Rapporto BA/AB di MRMA 6-7-11-13-14

7.3. Proprietà spettroscopiche

Gli spettri di assorbimento dei composti MRMA 6-7-11-13-14 sono stati eseguiti sia in solventi organici (EtOH e CHCl₃) che in soluzione acquosa (tampone PBS). Come esempio generale sono stati riportati gli spettri in EtOH (**Fig.6.1**). I composti presentano due picchi di assorbimento a due diverse lunghezze d'onda in corrispondenza delle quali sono stati calcolati i coefficienti di estinzione molare (ϵ) (**Tab. 7.3**). Eccitando tutti i composti a 356 nm (**Fig. 7.1**) sono stati ottenuti gli spettri di fluorescenza (**Fig. 7.2**) dei composti in EtOH e CHCl₃.

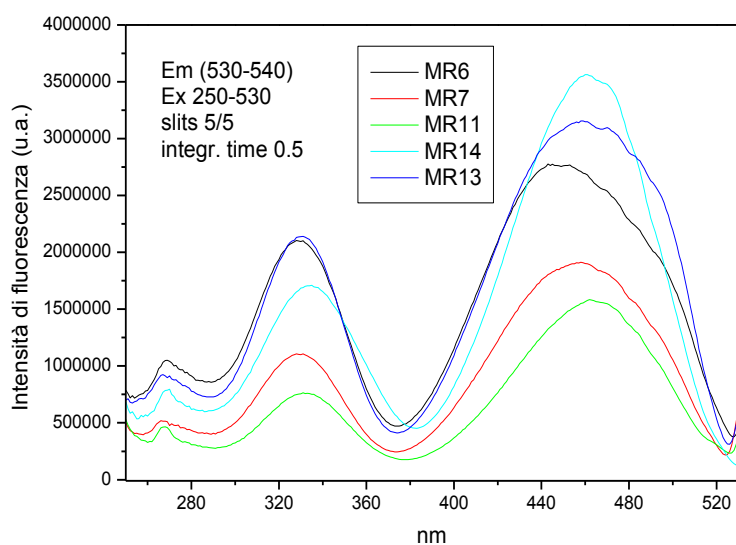


Fig.7.1 Spettri di eccitazione dei composti MRMA 6-7-11-13-14 in EtOH.

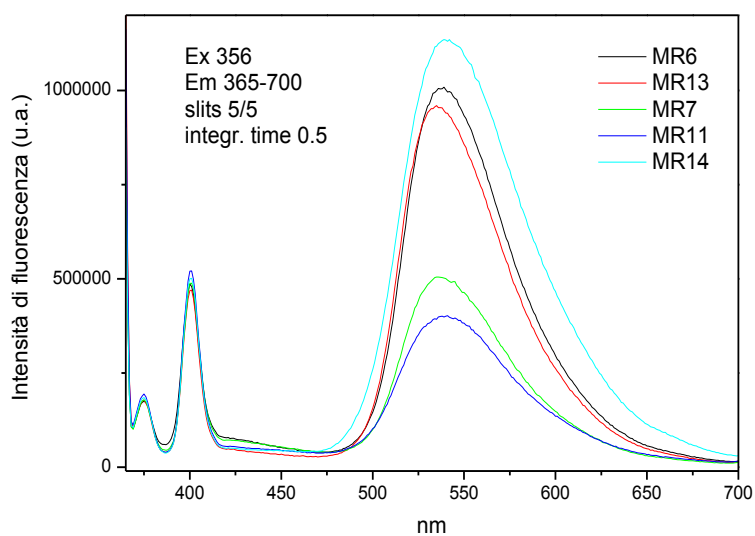


Fig.7.2 Spettri di emissione dei composti MRMA 6-7-11-13-14 in EtOH.

Sono state inoltre calcolate le rese quantiche (Φ) dei composti in EtOH e CHCl_3 (Tab. 7.3).

COMPOSTO	SOLVENTE	$\lambda_{\text{max}1}(\text{nm})$	ϵ_1	$\lambda_{\text{max}2}(\text{nm})$	ϵ_2	$\lambda_{\text{em,max}1}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{em,max}2}(\text{nm})$	$\Phi \times 10^3$
MRMA-6	EtOH	332	4500	471	12800	400	537	5,12

	CHCl ₃	322	4300	451	13400	-	516	142
	PBS	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
MRMA-7	EtOH	328	2400	463	7260	400	537	3,13
	CHCl ₃	318	4350	448	14700	-	517	429
	PBS	347	1900	487	5300	n.v.	n.v.	n.v.
MRMA-11	EtOH	333	5580	471	13700	400	541	3,35
	CHCl ₃	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	PBS	352	6800	497	29000	n.v.	n.v.	n.v.
MRMA-13	EtOH	335	7400	473	20666	400	534	5,01
	CHCl ₃	335	5300	472	20000	-	520	100
	PBS	337	700	492	1000	n.v.	n.v.	n.v.
MRMA-14	EtOH	334	7900	472	23200	401	534	7,31
	CHCl ₃	335	6250	470	24000	-	531	7.46
	PBS	350	3300	485	21000	n.v.	n.v.	n.v.

