



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

DOTTORATO INTERNAZIONALE IN

SCIENZE FARMACEUTICHE

XVI CICLO

TESI DI DOTTORATO

Dr.ssa Palma Blanco

TITOLO

Progettazione e sintesi di ligandi sigma selettivi

RELATORE

Chiar.mo Prof. Giuseppe Ronsisvalle

COORDINATORE

Chiar.mo Prof. Agostino Marrazzo

Anno accademico 2012-2013

INDICE

Cap 1: Introduzione

- 1.1 Recettori σ
- 1.2 Sottotipi recettoriali σ e loro localizzazione
- 1.3 Ruolo e funzioni fisiologiche del recettore σ
- 1.4 Recettori σ_1 e dolore
- 1.5 Ligandi σ_1
- 1.6 Recettori σ_2
- 1.7 Ligandi σ_2

Cap 2 : Razionale: ligandi selettivi σ_2

Cap 3 : Discussione chimica: ligandi selettivi σ_2

Cap 4 : Sperimentale: ligandi selettivi σ_2

Cap 5 : Conclusioni: ligandi selettivi σ_2

Cap 6 : Razionale: ligandi selettivi σ_1

Cap 7 : Discussione chimica: ligandi selettivi σ_1

Cap 8 : Sperimentale: ligandi selettivi σ_1

Cap 9 : Conclusioni: ligandi selettivi σ_1

Cap 10 : Materiali e metodi

Bibliografia

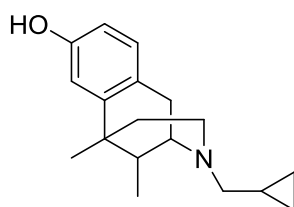
1. INTRODUZIONE

Più di 30 anni dopo l'identificazione dei recettori σ come sito di legame unico nel cervello e negli organi periferici, molte domande riguardanti questo recettore sono ancora senza risposta. Fino ad ora solo uno dei sottotipi recettoriali (σ_1) è stato clonato, ma il ligando endogeno rimane ancora sconosciuto, e la possibile associazione del recettore con un secondo messaggero è controversa.

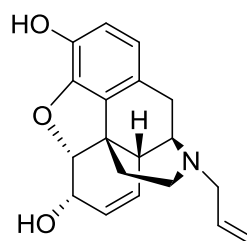
1.1 Recettori σ

I recettori σ , su cui agisce l'SKF-10,047, sono una distinta classe recettoriale presente in molti tessuti normali e tumorali.

Inizialmente furono classificati come recettori oppioidi; ma non essendo le loro funzioni antagonizzate dal naloxone sono stati presto esclusi da questa classe recettoriale. Lo studio sui recettori σ è stato lungo, complicato e un po' misterioso, ed è ancora lontano dall'essere completo. In uno dei primi lavori, Haertzen (1970) ha descritto gli effetti psicomimetici di ciclazocina e nalorfina nell'uomo.¹

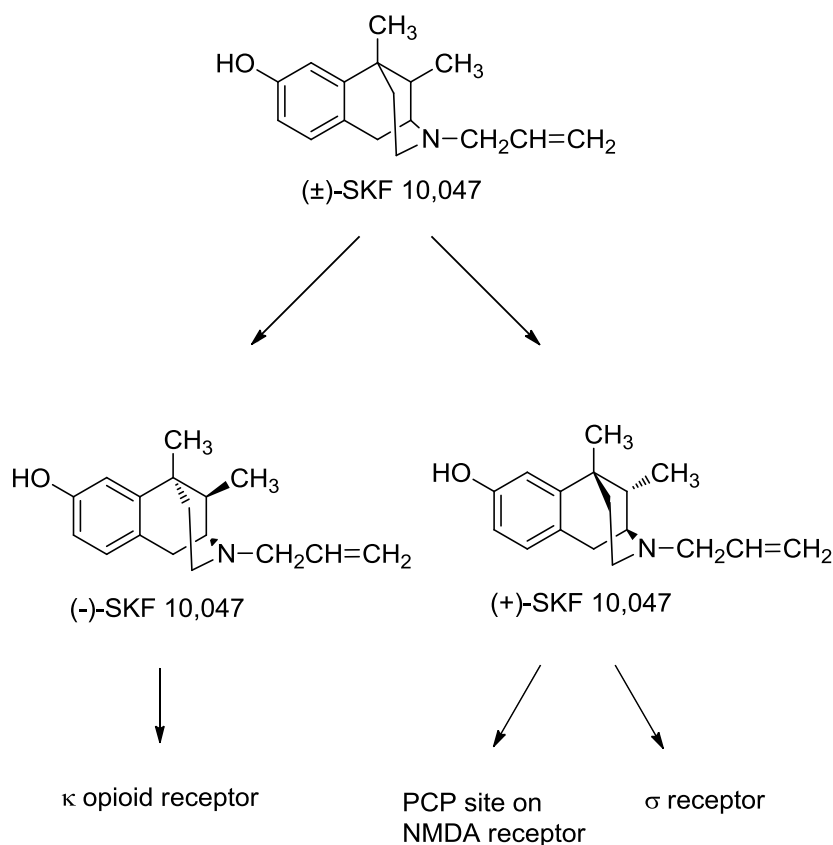


Ciclazocine



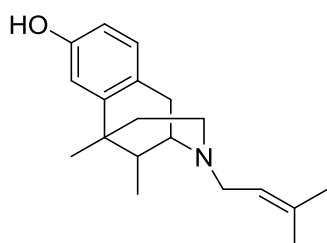
Nalorfine

Il recettore σ fu scoperto da Martin & Co (1976), con studi incentrati sull'azione dell'SKF-10,047 (N-allylnormetazocina) e dei relativi benzomorfolani. Il nome σ deriva appunto dalla prima lettera dell'SKF-10,047. Gli studi di Martin coinvolgevano la miscela racemica (\pm) SKF 10,047.

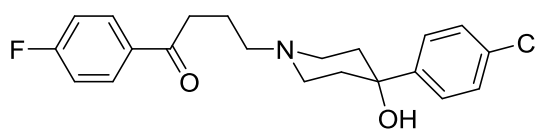


Questo principio attivo agisce attraverso tre distinti siti di legame; l'isomero (-) produce azioni reversibili al naloxone e queste azioni sono attribuite principalmente al legame con il recettore oppioide κ ; mentre l'isomero (+) interagisce con almeno altri due siti: 1) il sito di legame della fenciclidina (PCP)-ionoforo interno del recettore NMDA (N-methyl-D-aspartate), 2) e un secondo sito che ad oggi prende il nome di recettore σ .²⁻³

Martin, infatti, avanzò inizialmente l'ipotesi dell'esistenza di recettori σ degli oppioidi per spiegare il legame di benzomorfini come N-allylnormetazocina (SKF 10.047) e pentazocina; divenne ben presto evidente che diversi non-oppioidi, quali per esempio l'aloiperidolo, si legavano a questi recettori e che alcuni benzomorfini si legavano ai siti di legame della fenciclidina (PCP); questi siti furono in un primo momento definiti recettori σ /PCP; ma a causa delle differenze nella localizzazione cerebrale e nell'affinità di legame, ben presto fu evidente che i siti di legame σ e i siti di legame PCP erano tipi di recettori distinti.⁴⁻⁵



Pentazocine



Aloperidolo

1.2 Sottotipi recettoriali σ e loro localizzazione

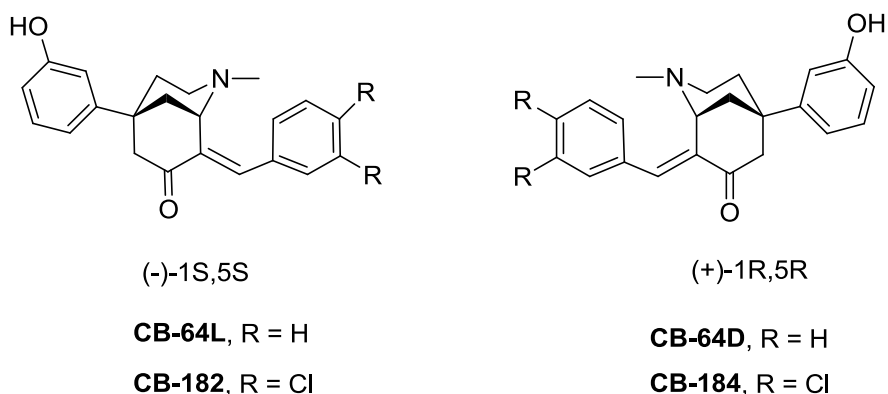
I recettori σ sono situati sia a livello centrale che a livello periferico in organi quali cuore, fegato, polmoni, rene, intestino e organi riproduttivi. Qui svolgono ruoli non ben caratterizzati; sono associati a molti processi organici e cellulari, incluse la funzione motoria, la funzione endocrina, la proliferazione, l'immunoregolazione e la modulazione dei canali ionici.

Studi di binding con radioligandi e analisi biochimiche hanno mostrato la presenza di due sottotipi recettoriali σ : σ_1 (~25 kDa) e σ_2 (~21.5 kDa).¹⁻⁶ Recentemente si è scoperto che, il recettore σ_1 è una proteina di membrana chaperone regolata da ligandi, coinvolta nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico e nella comunicazione

tra i vari organelli; è localizzato nella membrana del reticolo endoplasmatico associato ai mitocondri, ovvero i siti per la regolazione bioenergetica mitocondriale con il rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico.⁷⁻³ La porzione d'interesse è localizzata nel dominio C-terminale del recettore σ_1 ; la rottura del dominio C-terminale porta così alla disfunzione nella risposta allo stress mitocondriale.⁸ Il recettore σ_1 si esprime principalmente nella corteccia cerebrale, nell'ippocampo e nelle cellule del Purkinje del cervelletto ed è stato proposto come bersaglio per malattie connesse al sistema nervoso centrale quali per esempio amnesia, dolore, morbo di Alzheimer e depressione.⁹

Generalmente i recettori σ_2 sono maggiormente espressi nelle linee cellulari tumorali rispetto ai recettori σ_1 ; fanno eccezione le linee cellulari del cancro alla prostata, del LNCaP.FGC e della leucemia ThP-1 dove si ha una prevalenza di recettori σ_1 .¹⁰ I siti del recettore σ_1 presentano un'elevata affinità e stereoselettività per i (+)-isomeri di pentazocina, ciclazocina e SKF 10.047, mentre i siti del recettore σ_2 tendono a preferire i (-)-stereoisomeri.

Un altro esempio, sono i ligandi CB-64L e CB-64D, come anche CB-182 e CB-184.