Tab. 7.3 Proprietà spettroscopiche dei composto MRMA 6-7-11-13-14; n.s.: non solubile; per i composti solubilizzati in cloroformio è stato ottenuto soltanto un picco di emissione; i dati in PBS non sono stati ancora valutati.

Come si evince dai dati riportati in **Tab. 7.3** la resa quantica dei composti solubilizzati in etanolo risulta evidentemente più bassa rispetto alla resa quantica dei composti solubilizzati in cloroformio. La polarità del solvente è, quindi, un fattore determinante per poter valutare la resa quantica di fluorescenza e quindi l'utilità dei composti.

Capitolo 8

Conclusioni

In questo studio sono stati progettati e sintetizzati una nuova serie di derivati a nucleo 4-nitro-2,1,3-benzossadiazolico (NBD) come potenziali tools farmacologici capaci di interagire con i recettori σ . I dati di binding hanno

evidenziato che solo i composti MRMA6, 7, 11, 13 e 14 presentano una buona affinità verso i recettori σ . Fra questi, risultano particolarmente interessanti per la loro affinità e per un differente profilo di selettività i derivati MRMA6 e MRMA11.

Inoltre, dei cinque composti con migliore profilo farmacologico, sono state studiate la permeabilità apparente attraverso un monostrato di cellule Caco-2 e le proprietà spettroscopiche.

Dai saggi di permeabilità è emerso che i composti testati possono essere classificati come substrati delle P-gp.

Come riportato in letteratura [138], il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica è prevenuto per i substrati della P-gp. Tali composti attraverserebbero quindi la membrana ematoencefalica soltanto quando tutti i siti della P-gp verrebbero saturati. Ciò ci permette di avere informazioni sulla dose da utilizzare affinché essi possano agire a livello centrale. Quindi tali composti potrebbero essere utilizzati nella diagnosi di tumori in organi periferici che presentano un'elevata concentrazione di recettori σ .

Considerando, inoltre, le proprietà fluorescenti del nucleo 4-nitro-2,1,3-benzossadiazolico (NBD), il quale presenta una bassa resa quantica in soluzione acquosa ma diventa altamente fluorescente in solventi non polari, è possibile sostenere la corrispondenza dei dati riportati per i composti testati.

Sulla base dei risultati ottenuti attraverso i saggi di fluorescenza, si può affermare che la resa quantica di fluorescenza dei composti varia in funzione della polarità del solvente. In particolare si può notare che la resa quantica dei composti solubilizzati in cloroformio aumenta altamente rispetto a quella calcolata in etanolo.

Ciò rappresenta una premessa incoraggiante per correlare i dati spettroscopici di fluorescenza con le proprietà farmacologiche. Infatti i composti che presentano una maggiore affinità di binding nei confronti del recettore σ mostrerebbero una fluorescenza elevata in ambiente lipofilo quale potrebbe essere quello di una membrana cellulare o di una tasca idrofobica della proteina.

Questi dati possono rappresentare il punto di partenza per la progettazione di studi di internalizzazione cellulare attraverso microscopia confocale in fluorescenza.

Bibliografia

[1] Fabry M, Cabrele C, Höcker H, Beck-Sickinger AG. Differently labeled peptide ligands for rapid investigation of receptor expression on a new human glioblastoma cell line. *Peptides*. **2000**, 21(12),1885-93.

- [2] Janssen MJ, Ensing K, de Zeeuw RA. A fluorescent receptor assay for benzodiazepines using coumarin-labeled desethylflumazenil as ligand. *Anal. Chem.* **2001**, 73(13), 3168-73.
- [3] Tairi AP, Hovius R, Pick H, Blasey H, Bernard A, Surprenant A, Lundström K, Vogel H. Ligand binding to the serotonin 5HT₃ receptor studied with a novel fluorescent ligand. *Biochemistry.* **1998**, 37(45), 15850-64.
- [4] Chen H, Chung NN, Lemieux C, Zelent B, Vanderkooi JM, Gryczynski, Wilkes BC, Schiller PV. [Aladan³]TIPP: a fluorescent delta-opioid antagonist with high delta-receptor binding affinity and delta selectivity. *Biopolymers.* **2005**, 80(2-3), 325-31.
- [5] Vázquez ME, Blanco JB, Salvadori S, Trapella C, Argazzi R, Bryant SD, Jinsmaa Y, Lazarus LH, Negri L, Giannini E, Lattanzi R, Colucci M, Balboni G. 6-N,N-dimethylamino-2,3-naphthalimide: a new environment-sensitive fluorescent probe in delta- and mu-selective opioid peptides. *J. Med. Chem.* **2006**, 49(12), 3653-8.
- [6] Daly CJ, Milligan CM, Milligan G, Mackenzie JF, Mcgrath JC. Cellular localization and pharmacological characterization of functioning alpha-1 adrenoceptors by fluorescent ligand binding and image analysis reveals identical binding properties of clustered and diffuse populations of receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1998**, 286(2), 984-90.
- [7] Cha JH, Zou MF, Adkins EM, Rasmussen SG, Loland CJ, Schoenenberger B, Gether U, Newman AH. Rhodamine-labeled 2beta-carbomethoxy-3beta-(3,4-dichlorophenyl)tropane analogues as high-affinity fluorescent probes for the dopamine transporter. *J. Med. Chem.* **2005**, 48(24), 7513-6.
- [8] Middleton RJ, Briddon SJ, Cordeaux Y, Yates AS, Dale CL, George MW, Baker JG, Hill SJ, Kellam B. New fluorescent adenosine A₁-receptor agonists that allow quantification of ligand-receptor interactions in microdomains of single living cells. *J. Med. Chem.* **2007**, 50(4), 782-93.
- [9] Taliani S, Simorini F, Sergianni V, La Motta C, Da Settimo F, Cosimelli B,