Nella tabella possiamo vedere come essi mostrano diversa selettività in funzione della stereochimica; infatti, il sito σ_1 risulta altamente enantio-selettivo per il (-)-isomero, mentre il sito σ_2 preferisce l'isomero (+). È importante sottolineare che un confronto tra i sottotipi rivela una selettività 185 volte di CB-64D ((+)-isomero) per i siti σ_2 rispetto σ_1 . In contrasto, CB-64L ((-)-isomero) esibisce una selettività 15 volte superiore per i siti σ_1 rispetto ai siti σ_2 (Tab. 1).¹¹

Composto	Configurazione	$\sigma_1 K_i$, nM	$\sigma_2 K_i$, nM	σ_1 / σ_2 ratio
CB-64L	(-)-1S,5S	10.5±1.6	154+3	0.07
CB-64D	(+)-1R,5R	3063±78	16.5+2.7	185
CB-182	(-)-1S,5S	27.3±2.8	35.5+8.8	0.77
CB-184	(+)-1R,5R	7436±308	13.4+2	554

Tabella 1. Affinità di (*E*)-8-benzylidene-5-(3-Hydroxyphenyl)-2-methylmorphan-7-ones nei confronti dei recettori σ_1 e σ_2 .¹¹

I recettori σ_1 e σ_2 inoltre si differenziano per la loro distribuzione tissutale, per le localizzazioni subcellulari, e per il peso molecolare. Il recettore σ_1 è stato clonato da varie fonti, tra cui fegato di cavia, cervello di topo, cervello umano e cervello di ratto. Sulla base di quanto detto la sequenza aminoacidica del recettore è costituita da 223 aminoacidi e condivide alcune omologie strutturali con i recettori oppioidi e con altri recettori per neurotrasmettitori.

Il locus che codifica per il recettore σ_1 si trova nell'uomo nel cromosoma 9, mentre nel topo nel cromosoma 4. Il gene è lungo ~ 7 kbp e contiene quattro esoni e tre introni.

Altri studi sull'omologia del dominio transmembrana hanno suggerito che il recettore σ_1 (Fig.1) presenti due segmenti transmembrana, uno risultante in un loop

extracellulare di circa 50 aminoacidi e uno intracellulare C-terminale di circa 125 aminoacidi. Secondo questo modello, l'N-terminale risulta molto breve e localizzato a livello intracellulare.¹

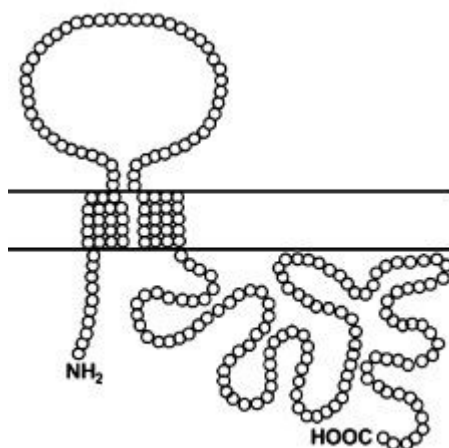


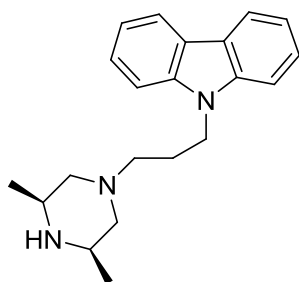
Fig.1 Recettore σ_1

Il recettore σ_2 non è stato così caratterizzato come il recettore σ_1 ; la clonazione del recettore σ_2 non è stata ancora effettuata. La dimensione molecolare del recettore σ_2 è stata riportata essere 18-21 kDa, come determinato da studi di fotoaffinità ed elettroforesi. La maggior parte dei lavori volti a visualizzare i recettori σ hanno usato radioligandi che non discrimina completamente tra i sottotipi σ_1 e σ_2 . In studi più dettagliati, è stato dimostrato che i recettori σ_1 e σ_2 sono generalmente colocalizzati, anche se possono essere presenti in diversi rapporti.¹

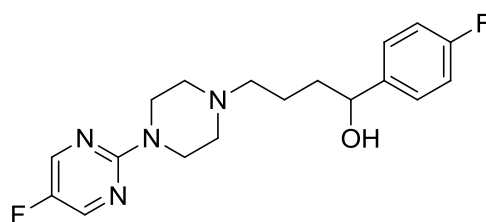
1.3 Ruolo e funzioni fisiologiche dei recettori σ

Tra le loro varie funzioni, i ligandi σ giocano un ruolo importante anche nel trattamento per l'abuso di cocaina. Si è sempre pensato che la capacità della cocaina di dare i suoi effetti di rinforzo fossero dovuti al reuptake della dopamina;

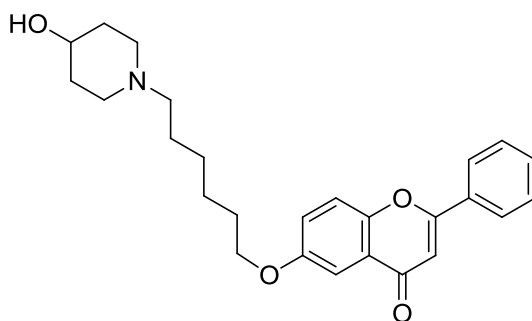
successivamente si è scoperto che oltre a bloccare la ricaptazione della dopamina, la cocaina inibisce la ricaptazione della serotonina e della norepinefrina e si lega ad una serie di neurotrasmettitori recettoriali. La capacità della cocaina di legarsi ai recettori σ fu studiata per primo da Sharkey & Co (1988), ma i primi tentativi per convalidare questa interazione furono fatti qualche anno dopo sintetizzando antagonisti σ come rimcazolo, BMY-14802 (a-(4-fluoro-Phenyl)-4-(5-fluoro-2-pyrimidinyl)-1-piperazine butanol monohydrochloride) e NPC16377 (6-[6-(4-hydroxypiperidinyl)hexyloxy]-3-methylflavone). Essi pur non possedendo un'elevata affinità e selettività per i recettori σ fecero da spunto per la progettazione di nuovi ligandi selettivi; una delle funzioni del BMY-14802, per esempio, era quella di attenuare sensibilmente le convulsioni indotte nei topi dalla cocaina.



Rimcazole

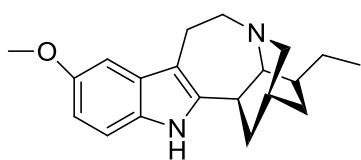


BMY-14802

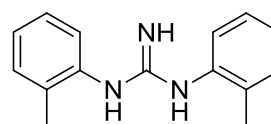


NPC-16377

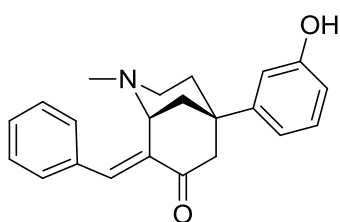
L'antagonismo ai recettori σ può essere ottenuto sia utilizzando antagonisti farmacologici che oligodeossinucleotidi antisenso; gli antagonisti farmacologici agiscono interferendo con il legame della cocaina al recettore σ , mentre gli oligodeossinucleotidi antisenso riducono il numero di recettori σ disponibili per il legame con la cocaina interferendo così con la sintesi di nuove proteine recettoriali. Il risultato finale in entrambi i casi è una riduzione nel numero di recettori σ accessibili alla cocaina. Entrambe queste strategie sono state utilizzate per antagonizzare funzionalmente i recettori σ .² Molti ligandi σ_2 mostrano un profilo scarsamente selettivo. Ligandi come ibogaina, CB-64D, CB-184 e l'antipsicotico aloperidolo, mostrano attività oltre che per σ_2 e σ_1 anche per i recettori NMDA (ibogaina), per il recettore oppioide μ (CB-64D e CB-184) e per i recettori dopaminergici (aloperidolo)¹². Il DTG (1,3-di-(2-tolil)-guanidina) è notevolmente selettivo verso i recettori σ .¹³ Per questa sua caratteristica viene impiegato come radiomarcato nei saggi di binding per il recettore σ_2 .



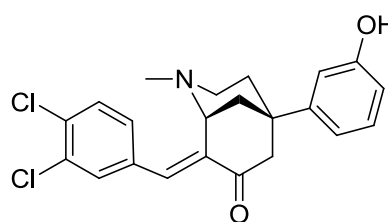
Ibogaine



DTG



CB-64D



CB-184

I recettori σ_1 svolgono diversi ruoli nella modulazione del sistema dei neurotrasmettitori e sono inoltre coinvolti in attività neuroprotettive e della memoria, nella modulazione di oppioidi analgesici e sono efficaci contro i sintomi negativi della schizofrenia. Invece i recettori σ_2 , possono contribuire agli effetti collaterali acuti di farmaci neurolettici tipici; quindi gli antagonisti σ_2 possono attenuare gli effetti extrapiramidali, le reazioni distoniche e la discinesia tardiva suggerendo un loro potenziale uso nel trattamento della psicosi.¹⁴

1.4 Recettori σ_1 e dolore

I recettori σ_1 sono abbondanti nel sistema nervoso centrale, dove possono contribuire alla dipendenza da psicostimolanti, a malattie neurodegenerative, a neuroinfiammazione e a neuroprotezione. Essi sono coinvolti nella nocicezione, e gli effetti rilevati attraverso ligandi σ_1 sono coerenti con un loro ruolo nella sensibilizzazione centrale e ipersensibilità al dolore, che suggerisce un potenziale uso degli antagonisti σ_1 per condizioni di dolore persistente, come il dolore neuropatico o infiammatorio.¹⁵

L'attività del recettore σ_1 è modulata da molecole endogene quali N,N-dimethyltriptamina, progesterone e sfingosina, oltre che regolata da piccole molecole esogene come oppiacei, antipsicotici, antidepressivi, antistaminici, ligandi del recettore adrenergico e cocaina.⁹

È stato dimostrato che il recettore σ_1 , media l'analgesia indotta dalla morfina mediante azioni a siti sia sovraspinali che spinali. Altri studi indicano che l'analgesia indotta da ligandi oppioidi è attenuata da agonisti σ_1 e potenziata da antagonisti σ_1 . Inoltre, gli antagonisti σ_1 attenuano efficacemente l'effetto doloroso in modelli di

dolore neuropatico e infiammatorio. Anche se resta ancora molto da scoprire sul ruolo del recettore σ_1 in soggetti sani e malati, questi risultati insieme dimostrano un ruolo significativo nella modulazione del dolore.¹⁵

Il dolore, definito dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) come “un'esperienza sensoriale ed emozionale spiacevole associata a danno tissutale”, è mediato dai “nocicettori”, recettori che presentano delle terminazioni nervose libere situate nei tessuti periferici e, in minor quantità, nei tessuti profondi. I nocicettori vengono attivati da stimoli nocivi (attivati dalle prostaglandine e inibiti dagli oppioidi) e inviano l'informazione attraverso le vie ascendenti del dolore al cervello e ai centri nervosi; (Fig. 2) questi la elaborano e successivamente inviano la risposta attraverso le vie discendenti del dolore.¹⁶