Abignente E, Greco G, Novellino E, Rossi L, Gremigni V, Spinetti F, Chelli B, Martini C. New fluorescent 2-phenylindolglyoxylamide derivatives as probes targeting the peripheral-type benzodiazepine receptor: design, synthesis, and biological evaluation. *J. Med. Chem.* **2007**, 50(2), 404-7.

[10] Pick H, Preuss AK, Mayer M, Wohland T, Hovius R, Vogel H. Monitoring expression and clustering of the ionotropic 5HT₃ receptor in plasma membranes of live biological cells. *Biochemistry.* **2003**, 42(4), 877-84.

[11] Arttamangkul S, Alvarez-Maubecin V, Thomas G, Williams JT, Grandy DK. Binding and internalization of fluorescent opioid peptide conjugates in living cells. *Mol. Pharmacol.* **2000**, 58(6), 1570-80.

[12] Patel RC, Kumar U, Lamb DC, Eid JS, Rocheville M, Grant M, Rani A, Hazlett T, Patel SC, Gratton E, Patel YC. Ligand binding to somatostatin receptors induces receptor-specific oligomer formation in live cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99(5), 3294-9.

[13] Vangveravong S, Xu J, Zeng C, Mach RH. Synthesis of N-substituted 9-azabicyclo[3.3.1]nonan-3 α -yl carbamate analogs as σ_2 receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14(20), 6988-97.

[14] Zeng C, Vangveravong S, Xu J, Chang KC, Hotchkiss RS, Wheeler KT, Shen D, Zhuang ZP, Kung HF, Mach RH. Subcellular localization of sigma-2 receptors in breast cancer cells using two-photon and confocal microscopy. *Cancer Res.* **2007**, 67(14), 6708-16.

[15] Ferorelli S, Abate C, Colabufo NA, Niso M, Inglese C, Berardi F, Perrone R. Design and Evaluation of Naphthol- and Carbazole-Containing Fluorescent σ Ligands as Potential Probes for Receptor Binding Studies. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4648-4655.

[16] Haertzen CA. Subjective effects of narcotic antagonists cyclazocine and nalorphine on the Addiction Research Center Inventory (ARCI). *Psychopharmacologia.* **1970**, 18, 366-377.

- [17] Martin WR, Eades CE, Thompson JA, Huppler RE. The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1976**, 197, 517-532.
- [18] Su TP. Evidence for sigma-opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1982**, 223, 284-290.
- [19] Vaupel DB. Naltrexone fails to antagonize the sigma effects of PCP and SKF-10,047 in the dog. *Eur.J. Pharmacol.* **1983**, 92, 269-274.
- [20] Young GA, Khazan N. Differential neuropharmacological effects of mu, kappa and sigma opioid agonists on cortical EEG power spectra in the rat. Stereospecificity and naloxone antagonism. *Neuropharmacology*. **1984**, 23, 1161-1165.
- [21] Berzetei-Gurske IP, Toll L. The mu-opioid activity of kappa-opioid receptor agonist compounds in the guinea pig ileum. *Eur.J. Pharmacol.* **1992**, 212, 283-286.
- [22] Mendelsohn LG, Kalra V, Johnson BG, Kerchner GA. Sigma opioid receptor: characterization and co-identity with the phencyclidine receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, 233, 597-602.
- [23] Zukin SR, Brady KT, Slifer BL, Balster RL. Behavioral and biochemical stereoselectivity of sigma opiate/PGP receptors. *Brain Res.* **1984**, 174-177.
- [24] Quirion R, Hammer P Jr, Herkenham M, Pert CB. The phencyclidine (angel dust)/sigma 'opiate' receptor: Its visualization by tritium-sensitive film. *Proc. Natl.Acad. Sci.* **1981**, 78, 5881-5885.
- [25] Gundlach AI, Largent BI, Snyder SH. Autoradiographic localization of sigma receptor binding sites in guinea pig and rat central nervous system with (+)3H-3-(3-hydroxyphenyl)-N-(1-propyl)piperidine. *J. Neurosci.* **1986**, 6(6),1757-70.
- [26] Largent BI, Gundlach AI, Snyder SH. Pharmacological and

autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl)piperidine and [3H]-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperazine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, 238(2), 739-48.

[27] Largent BI, Gundlach AI, Snyder SH. Psychotomimetic opiate receptors labeled and visualized with(+)-[3h]3-(3-hydroxyphenyl)-n-(1-propyl)piperidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1984**, 81, 4983-4987.

[28] Itzhak Y, Stein I, Zhang SH, Kassim CO, Cristante D. Binding of sigma-ligands to C57BL/6 mouse brain membranes: effects of monoamine oxidase inhibitors and subcellular distribution studies suggest the existence of sigma-receptor subtypes.*J. Pharmacol. Exp. Ther.***1991**, 257(1), 141-8.

[29] Itzhak Y, Stein I. Sigma binding states in the brain; An emerging concept for multiple sites and their relevance for psychiatric disorders. *Life Sciences.***1990**, 47, 13, 1073-1081.

[30] Hellewell SB, Bowen WD. A sigma-like binding site in rat pheochromocytoma (PC12) cells: decreased affinity for (+)- benzomorphan and lower molecular weight suggest a different sigma receptor form from that of guinea pig brain. *Brain Res.* **1990**, 527(2), 244-53.

[31] Quirion R, Bowen WD, Itzhak Y, Junien JL, Musacchio JM, Rothman RB, Su TP, Tam SW, Taylor DP. A proposal for the classification of sigma binding sites. *Trends Pharmacol. Sci.* **1992**, 13(3), 85-6.

[32] Tam SW.(+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]ethylketocyclazocine, mu, kappa, delta and phencyclidine binding sites in guinea pig brain membranes. *Eur.J. Pharmacol.***1985**,109(1), 33-41.

[33] Largent BL, Gundlach AL, Snyder SH.Sigma receptors on NCB-20 hybrid neurotumor cells labeled with (+)[3H]SKF 10,047 and (+)[3H]3-PPP. *Eur.J. Pharmacol.***1986**, 124(1-2), 183-7.

[34] Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor ligands: potential in the treatment of

neuropsychiatric disorders. *CNS Drugs*. **2004**, 18(5), 269-84.

[35] Hanner M, Moebius FF, Flandorfer A, Knaus HG, Striessnig J, Kempner E, Glossmann H. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian sigma1-binding site. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **1996**, 93, 8072-8077.

[36] Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional expression of the human type 1 sigma receptor (hSigmaR1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, 229, 553-558.

[37] Seth P, Fei YJ, Huang W, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain. *J. Neurochem.* **1998**, 70, 922-931.

[38] Seth P, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and structural analysis of the cDNA and the gene encoding the murine type 1 sigma receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 241, 535-540.

[39] Mei J, Pasternak GW. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma1 receptor. *Biochem. Pharmacol.* **2001**, 62, 349-355.

[40] Aydar E, Palmer CP, Klyachko VA, Jackson MB. The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron*. **2002**, 34, 399-410.

[41] Pal A, Hajipour AR, Fontanilla D, Ramachandran S, Chu UB, Mavlyutov T, Ruoho AE. Identification of regions of the sigma1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe. *Mol. Pharmacol.* **2007**, 72(4), 921-33.

[42] Prasad PD, Li HW, Fei YJ, Ganapathy ME, Fujita T, Plumley LH, Yang-Feng TL, Leibach FH, Ganapathy V. Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene. *J. Neurochem.* **1998**, 70, 443-451.