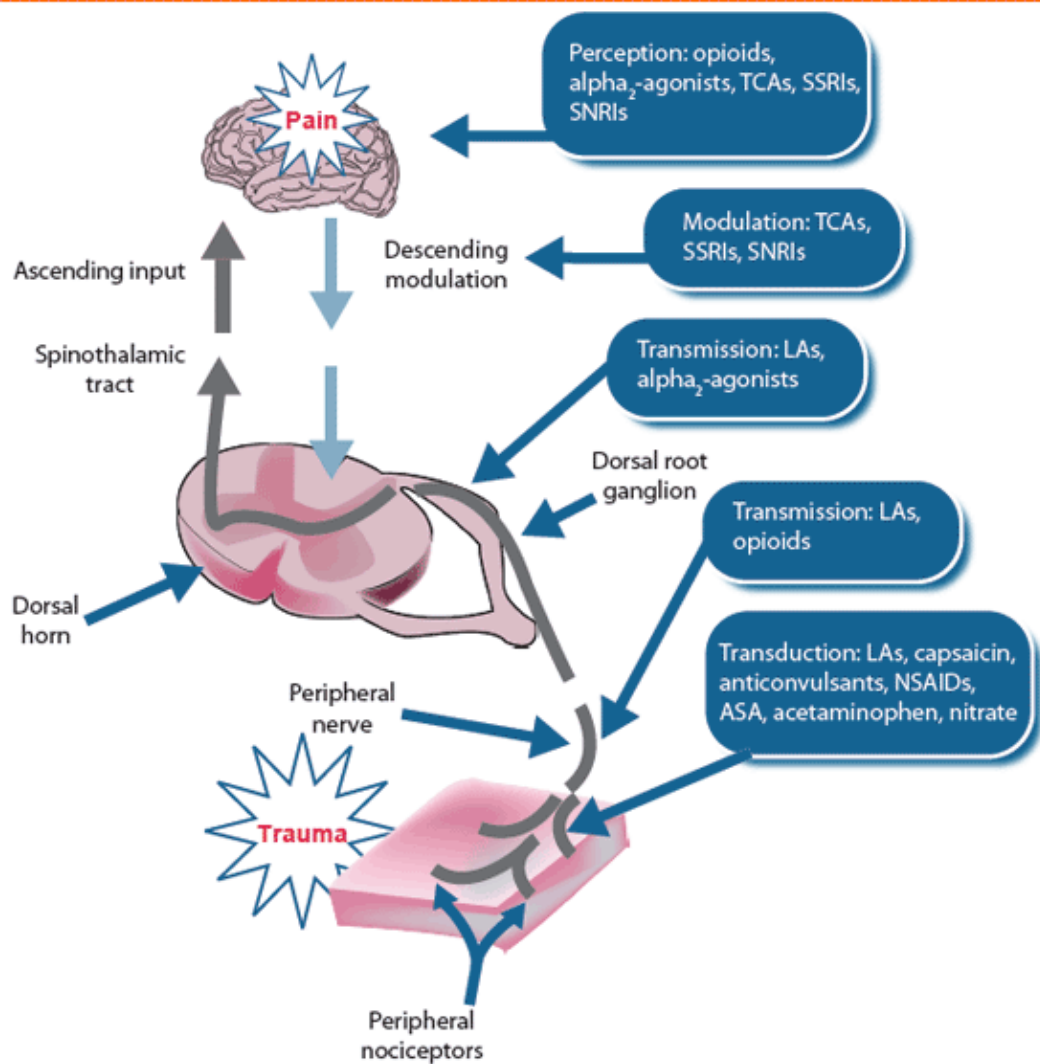
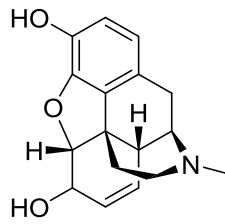


Fig.2 Meccanismo e vie del dolore

Le prime sostanze con proprietà analgesiche scoperte furono gli alcaloidi derivati dell'oppio, come la morfina; essa presenta una struttura fenantrenica capace di mimare la tirosina in posizione 1 dei peptidi oppioidi endogeni. Molto importante è l'azoto terziario a cui è deputata l'attività analgesica; ciò è stato dimostrato dal fatto che trasformando l'azoto terziario in azoto quaternario si perde molta dell'attività analgesica poiché la molecola viene bloccata e non passa a livello del SNC.



Morfina

A questa struttura base sono state apportate varie modifiche per aumentarne la selettività e l'efficacia e per diminuirne gli effetti collaterali (prodotti di sintesi: semisintetici e sintetici).

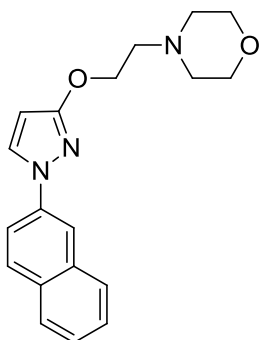
Gli agonisti recettore μ rappresentano i migliori standard per il trattamento del dolore severo; infatti è stato stabilito che gli effetti analgesici dovuti agli oppioidi derivano dalla loro capacità di inibire la trasmissione ascendente dell'informazione nocicettiva dalle corna posteriori del midollo spinale e di attivare i circuiti di controllo del dolore che discendono dal mesencefalo. Però oltre agli effetti analgesici, le sostanze oppioidi possono portare alterazioni delle varie funzioni respiratorie, cardiovascolari e neuroendocrine oltre a tolleranza e dipendenza.¹⁷

Lesioni del nervo periferico inviano più modifiche strutturali e funzionali a livello periferico, nel midollo spinale e in siti sovraspinali che contribuiscono al dolore neuropatico a lungo termine. Alcuni studi dimostrano che i neuroni sensoriali colpiti (feriti) diminuiscono la corrente del Ca^{2+} riducendone così le scorte intracellulari. Queste caratteristiche sono di particolare rilevanza per un potenziale ruolo del recettore σ_1 nel dolore neuropatico; questo infatti, dall'esaurimento delle scorte si attiva riducendo la I_{Ca} in altri tipi di neuroni. Inoltre, il ganglio dorsale principale (DRG), sede del soma dei neuroni sensoriali periferici, genera neurosteroidi, ovvero ligandi del recettore σ_1 . Anche se questa evidenza suggerisce che i recettori σ_1

periferici presenti nei neuroni sensoriali possono contribuire al complesso dei cambiamenti che provocano dolore neuropatico cronico, non è stata ancora esplorata l'espressione dei recettori σ_1 in questa popolazione neuronale.¹⁵

Infatti, in studi recenti, è stato dimostrato che il recettore σ_1 rappresenta un sistema anti-oppioide tonico attivo con sensibilità differente rispetto ai vari ceppi animali. In particolare, aloperidolo, antagonista σ_1 non selettivo, potenzia l'analgesia degli oppioidi, mentre l'agonista σ_1 (+)-pentazocina, dà l'effetto contrario. Questi dati sono stati confermati dalla down-regolazione del recettore σ_1 ottenuto con un approccio antisenso.¹⁸

Alcuni studi affermano che, i ligandi σ_1 possono, potenzialmente, essere usati come adiuvanti dei recettori oppioidi; essi sono basati sull'uso di ligandi non selettivi. In uno studio si è utilizzato un ligando selettivo σ_1 antagonista S1RA (E - 52862) per caratterizzare l'effetto di blocco selettivo del recettore σ_1 sui risultati relativi all'efficacia e alla sicurezza degli oppioidi indotte nei topi. L'effetto di potenziamento dell'S1RA sull'antinocicezione dovuta a morfina non è stato riscontrato in topi knock-out con recettori σ_1 ; questo dimostra il coinvolgimento del recettore σ_1 selettivo.

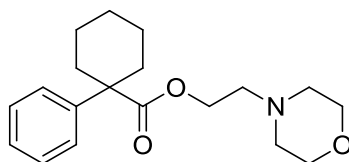


S1RA

Inoltre, il miglioramento della nocicezione non segue il potenziamento degli effetti di altri oppioidi, come lo sviluppo di tolleranza analgesico della morfina, la dipendenza fisica, l'inibizione del tratto gastro intestinale, o la midriasi. L'uso di antagonisti σ_1 come adiuvanti dei recettori oppioidi potrebbe rappresentare una strategia farmacologica promettente per migliorare la potenza oppioide e, soprattutto, per aumentare il margine di sicurezza degli oppioidi. S1RA è attualmente in fase II di sviluppo clinico per il trattamento di varie condizioni di dolore.¹⁹

1.5 Ligandi σ_1

Forti evidenze farmacologiche indicano che i recettori σ_1 sono implicati nella fisiopatologia di tutti i principali disturbi del sistema nervoso centrale; tra cui disturbi dell'umore (ansia e depressione), psicosi e schizofrenia, così come la tossicodipendenza, il dolore e malattie neurodegenerative come il Parkinson e il morbo di Alzheimer. L'effetto modulatore dei ligandi del recettore σ_1 (sia agonisti che antagonisti) non è ben chiaro, perché dipende dal tipo di cellula, proteina bersaglio e saggio funzionale selezionato. Infatti, diversi esperimenti su cellule PC12, un modello in vitro di differenziamento neuronale, hanno dimostrato che agonisti σ_1 , come 2-(4-morfolinoetilico)-1-phenylcyclohexane-1-carbossilato cloridrato (PRE084), sono in grado di potenziare la crescita di neuriti e l'allungamento indotto dal fattore di crescita nervoso (NGF) o fattore di crescita epidermico (EGF).



PRE-084

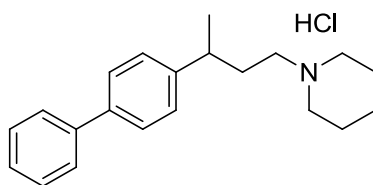
Queste recenti scoperte hanno aperto la porta a un nuovo campo di ricerca sulle nuove strategie farmacologiche per contrastare atti di degenerazione dei motoneuroni.²⁰

PRE084, agonista selettivo del recettore σ_1 , è stato a lungo oggetto di studio; infatti, insieme con il recettore σ_1 , sono stati studiati su un modello cellulare HD (huntington disease) con sovraespressione sia della proteina wild-type che di huntingtina mutante in cellule neuronali PC6.3. È stato dimostrato che i livelli di recettore σ_1 diminuiscono in cellule che esprimono la proteina huntingtina mutante e che PRE084 riesce a ripristinare questi livelli. PRE084 inoltre protegge le cellule PC6.3 dagli effetti deleteri delle proteine huntingtina mutata attraverso la sovra-regolazione di NF-kB p65 risultante dall'aumento dei livelli di antiossidanti cellulari e dalla riduzione dello stress ossidativo.²¹

La SLA (amyotrophic lateral sclerosis) è una malattia neurodegenerativa fatale, caratterizzata da progressiva perdita di motoneuroni nel cervello e nel midollo spinale. Sia l'eziologia che la patogenesi della malattia non sono stati completamente chiariti e i meccanismi molecolari coinvolti nella morte del motoneurone sono ancora in gran parte sconosciuti. Il recettore σ_1 è coinvolto in numerosi processi che portano alla neurodegenerazione acuta e cronica, compresa la SLA. Il trattamento con l'agonista del recettore σ_1 PRE-084 migliora la funzione motoria e la sopravvivenza dei motoneuroni nel topo mutante SOD1-G93A con SLA presintomatica o inizio di effetti sintomatici. Il trattamento cronico con PRE-084 (tre volte alla settimana, per 8 settimane), a partire dall'insorgenza dei sintomi, aumenta significativamente i livelli

di BDNF nella materia grigia, portando un miglioramento della sopravvivenza dei motoneuroni, una migliorata anomalia alla zampa e prestazioni di forza di presa. Inoltre, il trattamento riduce significativamente il numero di astrociti reattivi, che porta all'aumento delle cellule microgliali CD11b+. Questi risultati supportano la manipolazione farmacologica del recettore σ_1 come strategia promettente per curare la SLA e scegliere maggiore disponibilità di fattori di crescita e modulazione di astrocitosi e di macrofagi / microglia come parte dei meccanismi coinvolti nella neuroprotezione mediata dal recettori σ_1 .²²

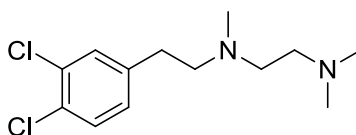
Sono stati svolti vari studi per scoprire nuovi ligandi σ_1 e di recente è stato scoperto l'(R / S)- RC-33 come nuovo potente e selettivo agonista del recettore σ_1 .