- [43] Yamamoto H, Miura R, Yamamoto T, Shinohara K, Watanabe M, Okuyama S, Nakazato A, Nukada T. Amino acid residues in the transmembrane domain of the the type 1 sigma receptor critical for ligand binding. *Febs Letters*.**1999**, 445, 19-22.
- [44] Seth P, Ganapathy ME, Conway SJ, Bridges CD, Smith SB, Casellas P, Ganapathy V. Expression pattern of the type 1 sigma receptor in the brain and identity of critical anionic amino acid residues in the ligand binding domain of the receptor. *Biochim. Biophys. Acta*. **2001**, 1540, 59-67.
- [45] Stone JM, Arstad E, Erlandsson K, Waterhouse RN, Ell PJ, Pilowsky LS. [123I]TPCNE--a novel SPET tracer for the sigma-1 receptor: first human studies and in vivo haloperidol challenge. *Synapse*.**2006**, 60(2), 109-17.
- [46] Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaal M, Maurice T. Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*.**2000**; 97(1), 155-70.
- [47] Cagnotto A, Bastone A, Mennini T. [3H](+)-pentazocine binding to rat brain sigma 1 receptors. *Eur.J. Pharmacol*.**1994**, 266(2), 131-8.
- [48] Cobos EJ, del Pozo E, Baeyens JM. Irreversible blockade of sigma-1 receptors by haloperidol and its metabolites in guinea pig brain and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurochem*.**2007**, 102(3), 812-25.
- [49] DeHaven-Hudkins DL, Lanyon LF, Ford-Rice FY, Ator MA. Sigma recognition sites in brain and peripheral tissues. Characterization and effects of cytochrome P450 inhibitors. *Biochem. Pharmacol*.**1994**, 47(7), 1231-9.
- [50] Palacios G, Muro A, Vela JM, Molina-Holgado E, Guitart X, Ovalle S, Zamanillo D. Immunohistochemical localization of the sigma1-receptor in oligodendrocytes in the rat central nervous system. *Brain Res*. **2003**, 961(1), 92-9.
- [51] Jiang G, Mysona B, Dun Y, Gnana-Prakasam JP, Pabla N, Li W, Dong Z, Ganapathy V, Smith SB. Expression, subcellular localization, and regulation of

sigma receptor in retinal muller cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2006**, 47(12), 5576-82.

[52] Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1998**, 14, 111–36.

[53] Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptors (σ_1 binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 306, 718-25.

[54] Hayashi T, Su TP. The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: implication for drug abuse. *Life Sci.* **2005**, 77(14), 1612-24.

[55] Su TP, London ED, Jaffe JH. Steroid binding at s receptors suggest a link between endocrine, nervous and immune systems. *Science.* **1988**, 240, 219-221.

[56] Corpéchet C, Robel P, Axelson M, Sjoval J, Baulieu EE,. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78, 4704-4707.

[57] Young J, Corpechet C, Perche F, Haug M, Baulieu EE, Robel P. Neurosteroids: pharmacological effects of a 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor. *Endocrine.* **1994**, 2, 505-509.

[58] Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Sci.* **1986**, 232, 1004-1007.

[59] Irwin RP, Maragakis NJ, Rogawski MA, Purdy RH, Farb DH, Paul SM. Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **1992**, 141, 30-34.

- [60] Irwin RP, Lin SZ, Rogawski MA, Purdy RH, Paul SM. Steroid potentiation and inhibition of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated intracellular Ca²⁺ responses: structure-activity studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 271, 677-682.
- [61] Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J.* **1992**, 6, 2311-2322.
- [62] Monnet FP, Mahé V, Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids, via sigma receptors, modulate the [3H]norepinephrine release evoked by N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, 92, 3774-3778.
- [63] Maurice T, Junien JL, Privat A. Dehydroepiandrosterone sulfate attenuates dizocilpine-induced learning impairment in mice via sigma1 receptors. *Behav. Brain Res.* **1997**, 83, 159-164.
- [64] Phan VL, Su TP, Privat A, Maurice T. Modulation of steroidal levels by adrenalectomy/castration and inhibition of neurosteroid synthesis enzymes affect sigma1 receptor-mediated behaviour in mice. *Eur. J. Neuroscience.* **1999**, 11, 2385-2396.
- [65] Wallach JV. Endogenous hallucinogens as ligands of the trace amine receptors: A possible role in sensory perception. *Medical Hypotheses.* **2009**, 72, 91-94.
- [66] Su TP, Hayashi T, Vaupel DB. When the Endogenous Hallucinogenic Trace Amine N,N-Dimethyltryptamine Meets the Sigma-1 Receptor. *Sci. Signal.* **2009**, 2(61), p12.
- [67] Fontanilla D, Johannessen M, Hajipour AR, Cozzi NV, Jackson MB, Ruoho AE. The Hallucinogen N,N-Dimethyltryptamine (DMT) Is an Endogenous Sigma-1 Receptor Regulator. *Science.* **2009**, 323, 934-937.
- [68] Barker SA, Monti JA, Christian ST. N,N-dimethyltryptamine: an endogenous hallucinogen. *Int. Rev. Neurobiol.* **1981**, 22, 83-110.

- [69] Ramachandran S, Chu U, Mavlyutov T, Pal A, Pyne S, Ruoho A. The sigma-1 receptor interacts with N-alkyl amines and endogenous sphingolipids. *European Journal of Pharmacology*. **2009**, 609, 19-26.
- [70] Lupardus PJ, Wilke RA, Aydar E, Palmer CP, Chen Y, Ruoho AE, Jackson MB. Membrane-delimited coupling between sigma receptors and K⁺ channels in rat neurohypophysial terminals requires neither G-protein nor ATP. *J. Physiol*. **2000**, 526, 527-539.
- [71] Mavlyutov TA, Ruoho AE. Ligand-dependent localization and intracellular stability of sigma-1 receptors in CHO-K1 cells. *J. Mol. Signal*. **2007**, 2, 8.
- [72] Soriani O, Foll FL, Roman F, Monnet FP, Vaudry H, Cazin L. A-Current down-modulated by sigma receptor in frog pituitary melanotrope cells through a G protein-dependent pathway. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **1999**, Vol. 289, p. 321-328.
- [73] Soriani O, Le Foll F, Galas L, Roman F, Vaudry H, Cazin L. The sigma-ligand (+)-pentazocine depresses M current and enhances calcium conductances in frog melanotrophs. *Am. J. Physiol.* **1999**, 277, E73-E80.
- [74] Horan B, Gifford AN, Matsuno K, Mita S, Ashby CR Jr. Effect of SA4503 on the electrically evoked release of 3H-acetylcholine from striatal and hippocampal rat brain slice. *Synapse*. **2002**, 46, 1-3.
- [75] Maurice T, Lockhart BP. Neuroprotective and anti-amnesic potentials of sigma receptor ligands. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. **1997**, 21, 69-102.
- [76] Bermack JE, Debonnel G. The role of sigma receptors in depression. *J. Pharmacol. Sci.* **2005**, 97, 317-336.
- [77] Garrone B, Magnani M, Pinza M, Polenzani L. Effects of trazodone on neurotransmitter release from rat mossy fibre cerebellar synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, 400, 35-41.

- [78] Mtchedlishvili Z, Kapur J. A presynaptic action of the neurosteroid pregnenolone sulfate on GABAergic synaptic transmission. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 64, 857-864.
- [79] Campana G, Bucolo C, Murari G, Spampinato S. Ocular hypotensive action of topical flunarizine in the rabbit: role of sigma-1 recognition sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 303, 1086-1094.
- [80] Maurice T, Martin-Fardon R, Romieu P, Matsumoto RR. Sigma-1 receptor antagonists represent a new strategy against cocaine addiction and toxicity. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **2002**, Vol. 26, p. 499-527.
- [81] Monnet FP, Maurice T. The sigma-1 protein as a target for the non-genomic effects of neuro(active)steroids: molecular, physiological, and behavioral aspects. *J. Pharmacol. Sci.* **2006**, 100, 93-118.
- [82] Yagasaki Y, Numakawa T, Kumamaru E, Hayashi T, Su TP, Kunugi H. Chronic antidepressants potentiate via sigma-1 receptors the brain-derived neurotrophic factor-induced signaling for glutamate release. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 12941-12949.
- [83] Guitart X, Codony X, Monroy X. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. *Psychopharmacology (Berl)*. **2004**, 174, 301-319.
- [84] Monnet FP. Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca²⁺: clinical and therapeutic relevance. *Biol. Cell.* **2005**, 97, 873-883.
- [85] Hayashi T, Su TP. Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *PNAS.* **2001**, 98, 491-496.
- [86] Hayashi T, Rizzuto R, Haynoczki G, Su TP. MAM: more than just a Housekeeper. *Cell.* **2009**, 30(10), 1-8
- [87] Su TP, Hayashi T, Maurice T, Buch S, Ruoho AE. The sigma-1-receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends in Pharm. Sc.* **2010**, 31, 557-566.

- [88] Bartus RT. On degenerative diseases models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. *Exp. Neurol.* **2000**, 163, 495-529.
- [89] Maurice T, Urani A, Phan VL, Romieu P. The interaction between neuroactive steroids and the sigma1 receptor function: behavioral consequences and therapeutic opportunities. *Brain Res. Rev.* **2001**, 37, 116-32.
- [90] Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain. Res.* **2003**, 140, 1-47.
- [91] Monnet FP, Debonnel G, Junien JL, DeMontigny C. N-methyl-D-aspartate-induced neuronal activation is selectively modulated by sigma receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, **1990**, 179, 441-5
- [92] Debonnel G, Bergeron R, Monnet FP, De Montigny C. Differential effects of sigma ligands on the N-methyl-D-aspartate response in the CA1 and CA3 regions of the dorsal hippocampus: effect of mossy fiber lesioning. *Neurosci.* **1996**, 71, 977.
- [93] Skuza G, Rogoz Z. Effect of BD 1047, sigma-1 receptor antagonist, in the animal models predictive of antipsychotic activity. *Pharmacol. Rep.* **2006**, 58, 626-635.
- [94] Bermack JE, Debonnel G. Modulation of serotonergic neurotransmission by short and long-term treatments with sigma ligands. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, 134, 691-699.
- [95] Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, Howard EW, Brackett DJ. Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, 469, 1-12.
- [96] Rothman RB, Baumamm MH. Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, 479, 23-40.
- [97] Matsumoto RR, McCracken KA, Pow B, Zhang Y, Bowen WD. Involvement of sigma receptors in the behavioral effects of cocaine: evidence from novel

ligands and antisense oligodeoxynucleotides. *Neuropharmacology*. **2002**, 42, 1043-1055.