(R/S)-RC-33

La miscela racemica (R / S)-RC-33 è molto più potente del PRE084, e non è tossico alle dosi terapeutiche. È generalmente stabile in tutte le matrici biologiche esaminate, con l'unica eccezione del fegato di ratto e umano nella frazione S9 in presenza di NADPH. In tali condizioni, il composto viene sottoposto a un metabolismo ossidativo rilevante, con un degrado del 65 % nel ratto e del 69 % nell'uomo. Questi studi hanno dimostrato che (R / S)-RC-33 è un agonista σ_1 molto potente, selettivo e metabolicamente stabile; un promettente candidato come farmaco neuroprotettivo.²⁰

BD1047, è un antagonista del recettore σ_1 , studi su animali suggeriscono una sua attività antipsicotica, ma può essere usato nel trattamento del dolore neuropatico; infatti è implicato nell'antinocicezione del dolore oro-facciale.



BD-1047

Da uno studio in vivo con formalina, è risultato che un pretrattamento i.p. di BD1047 (10 mg / kg) produce significativi effetti antinocicettivi nei test dei topi con formalina a livello oro-facciale. La regione oro-facciale è una zona del corpo più densamente innervata dal nervo trigemino e concentra parte del dolore acuto più comune. Di conseguenza, il dolore oro-facciale è una preoccupazione importante per i pazienti che soffrono ed è molto difficile da trattare professionalmente.⁴⁶

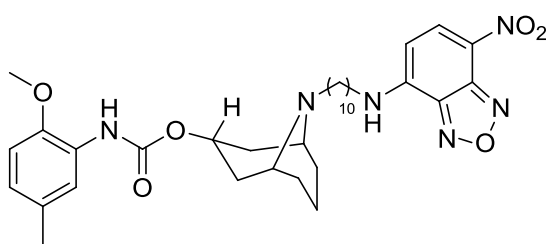
1.6 Recettori σ_2

I recettori σ_2 sono associati a funzioni e disturbi come infiammazione, depressione, ansia, morbo di Alzheimer, epilessia e uso di sostanze d'abuso.

I recettori σ_2 sono, inoltre, un importante target per lo sviluppo di campioni molecolari in oncologia poiché compaiono con densità 10 volte superiore nella proliferazione di cellule tumorali e in cellule tumorali quiescenti; si è inoltre osservato che possono determinare la morte di cellule tumorali attraverso meccanismi apoptotici e nanoptotici.¹⁰

Sia la clonazione del recettore che l'identificazione dei suoi ligandi endogeni non ha avuto successo e le poche informazioni strutturali che si hanno non sono sufficienti per comprendere i suoi ruoli fisiologici, le sue vie di segnalazione e lo sviluppo di ligandi selettivi σ_2 .

Alcuni studi hanno dimostrato come i recettori σ_2 possono interagire con i canali ionici per mobilitare gli ioni cellulari, quali per esempio Ca^{2+} e K^+ . Ulteriori studi hanno accertato il loro importante ruolo nella regolazione della differenziazione cellulare, ma si è notato anche che i recettori σ_2 sono over espressi in molti tipi di cellule cancerogene. È stato utilizzato un ligando σ_2 fluorescente, SW120, per valutare la presenza del recettore σ_2 in diverse linee cellulari staminali, e si è riscontrato come si otteneva una fluorescenza dieci volte maggiore nelle cellule staminali rispetto a quelle di controllo. Queste alte densità di recettore σ_2 in cellule staminali diminuiscono sensibilmente rispetto al numero presente nelle cellule analizzate in condizioni di differenziazione. Questi risultati dimostrano che il recettore σ_2 è un biomarker dello stato proliferativo delle cellule.²³



SW-120

Recettori σ_2 sono espressi in grandi quantità vicino a tutte le linee cellulari tumorali umane e di roditori.

Queste osservazioni hanno portato allo sviluppo di ligandi σ_2 come molecole “probe” (sonda), utili come agenti di imaging nella diagnosi del cancro attraverso PET

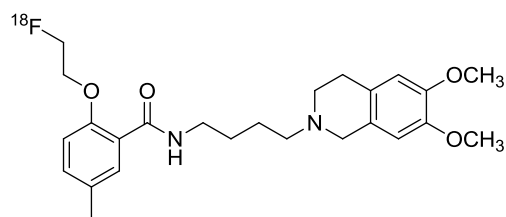
(Positron Emission Tomography) e SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), e all'identificazione dei recettori σ_2 come un potenziale target per il trattamento del cancro.

È stato appena completato uno studio clinico (NCT00968656A) con fluoro-18 radiomarcato (N-[4-(6,7-dimetossi-3,4-diidro-1H-isochinolin-2-il)-butil]-2-(2-fluoroethoxy)-5-iodo-3-methoxybenzamide (ISO-1) per la valutazione della proliferazione cellulare nei tumori attraverso Positron Emission Tomography (PET).

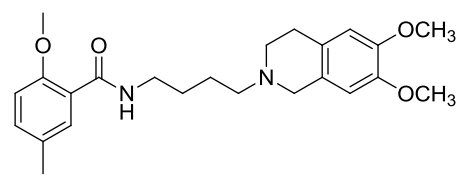
Lo scopo principale di questo studio era, infatti, quello di vedere se PET, con un tracciante radioattivo, ^{18}F -ISO-1, potesse identificare con precisione quanto velocemente le cellule tumorali fossero in crescita o divisione. Secondo obiettivo del suddetto studio, era quello di determinare, attraverso foto, quali tessuti e organi legassero ^{18}F -ISO-1 in modo naturale e stabilire i cambiamenti di assorbimento nel tempo.

Lo studio clinico è stato effettuato su pazienti maggiorenni con tumore (confermato da biopsia) al seno, alla testa e al collo o linfoma diffuso a grandi cellule B; nessun risultato di questo studio risulta attualmente pubblicato.

ISO-1 appartiene ad una serie di benzamidi flessibili generate utilizzando il ligando recettore ad alta affinità σ_2 , 5-metil-2-metossi-N-[4-(6,7-dimetossi-3,4-diidro-1H-isochinolin -2-il)-butil]-benzammide (1, RHM-1) come composto guida. Alcuni radioligandi σ_2 ad alta affinità e selettività appartenenti a questa serie hanno fornito una chiara immagine di diversi tumori solidi con l'assorbimento ottimale del tumore dipendente dai valori di log P dei radioligandi.²⁴



[¹⁸F]-ISO-1



RHM-1

L'apoptosi, ovvero la morte programmata della cellula, è un processo fisiologico importante per lo sviluppo, l'omeostasi e la soppressione dell'oncogenesi. Sappiamo bene che la famiglia delle caspasi gioca un ruolo importante, sia intrinseco che estrinseco, nel meccanismo apoptotico; la caspasi-3 infatti, è l'enzima chiave, che degrada le proteine come gelsolin e lamin, e che porta alla morte cellulare per apoptosi. Sono stati riportati ligandi σ_2 con differenti strutture chimiche capaci di indurre apoptosi in diverse linee cellulari tumorali. Anche se due di questi studi hanno dimostrato che l'esposizione prolungata a ligandi σ_2 uccide le cellule tumorali attraverso una via apoptotica caspasi-indipendente, il meccanismo completo di come i ligandi σ_2 inducono morte cellulare non è stato ancora ben chiarito.²⁵

Recentemente il complesso proteico Pgrmc1 (componente 1 della membrana del recettore del progesterone) è stato identificato come un possibile sito di binding per il recettore σ_2 .²⁵⁻²⁶

Pgrmc1 è una proteina 22kDa multifunzione, con capacità di eme-vincolante e P450-attivante, riconosciuta con diversi nomi a causa dei suoi diversi ruoli nella motilità cellulare durante lo sviluppo neuronale e nel cancro, e l'apoptosi. È stato recentemente dimostrato che Pgrmc1 espresso nella microglia media interazioni estrogeno-progesterone durante la germinazione assonale e media anche l'attivazione della

microglia stessa.²⁷

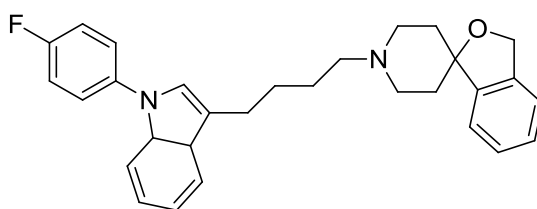
L'identificazione del recettore σ_2 come Pgrmc1 si è avuta mediante spettrometria di massa sulla condivisione di 29 residui. Entrambi sono anche eme proteine di legame ad alta affinità per il P4. Un dato rilevante emerso dagli studi in vitro è che il recettore σ_2 media la migrazione della microglia fino a gradiente di ATP, con specificità farmacologiche che appaiono distinte da ligandi P4-simili. Tuttavia, la sua dimensione kDa 18 è nettamente più piccola rispetto ai 25 kDa di Pgrmc1, e potrebbe essere una forma alternativa di splicing.²⁸

1.7 Ligandi σ_2

I ligandi σ_2 possono indurre apoptosi nelle cellule tumorali e inibire la crescita tumorale in vitro e in vivo; ma anche migliorare significativamente gli effetti farmacologici di altri farmaci anticancro, quali gemcitabina, paclitaxel, con una terapia combinata, aumentando sinergicamente gli effetti farmacologici. Questi effetti sinergici sono stati osservati in studi in vitro e in vivo. Crawford e Bowen furono i primi a sperimentare questa terapia di combinazione in cui un ligando σ_2 somministrato con un agente anticancro, che singolarmente mostravano modesti effetti citotossici, in combinazione provocavano un sostanziale aumento della morte delle cellule tumorali.²³

Gli agonisti σ_2 , come detto prima, possono essere implicati in vari processi; per esempio, Siramesine (o Lu 28-179; 10-[4-[1-(4-fluorphenyl)-1H-indol-3-yl]-1-butyl]-spiro[isobenzofuran-1(3H),40-piperidine]) è un agonista del recettore σ_2 originariamente concepito come un antidepressivo. Il farmaco si è dimostrato sicuro

per l'uso in esseri umani, ma è stato abbandonato come antidepressivo a causa della sua scarsa efficacia. Oltre alle sue proposte proprietà anti-depressive, è stato dimostrato che Siramesine ha attività pro-apoptotica su vari tipi cellulari trasformati, e che l'attività citotossica di siramesine sulle cellule trasformate comporta destabilizzazione lisosomiale.



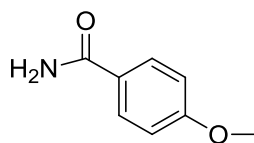
Siramesine

Lisosomi e granuli secretori condividono molte caratteristiche, tra cui pH acido, costituenti della membrana e il contenuto delle idrolasi lisosomiali, per questo motivo si è ipotizzato, che gli agenti (come siramesine) causando permeabilizzazione dei lisosomi potessero avere azioni simili su granuli secretori. Sono stati effettuati studi su Siramesine e sulla sua possibile attività sui mastociti, ed è stato dimostrato che induce selettivamente apoptosi dei mastociti.²⁹

Al fine di chiarire il meccanismo di morte cellulare indotto da siramesine, si è studiato il suo effetto sulla vitalità cellulare in diverse linee cellulari e successivamente sono state selezionate le cellule HaCaT e U-87MG, che rappresentano due modalità di morte cellulare con esordio precoce, per analizzare ulteriormente l'integrità dell'organello e le attività delle caspasi e della catepsina. Si è giunti alla conclusione che è improbabile che siramesine agisca esclusivamente attraverso recettori σ_2 , ma piuttosto attraverso molteplici bersagli molecolari all'interno della cellula. I risultati di vari studi sono quindi di notevole importanza nella progettazione della prossima

generazione di analoghi siramesinici ad alto potenziale antitumorale.³⁰

In un altro studio, Huang & Co ha notato come ligandi σ , come anisamide, possono mediare efficacemente la distribuzione selettiva di liposomi contenenti doxorubicina (DOX) di cellule tumorali in vivo e in vitro.



Anisamide

Inoltre si è dimostrata possibile la somministrazione mirata di oligonucleotidi e siRNA (Short Interfering RNA) per il cancro del polmone e il melanoma utilizzando nanoparticelle ricoperte di anisamide.

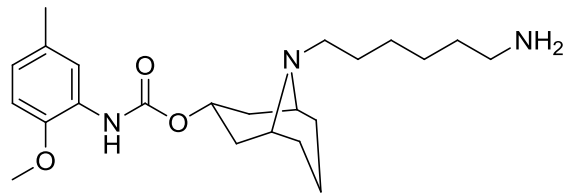
Un altro ligando del recettore σ , aloperidolo, si è mostrato utile per migliorare la trasfezione di cellule di carcinoma mammario MCF-7, con efficacia dieci volte superiore rispetto ai liposomi di controllo (non modificati).

Anisamide e aloperidolo, però, non sono selettivi per i due sottotipi recettoriali σ . Lo studio di Huang stabilisce che ligandi σ_2 selettivi possono essere impiegati per la somministrazione mirata di vettori liposomiali e possono apportare possibili vantaggi.

Per prima cosa vi è una maggiore densità di recettori σ_2 rispetto ai recettori σ_1 nei campioni tumorali e nelle cellule tumorali in coltura; inoltre studi sul legame del ligando e la marcatura per fotoaffinità hanno dimostrato una minore espressione di recettori σ_2 rispetto ai recettori σ_1 nei tessuti normali del sistema nervoso centrale, del tratto gastrointestinale, dei reni, del fegato e del cuore. Infine è stata stabilita una correlazione tra l'espressione del recettore σ_2 e la proliferazione del tumore sia in vitro

che in vivo, di contro però è stata osservata una piccola correlazione anche con il sottotipo σ_1 .

È stato dimostrato quindi che SV119, un ligando selettivo σ_2 , coniugato con peptidi induce apoptosi, provocando così la morte selettiva di cellule tumorali.³¹



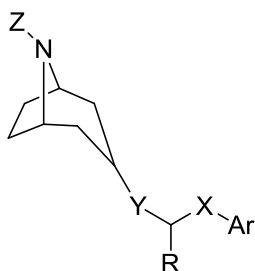
SV-119

2. RAZIONALE: ligandi selettivi σ_2

Agonisti e antagonisti selettivi per recettori σ_1 e σ_2 , possono essere farmaci potenzialmente utili per il trattamento di diverse condizioni patologiche, quali disturbi psichiatrici, abuso di cocaina, memoria e disturbi di apprendimento, discinesia e reazioni distoniche indotte da farmaci antipsicotici classici, cancro e tumore. Attualmente sono stati scoperti diversi composti che legano recettori σ_1 con elevata affinità e selettività, mentre ligandi dei recettori σ_2 hanno generalmente scarsa selettività; si cerca quindi, di progettare e sintetizzare nuovi ligandi σ_2 , necessari al fine di definire le caratteristiche strutturali che possano migliorare la loro affinità e selettività.

Come detto in precedenza, ancora non è stato identificato un modello farmacoforico comune per i ligandi σ_2 , perché questi recettori si legano a composti strutturalmente differenti; in generale però molti di questi composti presentano quasi sempre un azoto e due anelli aromatici ad una certa distanza l'uno dall'altro, e anche ligandi non basici possono reagire con i recettori σ_2 , come per esempio gli steroidi.⁵ Per questo è stato ipotizzato che esso presenti due diverse regioni idrofobiche ad una distanza di 15-16 Å ed una regione centrale donatrice di legame a idrogeno. Da vari studi, infatti, si è riscontrato che maggiore è la distanza tra le due regioni idrofobiche (35-40 Å / 14-16 Å) maggiore sarà la selettività verso i recettori σ_1 ; mentre se la distanza tra queste regioni idrofobiche diminuisce aumenta la selettività verso i recettori σ_2 (la distanza ottimale è 15,2-16,4 Å). In alcuni studi è stata caratterizzata una classe di descrittori, con MACINA (GRIND: griglia di descrittori indipendenti), che permettono di capire le relazioni geometriche interne delle regioni dei recettori con cui i ligandi

stabiliscono legami non covalenti; quindi è stato proposto un modello generale per ligandi σ_2 , su cui poi si è lavorato sintetizzando varie molecole con diversi gruppi funzionali (Tab.2).³²



Modello ipotetico

						K_i nM, ± SE	
N	R¹	R²	X	Y	Z	σ₁	σ₂
R(+) ₁	Me	4-F	O	CO-O	Me	358±27	76±5
S(-) ₁	Me	4-F	O	CO-O	Me		1125±57
1	Me	4-F	O	CO-O	Me		557±42
R(+) ₂	Me	4-Cl	O	CO-O	Me		275±12
S(-) ₂	Me	4-Cl	O	CO-O	Me		1700±130
2	Me	4-Cl	O	CO-O	Me	>1000	402±16
3	Me	2-Cl	O	CO-O	Me	65±3	144±8
4	Me	3-Cl	O	CO-O	Me	>1000	590±35
5	Me	4-Br	O	CO-O	Me		821±58
6	Me	4-CF ₃	O	CO-O	Me		780±68
7	Me	4-CN	O	CO-O	Me		4108±352
8	Me	4-tBu	O	CO-O	Me	399±9	275±20

9	Me	3,4-Cl ₂	O	CO-O	Me	839±48	320±21
10	Me	4-Ph	O	CO-O	Me		781±65
11	Et	H	O	CO-O	Me		4187±380
12	Et	4-F	O	CO-O	Me		25000
R(+)-13	Et	4-Cl	O	CO-O	Me		703±68
S(-)-13	Et	4-Cl	O	CO-O	Me		2169±69
13	Et	4-Cl	O	CO-O	Me	>1000	434±30
14	Et	4-Cl	O	CO-O	Me		2116±180
15	Bn	H	S	CO-O	Me	1477±41	317±80
R(+)-16	Me	4-Cl	S	CO-O	Me		964±41
S(-)-16	Me	4-Cl	S	CO-O	Me	374±15	404±20
16	Me	4-Cl	S	CO-O	Me		553±27
17	Me	4-Br	S	CO-O	Me	1800±39	321±18
18	Me	4-CH ₃	S	CO-O	Me		1104±80
19	Et	H	S	CO-O	Me	>1000	370±20
R(+)-20	Et	4-Cl	S	CO-O	Me		267±18
S(-)-20	Et	4-Cl	S	CO-O	Me		339±31
20	Et	4-Cl	S	CO-O	Me	1173±80	213±16
21	i-Pr	4-Cl	S	CO-O	Me	699±13	332±17
22	Me	H	NH	CO-O	Me		>10000
23	Me	4-Cl	NH	CO-O	Me	>5000	>5000
24	Me	4-Cl	NMe	CO-O	Me		>5000
25	Et	4-Cl	NMe	CO-O	Me		2088±160
26	Me	4-Cl	O	CO-O	Bn	86.2±4	518±30

27	Me	4-Cl	O	CH ₂ O	Me	120.9±6	100±8
28	Et	4-Cl	O	CH ₂ O	Me	220±12	98.5±8
29	Me	4-Cl	S	CH ₂ O	Me	58±3	62±7
30	Et	4-Cl	S	CH ₂ O	Me	117±11	273±14
31	Me	H	O	CONH	Me		619±45
32	Me	4-NO ₂		CO-O	Me		1097±80
33	Me	4-NH ₂		CO-O	Me		3995±238
34	Me	4-Cl		CO-O	Me	2918±63	329±10
35	Me	3,4-Cl ₂		CO-O	Me	1554±50	310±8
36	Me	4-Br		CO-O	Me	1658±45	614±35
37	Me	4-F		CO-O	Me		701±40
38	Me	4-iBu		CO-O	Me		419±20
39	Me	4-OMe		CO-O	Me		>5000
40	Me	4-CF ₃		CO-O	Me		1536±120
41	Me	4-NMe ₂		CO-O	Me		418±231
42	Et	4-Br		CO-O	Me		812±48
45	Cl	H		CO-O	Me		1039±68
46	H	4-Br		CO-O	Me		3430±207
47	Me	4-Br		CO-O	Bn	149.7±9	700±42
48	Me	4-Br		CH ₂ O	Me	316±15	68.7±4
ALOP						2.2±0.1	16±1
DGT						69±3	21±1

Tabella 2

L'ibogaina, citata precedentemente, fa parte degli alcaloidi dell'Iboga ed è molto

importante per l'indagine neurobiologica e lo sviluppo di nuovi farmaci; si ricava dalla corteccia della radice di *Tabernanthe iboga* Baill, un arbusto dell'Africa occidentale, usato per secoli come allucinogeno sacramentale nella religione Bwiti. Pur legandosi anche al recettore μ non si comporta come un ligando oppioide, bensì attenua la tolleranza all'analgesia data dalla morfina.³³ Anche se non è stata approvata come farmaco a causa della sua tossicità, viene spesso utilizzata per le disintossicazioni clandestine.³⁴

L'ibogaina è un alcaloide indolico che, a basse dosi, si è dimostrato essere stimolante del SNC, mentre a dosi maggiori produce effetti allucinogeni e tremorigenici; in particolare trattamenti su topi con ibogaina 100mg/Kg hanno determinato l'attivazione della microglia e degli astrociti e perdita delle cellule del Purkinje nelle zone parasagittali del cervelletto.³⁵

Studi su modelli animali di abuso hanno suggerito come l'ibogaina riduca l'attività locomotoria indotta da anfetamine, morfina e cocaina nei ratti e nei topi; questa però presenta effetti neurotossici a dosi leggermente superiori a quelle utili. Tuttavia da vari studi, si è notato come l'ibogaina oltre a possedere affinità per parecchi tipi recettoriale (quali α_1 , α_2 e β_1 , D_1 e D_2 , $GABA_A$, $5-HT_{1a-d}$, $5-HT_2$ e $5-HT_3$, μ , δ ed NMDA), presenta anche affinità per i recettori σ_1 e σ_2 .