[98] Navarro G, Moreno E, Aymerich M, Marcellino D, McCormick PJ, Mallol G, Cortes A, Casado V, Canela EI, Ortiz J, Fuex K, Lluís C, Ferré S. Direct involvement of sigma-1 receptor in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *PNAS*. **2010**, 107, 18676-18681.

[99] Manallack DT, Wong MG, Costa M, Andrews PR, Beart PM. Receptor site topographies for phencyclidine-like and sigma drugs: predictions from quantitative, conformational, electrostatic potential, and radioreceptor analyses. *Mol. Pharmacol.* **1989**, 34, 863-879.

[100] Gund TM, Jung D, Floyd J. A Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) Study Using Semiempirical, Density Functional, Ab Initio Methods and Pharmacophore Derivation Using DISCOtech on Sigma 1 Ligands. *J. Comput. Chem.* **2004**, 25, 1385-1399.

[101] Lloyd E J, Andrews PR. A common structural model for central nervous system drugs and their receptors. *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 453-462.

[102] Jung D, Floyd J, Gund TM. A comparative molecular field analysis (CoMFA) study using semiempirical, density functional, ab initio methods and pharmacophore derivation using DISCOtech on sigma 1 ligands. *Comput. Chem.* **2004**, 25, 1385-1399.

[103] Glennon RA, El-Ashmawy M, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Ismaiel AM. N-Substituted 5-phenyl pentylamines: A new class of σ receptor ligands. *Med. Chem. Res.* **1991**, 1, 207-212.

[104] El-Ashmawy M, Ablordeppey SY, Issa H, Gad L, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Glennon RA. Further investigation of 5-phenylpentylamine derivatives as novel sigma receptor ligands. *Med. Chem. Res.* **1992**, 2, 119-126.

[105] Glennon RA, Yousif MY, Ismaiel AM, El-Ashmawy MB, Herdon JL, Fischer JB, Server AC, Burke-Howie KJ. Novel 1-phenylpiperazine and 4-

phenylpiperidine derivatives as high-affinity sigma ligands. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 3360-3365.

[106] Ablordeppey SY, Issa H, Fischer JB, Burke Howie KJ, Glennon RA. Synthesis and structure-affinity relationship studies of sigma ligands related to haloperidol. *Med. Chem. Res.* **1993**, 3, 131-138.

[107] Ablordeppey SY, Fischer JB, Law H, Glennon RA. Probing the proposed phenyl-A region of the sigma-1 receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 2759-2765.

[108] Hellewell SB, Bruce A, Feinstein G, Orringer J, Williams W, Bowen WD. Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, 268, 9-18.

[109] McCann DJ, Weissman AD, Su TP. Sigma 1 and sigma 2 sites in rat brain: Comparison of regional, ontogenetic, and subcellular patterns. *Synapse.* **1994**, 17, 182-189.

[110] Leitner ML, Hohmann AG, Patrick SL, Walker JM. Regional variation in the ratio of sigma 1 to sigma 2 binding in rat brain. *J. Pharmacol.* **1994**, 259(1), 65-9.

[111] Walker JM, Bowen WD, Patrick SL, Williams WE, Mascarella SW, Bai X, Carroll FI. A comparison of (-)-deoxybenzomorphans devoid of opiate activity with their dextrorotatory phenolic counterparts suggests role of sigma 2 receptors in motor function. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, 231(1), 61-8.

[112] Dumont S, Lemaire M. Interaction of 1,3-di(2-[5-3H]tolyl)guanidine with sigma 2 binding sites in rat heart membrane preparations. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, 209, 245-248.

[113] Vilner BJ, Bowen WD. Modulation of cellular calcium by sigma-2 receptors: release from intracellular stores in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 292, 3, 900-911.

- [114] Cassano G, Gasparre G, Contino M, Niso M, Berardi F, Perrone R, Colabufo NA. The sigma-2 receptor agonist PB28 inhibits calcium release from the endoplasmic reticulum of SK-N-SH neuroblastoma cells. *Cell Calcium*. **2006**, 40, 23.
- [115] Zhang H, Cuevas J. Sigma receptors inhibit high-voltage activated calcium channels in rat sympathetic and parasympathetic neurons. *J. Neurophysiol*. **2002**, 87, 2867-2879.
- [116] Weatherspoo LL, Werling JK. Modulation of AMPH stimulated [3H]DA release from rat PC12 cells by sigma-type 2 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 289, 278-284.
- [117] Vilner BJ, Bowen WD. Sigma receptor-active neuroleptics are cytotoxic to C6 glioma cells in culture. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, 244, 199-201.
- [118] Ostenfeld MS, Fehrenbacher N, Høyer-Hansen M, Thomsen C, Farkas T, Jäättelä M. Effective Tumor Cell Death by S-2 Receptor Ligand Siramesine Involves Lysosomal Leakage and Oxidative Stress. *Stress Cancer Res.* **2005**, 65, 19, 8975-8983.
- [119] Crawford D, Keith W, Bowen W. Sigma 2 receptor Agonists Activate a Novel Apoptotic Pathway and Potentiate Antineoplastic Drugs in Breast Tumor Cell Lines1. *Cancer Research*. **2002**, 62, 313–322.
- [120] Zeng C, Vangveravong S, Xu J, Chang KC, Hotchkiss, R.S., Wheeler KT. Subcellular localization of sigma 2 receptor in breast cancer cells using two-photon and confocal microscopy. *Cancer Res.* **2007**, 67, 6708-6716.
- [121] Mach RH, Smith CR. Sigma 2 receptors as potential biomarkers of proliferation in breast cancer. *Cancer Res.* **1992**, 57, 156-161.
- [122] Kashiwagi H, McDunn JE, Simon PO Jr, Goedegebuure PS, Xu J, Jones L, Chang K, Johnston F, Trinkaus K, Hotchkiss RS, Mach RH, Hawkins WG. Selective sigma-2 ligands preferentially bind to pancreatic adenocarcinomas: applications in diagnostic imaging and therapy. *Mol.*