In un recente studio di auto-somministrazione in ratti, è stato dimostrato che un pretrattamento con ibogaina provoca notevoli effetti motori anormali, e che anomalie motorie simili sono state riscontrate quando ligandi σ vengono microiniettati nel nucleo rosso di ratto; ciò indica chiaramente che l'ibogaina ha un'alta affinità per i recettori σ_1 e σ_2 , e suggerisce che gli effetti comportamentali di ibogaina possono essere mediati maggiormente attraverso l'interazione con il recettore σ_2 .³⁶

È stato dimostrato quindi, che l'ibogaina, presenta bassa affinità per σ_1 ($K_i = 9310$ nM) e alta affinità per σ_2 ($K_i = 90,4$ nM). Per confermare quanto detto, cioè che il legame di ibogaina con il recettore σ_2 nel fegato di ratto è equivalente dei recettori del cervello, sono stati effettuati ulteriori test, attraverso studi di binding, usando il cervello di cavia (guinea pig). L'affinità di ibogaina con i siti recettoriali σ_2 nel cervello di guinea pig erano leggermente inferiori rispetto a quella riscontrata nel fegato di ratto, ma probabilmente questo risultato era dovuto alla preparazione diversa della membrana σ_2 (Tab.3).³⁶

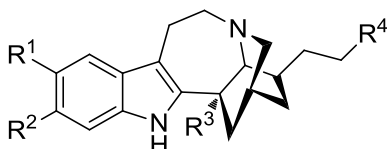
K_i [nM](n=3)^a				
Composto	σ_1^b	σ_2 (fegato)^c	σ_2 (cervello)^d	$\sigma_1:\sigma_2$ selettività
Ibogaina	9310±630	90.4±10.1 ^e	250±39 ^f	103 ^g or 37.2 ^h
Aloperidolo	1.77±0.09	21.8±8.5	14.2±3.2 ⁱ	0.08 ^g or 0.13 ^h
Aloperidolo metabolita II	5.65±0.26	25.4±3.3	1.31±0.03	0.22 ^g or 4.30 ^h

Tabella 3 Affinità di ibogaina, aloperidolo e metabolite II dell'aloferidolo nei confronti dei recettori σ .
^a media \pm SEM; ^b K_i per l'inibizione del legame di [³H](+)-pentazocine sulle membrane di cervello di guinea pig; ^c K_i per l'inibizione del legame di [³H]DTG sulle membrane di fegato di ratto; ^d K_i per l'inibizione del legame di [³H]DTG sulle membrane di cervello di guinea pig; ^e n=4; ^f n=7; ^g K_i for σ_1 / K_i for σ_2 (fegato); ^h K_i for σ_1 / K_i for σ_2 (cervello)

Farmacologicamente sia ibogaina che ligandi σ_2 bloccano l'attività locomotoria indotta dalla cocaina nei topi. Inoltre, ripetute somministrazioni di cocaina e anfetamine hanno portato ad una persistente ipersensibilità dei recettori σ_2 nei ratti³⁶

Il NIDA (National Institute of Drug Abuse) sta supportando dei test preclinici e trials clinici per lo sviluppo della sintesi di un alcaloide sintetico dell'iboga, il 18-methoxycoronaridine (18-MC) come farmaco per il trattamento della dipendenza.

Questo, derivato dall'analogo 16-carbomethoxy a cui viene addizionato il gruppo metoxy in posizione 18, presenta sì, un'aumentata affinità verso i recettori σ_2 rispetto alla (\pm) coronaridina, ma anche una più bassa affinità; al contrario mostra un leggero miglioramento nel legame con il recettore σ_1 (Tab.4).³³



Composto	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	σ_1 (K _i , nM) ^c	σ_2 (K _i , nM) ^b	Ratio σ_1 K _i / σ_2 K _i
(\pm)-Ibogamina	H	H	H	H	1,835 \pm 131	137 \pm 13	13.4
Ibogaina	OCH ₃	H	H	H	8,554 \pm 1,134	201 \pm 24	42.6
Tabernanthine	H	OCH ₃	H	H	2,872 \pm 37	194 \pm 10	14.8
10-t-butoxy- ibogamina	O-t- But	H	H	H	4,859 \pm 682	247 \pm 27	
noribogaina	OH	H	H	H	15,066 \pm 898	5,266 \pm 1,426	
(\pm)-Coronaridine	H	H	CO ₂ CH ₃	H	35,688 \pm 2,858	>100,000	-
(\pm)-18-MC	H	H	CO ₂ CH ₃	OCH ₃	28,687 \pm 283	8,472 \pm 1,237	

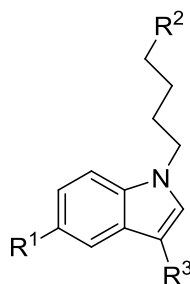
Tabella 4 Risultati adattati dai dati di Bowen e Co.³⁷; ^bi recettori σ_2 sono stati evidenziati con eceptors [3H]-DTG usando membrane di fegato di ratto, in presenza di dextralorphan per inibire il legame con i siti σ_1 . ^c i recettori σ_1 sono stati evidenziati con sonde selettive per σ_1 , [3H](+)-pentazocine, nelle membrane di cervello di guinea pig.

Come si evince dalla tabella 4 Ibogaina è il ligando che mostra maggiore selettività nei confronti del recettore σ_2 tra tutti i derivati dell'Iboga.³⁷

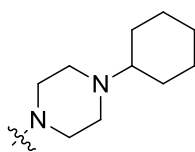
Analizzando altri ligandi selettivi σ_2 , non si può non approfondire gli studi su Siramesine o CB-64-D, di cui si è parlato precedentemente, che presentano due farmacofori importanti per l'interazione con i recettori σ_2 : un azoto protonabile a pH fisiologico e due gruppi lipofili.³⁸

Vari studi su siramesine hanno dimostrato inoltre che l'anello indolico è molto importante per la selettività nei confronti del recettore σ_2 .

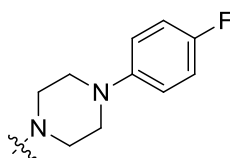
Secondo un lavoro di Perregaar, aggiungendo il 4-fluoro-fenile al posto dell'azoto indolico il ligando selettivo della siramesine acquistava maggiore selettività per il recettore σ_2 .³⁹ Quindi introducendo il 4-fluoro-fenile all'azoto indolico si rende la molecola un ligando molto selettivo σ_2 con affinità subnanomolari per i siti di legame σ_2 (Tab.5).



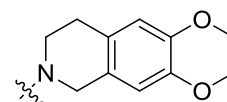
R²-rings



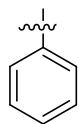
A



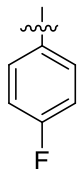
B



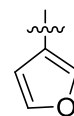
C

R³-rings

D



E

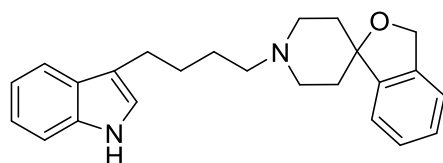


F

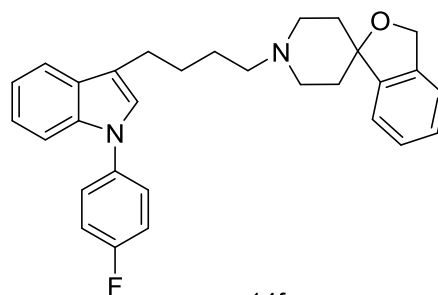
Composto	R ¹	R ²	R ³	σ_1 (K _i , nM)	σ_2 (K _i , nM)	σ_1 / σ_2
1	-	-	-	4.17±0.62	0.39±0.06	10.7
4a	H	A-ring	H	3.28±0.32	1.90±0.16	1.7
4b	H	B-ring	H	71.50±1.53	13.32±0.61	5.4
4c	H	C-ring	H	140.7±5.7	3.66±0.83	38.4
4d	CH ₃ CO	A-ring	H	5.33±2.12	2.31±0.02	2.3
4e	CH ₃ CO	B-ring	H	2.13±0.31	3.30±0.30	0.6
4f	CH ₃ CO	C-ring	H	14.55±1.42	1.42±0.10	10.2
9a	H	A-ring	D-ring	92.43±1.90	12.30±2.34	7.5
9b	H	B-ring	D-ring	222.33±22.41	9.96±1.19	22.3
9c	H	C-ring	D-ring	713.5±163.5	46.29±7.18	15.4
9d	H	A-ring	E-ring	90.87±12.30	22.55±1.10	4.0
9e	H	B-ring	E-ring	1202±73.89	83.33±3.90	14.4
9f	H	C-ring	E-ring	2948.4±374.4	7.45±0.71	395.8
9g	H	A-ring	F-ring	34.50±4.84	10.07±2.01	3.4
9h	H	B-ring	F-ring	279±40.5	157±1.6	1.8
9i	H	C-ring	F-ring	613.66±38.29	12.02±1.15	51.1
Haloperidol	H			3.35±0.80	80.60±14.10	0.042

Tabella 5 Rapporto del binding e della selettività di 1,41-4f, 9a-9i e aloperidolo nei confronti dei recettori σ .³⁹

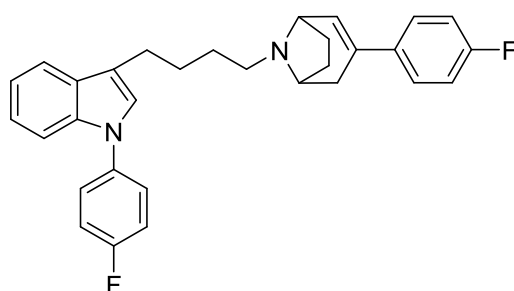
Inoltre, in altri studi, si è notato come i derivati tropanici presentano una maggiore selettività per i recettori σ_2 rispetto ai recettori σ_1 (Tab.6).



12a



14f



Structure of the Tropane derivate 15a

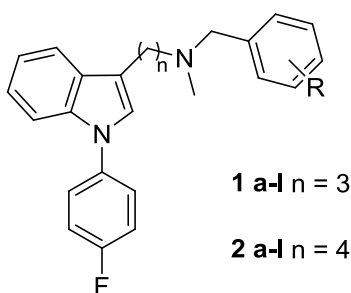
Composto	σ affinità di binding (valore IC_{50} , nM)		
	$[^3H]$ -(+)-pentazocine (σ_1)	$[^3H]$ -(+)-DTG σ_2	σ_1 / σ_2 ratio
12a	2.5	0.41	6.1
14f	17	0.12	140
15a			500

Tabella 6 Affinità di binding nei confronti dei recettori σ da parte di [isobenzofuran-1-(3H),4'-piperidines] 12a e 14f e del derivato tropanico 15a

In uno studio, Mallack e altri, avevano costruito un farmacoforo planare con un azoto basico nel piano dell'anello benzenico con il suo centro a 5,06Å e con il doppietto elettronico dell'azoto quasi perpendicolare a questo piano. All'altra estremità del recettore, sostituenti lipofili all'azoto basico implicano la presenza di una tasca lipofila come secondo sito di binding.

L'analogo tropanico sopra citato, è stato sintetizzato per studiare l'influenza dell'ingombro intorno all'azoto basico della piperidina. Composti come siramesine sono stati studiati su modelli animali per l'attività ansiolitica (test roditori scatola bianco-nero); è stato dimostrato che ha ottima penetrazione nel sistema nervoso centrale sia per somministrazione sottocutanea che per somministrazione orale. Rispetto alle benzodiazepine, come diazepam, l'effetto ansiolitico era più pronunciato e non vi era sedazione; in conclusione erano ligandi σ_2 molto potenti e l'analogo tropanico 15 era il più selettivo σ_2 .⁴⁰

In un altro studio sono stati sintetizzati una serie di ligandi con struttura simile a quella della siramesine con sostituzione all'azoto indolico con il 4-fluoro-fenile e una catena variabile da 3 a 4 atomi di carbonio legata ad un azoto sostituito con un metile e un anello aromatico che presentano alta selettività verso i recettori σ_2 .



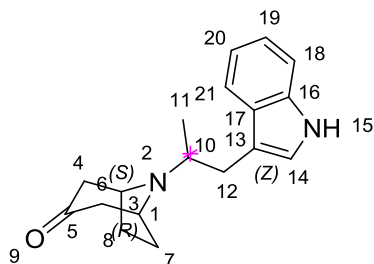
La catena distanziatrice di 4 atomi sembra essere essenziale per l'affinità verso σ_2 delle spiroperidine derivate (Tab7); quindi nel sintetizzare questa serie sono state mantenute sia la catena distanziatrice che il 4-fluoro-fenile dell'azoto indolico, facendo solamente delle modifiche al gruppo N-benzilaminico variando i vari gruppi aromatici. Queste modifiche sono state fatte seguendo il modello recettoriale σ_1 proposto da Glennon et al., con il presupposto che la frazione dell'indolo possa interagire con un sito idrofobico primario corrispondente alla regione "B" fenile, l'atomo d'azoto legato alla catena alchilica possa interagire con un sito recettoriale donatore di protoni e la sostituzione della porzione N-benzilica possa associare una regione idrofobica secondaria simile alla regione "A" fenile del modello recettoriale σ_1 per poi modulare l'affinità di legame dei composti per i recettori σ_1 o σ_2 .¹⁴⁻⁴¹

Composto	<i>n</i>	R	$\sigma_1 K_i$, nM	$\sigma_2 K_i$, nM	σ_1 / σ_2 ratio
1a	3	H	20.8±1	444.3±21	0.05
1c	3	3-Cl	98.9±10	123.5±23	0.80
1l	3	2,4-(CH ₃) ₂	118±16	46.9±12	2.5
2a	4	H	43±7	57.7±16	0.76
2c	4	3-Cl	201±21	25.6±9	7.9
2l	4	2,4-(CH ₃) ₂	129±22	5.9±2	22

Tabella 7 Affinità di binding e ($K_i \pm SEM$ nM) e selettività.¹⁴

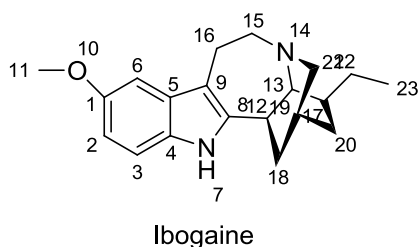
Dopo quanto detto, lo scopo del progetto era quello di progettare e sintetizzare una serie racemica di ligandi σ_2 selettivi con struttura e caratteristiche simili a quelle appena descritte ottenendo maggiore selettività verso i recettori σ_2 .

A tal proposito quindi è stata progettata una molecola con la seguente struttura



(±)-8-(1-(1*H*-indol-3-yl)propan-2-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one

E sono stati effettuati degli studi di modellistica molecolare; in particolare è stato effettuato un test di allineamento flessibile (o sovrapposizione dinamica), in cui si comparava il nostro composto con l'ibogaina.



Ibogaine

Da questo test si è riscontrata una quasi totale sovrapposizione del nostro composto con l'ibogaina (16 sovrapposizioni) (Fig.3), dimostrando che il nostro composto mima molto efficacemente l'ibogaina. Inoltre da questo test si evince che il Metile presente nella catena alchilica al C10 è molto caratterizzante per la molecola poiché si dispone in maniera non planare, costringendo così l'anello tropanico nella posizione d'interesse che mima l'ibogaina.

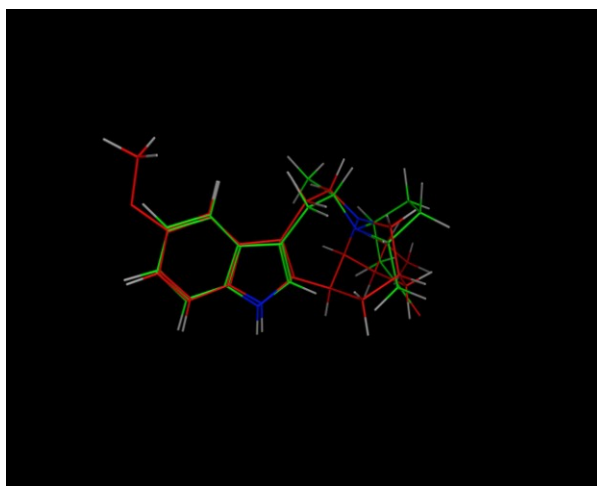


Fig. 3 Sovrapposizione dinamica di ibogaina (rossa) e Pab1-23 (verde)

Analizzando le mappe elettrostatiche (forze di Van der Waals) (Fig.4), possiamo notare le varie differenze dall'ibogaina.

- La mancanza del gruppo etilico nel nostro composto (Pab1-23) potrebbe essere favorevole per la planarità della molecola nella porzione indolica, ma potenzialmente sfavorevole per l'interazione di legame con il recettore;
- L'azoto indolico fornisce le stesse caratteristiche di donatore sia nell'ibogaina che in Pab1-23
- Il carbonile di Pab1-23 al C5 risulta molto più accettore rispetto al ciclo fuso dell'ibogaina;
- Il doppio anello dell'ibogaina non presente nel nostro composto dà caratteristiche leggermente più accettrici all'ibogaina in quella porzione rispetto a Pab1-23
- Le caratteristiche donatrici dell'azoto tropanico vengono mantenute uguali sia in ibogaina che in Pab1-23, l'unica differenza è data dalla presenza del metile al C10 che dà un ingombro sterico notevole.

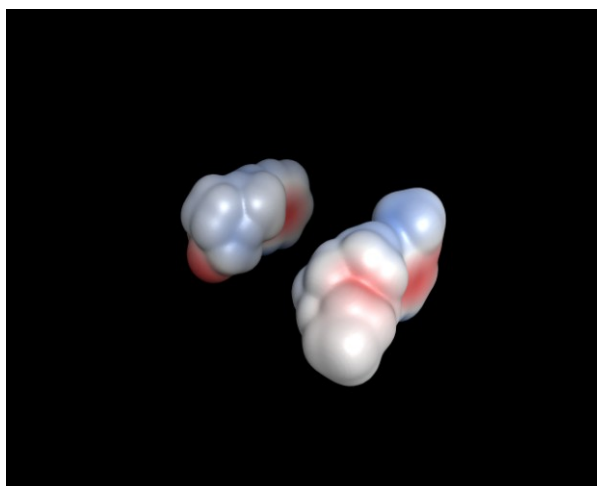


Fig. 4 Mappe elettrostatiche di ibogaine (dx) e Pab1-23 (sx)

Dalle mappe di densità elettronica si nota che in Pab1-23 il flusso di elettroni è indirizzato maggiormente verso il carbonile al C5, mentre nell'ibogaina gli elettroni si dislocano sul doppio anello.

Invece analizzando l'idrofilicità (Fig.5) dei due composti, possiamo notare come Pab1-23 (molecola a sinistra) rispetto all'ibogaina (molecola a destra) risulta non più idrofobica ma più idrofila a causa della presenza del carbonile al C5.

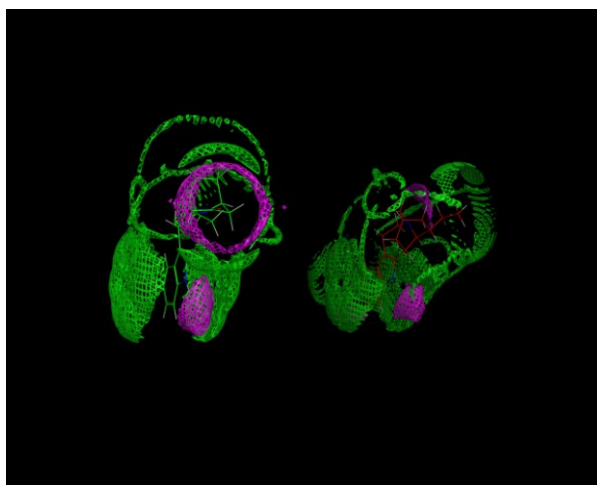
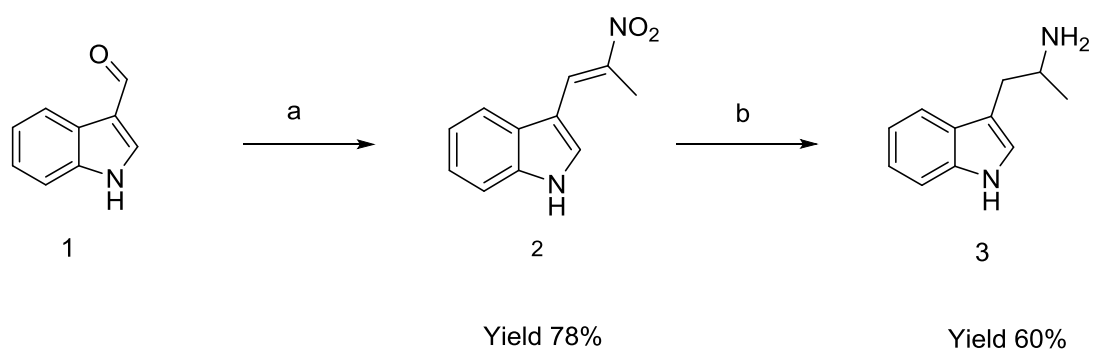