Cancer. **2007**, 6, 48.

[123] Maurice T, Phan VL, Noda Y, Yamada K, Privat A, Nabeshima T. The attenuation of learning impairments induced after exposure to CO or trimethyltin in mice by sigma (σ) receptor ligands involves both σ_1 and σ_2 sites. *British Journal of Pharmacology*. **1999**, 127, 335-342.

[124] Jung D. Pharmacophore derivation using discotech and comparison of semiempirical, ab initio and density functional comfa study for sigma 1 and ab initio and density functional comfa study for sigma 1 and sigma 2 receptor-ligands. A Dissertation Submitted to a Faculty of New Jersey Institute of Technology in Partial Fulfillment of the Degree of Doctor of Philosophy in Chemistry. Department of Chemistry and Environmental Science. **2003**.

[125] Pastor M, Cruciani G, McLay I, Pickett S, Clementi S. GRIND-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3233-3243.

[126] Cratteri P, Romanelli MN, Cruciani G, Bonaccini C, Melani F. GRIND-derived pharmacophore model for a series of α -tropanyl derivative ligands of the sigma-2 receptor. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **2004**, 18, 361-374.

[127] Hovius R, Vallotton P, Wohland T, Vogel H. Fluorescence techniques: shedding light on ligand-receptor interactions. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, 21(7), 266-73.

[128] Mondovì B., *Biochimica Applicata*, UTET.

[129] Sportsman J. R., *Fluorescence Anisotropy in Pharmacologic Screening*

[130] Cheng Y, Prusoff W H, Relationship between the inhibition constant (K_1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, 22, 3099-3108.

[131] Wohland T, Friedrich K, Hovius R, Vogel H. Study of ligand-receptor interactions by fluorescence correlation spectroscopy with different

fluorophores: evidence that the homopentameric 5-hydroxytryptamine type 3As receptor binds only one ligand. *Biochemistry*. **1999**, 38(27):8671-81.

[132] Mach RH, Wheeler KT. Development of Molecular Probes for Imaging Sigma-2 Receptors In Vitro and In Vivo. *Cent Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* **2009**, 9(3), 230–245.

[133] Abate C, Hornick JR, Spitzer D, Hawkins WG, Niso M, Perrone R, Berardi F. Fluorescent Derivatives of σ Receptor Ligand 1-Cyclohexyl-4-[3-(5-methoxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-yl)propyl]piperazine (PB28) as a Tool for Uptake and Cellular Localization Studies in Pancreatic Tumor Cells. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5858–5867.

[134] Nudelman R, Ardon O, Hadar Y, Chen Y, Libman J, Shanzer A, Modular fluorescent-labeled siderophore analogues. *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1671-1678.

[135] Nate H, Matsuki K, Tsunashima A, Ohtsuka H, Hino Y, Nagao T. Synthesis of 2-phenylthiazolidine derivatives as cardiogenic agents. II. 2-(Phenylpiperazinoalkoxyphenyl)thiazolidine-3-thiocarboxamides and the corresponding carboxamides. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 3 (6), 2394-2411.

[136] Wolinski J, Plachta D, Simple method of esterification. *Acta. Pol. Pharm.* **1975**, 32(3):303-6.

[137] Azzariti A, Porcelli L, Simone GM, Quatrone AE, Colabufo NA, Berardi F, Perrone R, Zucchetti M, D'Incalci M, Xu JM, Paradiso A. Tyrosine kinase inhibitors and multidrug resistance proteins: interactions and biological consequences. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, 65,335–346.

[138] Colabufo NA, Berardi F, Cantore M, Perrone MG, Contino M, Inglese C, Niso M, Perrone R, Azzariti A, Simone GM, Paradiso A. 4-Biphenyl and 2-naphthyl substituted 6,7-dimethoxytetrahydroisoquinoline derivatives as potent P-gp modulators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, 16, 3732–3743