Fig. 5 Siti idrofilici (rosa) e idrofobici (verde) di ibogaina (dx) e Pab1-23 (sx)

3. DISCUSSIONE CHIMICA: ligandi selettivi σ_2

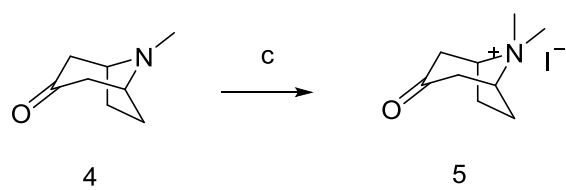
La sintesi di 1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amine (3) è riportata nello schema 1.⁴²⁻⁴³ Una soluzione di indole-3-carboxaldehyde (1) e ammonio acetato, in una miscela di nitroetano ed acido acetico, viene fatta reagire a 110°C, sotto agitazione, per 5h. Il (E)-Il 3-(2-nitroprop-1-en-1-yl)-1H-indole (2) è stato quindi ridotto con LiAlH₄ per ottenere il prodotto desiderato di (±)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amine (3). La sintesi del sale di iodio dell'N,N-dimetil-tropinone 8,8-dimethyl-3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-ium (5) è riportata nello schema 2.⁴⁴ Si solubilizza il Tropinone (4) in acetone; successivamente viene aggiunto ioduro di metile goccia a goccia, a 0°C. La miscela viene fatta reagire sotto agitazione, per 1h, a temperatura ambiente. La sintesi del prodotto finale (±)-8-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (6) (Pab1-23) è riportata nello schema 3.⁴⁴ (±)-1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amine (3) viene solubilizzato in EtOH, a questo viene aggiunto una soluzione acquosa di K₂CO₃ e separatamente (±)-8,8-dimethyl-3-oxo-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-ium (5). Il prodotto finale (±)-8-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (6) è stato confermato attraverso spettroscopia ¹H-NMR e analisi LC-MS. La sintesi dei prodotti finali 9a-b è riportata nello schema 4. Il (±)-8-(1-(1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one (6) viene protetto all'azoto indolico con *terz*-butyl(chloro)dimethylsylanom, quindi all'intermedio protetto viene addizionato l'arile desiderato tramite reazione di grignard. Gli intermedi (8a-b) (±)-8-(1-(1-(*tert*-butyldimethylsilyl)-1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-3-(4-chlorophenyl)-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol e (±)-8-(1-(1-(*tert*-butyldimethylsilyl)-1H-indol-3-yl)propan-2-yl)-3-phenyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-ol sono stati quindi deprotetti con TBAF per dare i prodotti desiderati 9a-b.

Schema 1



a) nitroethane, NH_4OAc , AcOH , 110°C , 5h; b) LiAlH_4 , THF, r.t., 1h

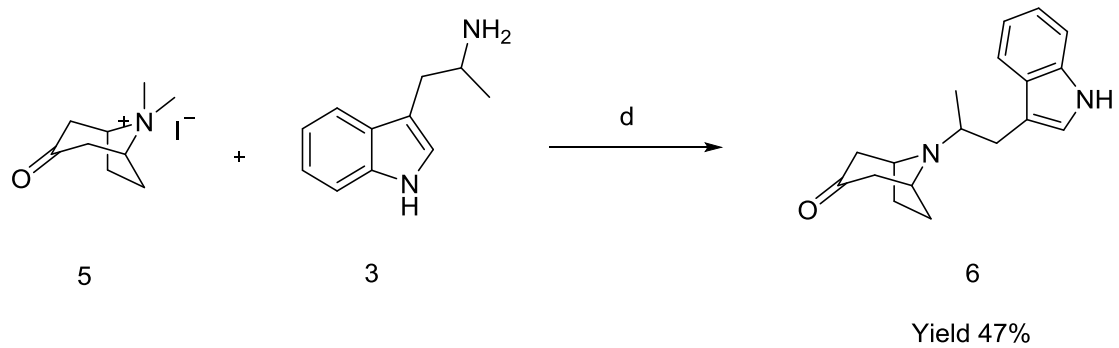
Schema 2



Yield 100%

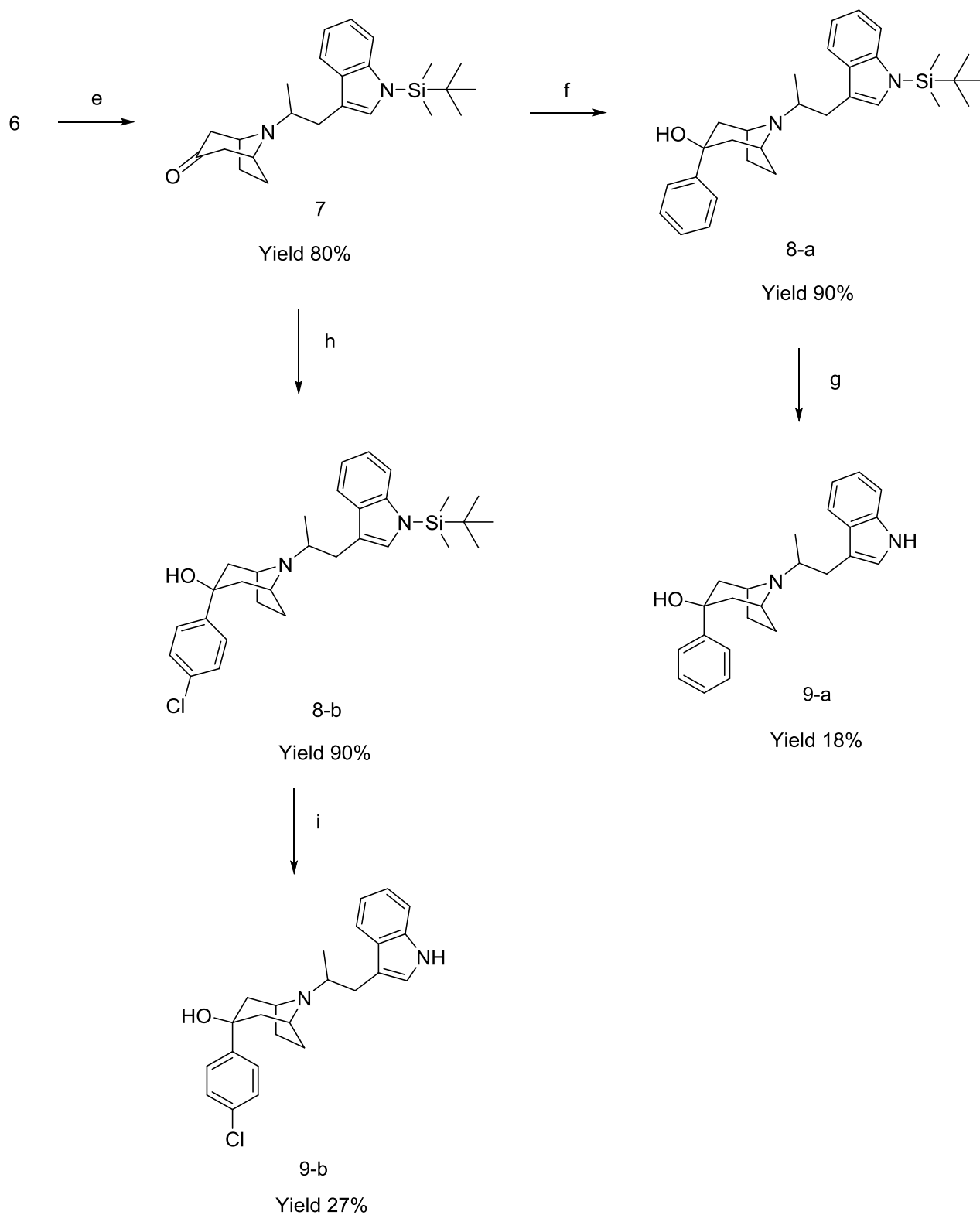
c) CH₃I, Acetone, r.t., 1h

Schema 3



d) K₂CO₃, H₂O, EtOH, reflux, o.n.

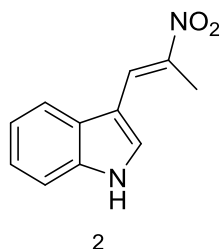
Schema 4



e) NaH, CAN, TBDSiCl, r.t., 1h; f) BrMg-Ph, THF, reflux, o.n.; g) TBAF, THF, r.t., 20 min; h) BrMg-PhCl, THF, reflux, o.n.; i) TBAF, THF, r.t., o.n.

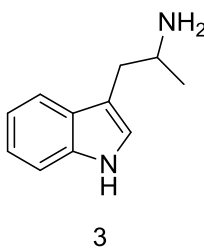
4. SPERIMENTALE : ligandi selettivi σ_2

PAB1-14



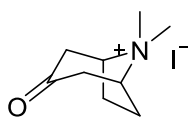
A solution of indole-3-carboxaldehyde (1) (1 eq, 3.44 mmol, 500 mg) and ammonium acetate (0.5 eq, 1.72 mmol, 133 mg) in a mixture of nitroethane (27 eq, 93 mmol, 7 ml) and acetic acid (15 eq, 51.7 mmol, 3 ml) was heated at 110°C for 5h. After 5h the reaction was controlled by TLC (6:4 EtOAc / cyclohexane), the crude reaction was evaporated to dryness, washed with saturated solution of NaHCO₃ (x2) and EtOAc, and the organic layer was washed with brine, then was dried over sodium sulfate and evaporated to dryness. The crude product was purified by flash chromatography (6:4 EtOAc/ Cyclohexane) to give 2 as orange powder. Yield 78%; C₁₁H₁₀N₂O₂; PM: 202.24 g/mol ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 12.23 (br. s., 1H), 8.48 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.85 (d, J = 7.34 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 7.34 Hz, 1H), 7.15 - 7.32 (m, 2H), 2.10 (s, 3H) LC-MS found 203.3 [M + H]⁺; mp: 190°C.

PAB 1-17



The nitro derivate (2) (1 eq, 1.69 mmol, 341 mg) was dissolved in dry THF (3 ml) and the solution was slowly added (0°C) to a suspension of Lithium aluminium Hydride in dry THF 1.0 M (4.2 eq, 7.08 mmol, 7ml) under nitrogen. The reaction was stirred at room temperature for 3h. Then the solution was quenched with a saturated solution of potassium sodium tartrate. It was filtered over celite; and the filtrate was evaporated under vacuum. The crude product was purified via flash chromatography (6:4 EtOAc / Cyclohexane) to give the desired product. Yield 60%; C₁₁H₁₄N₂; PM: 174,24 g/mol; ¹H NMR (200 MHz, CHLOROFORM-d) δ 8.25 (br. s., 1H), 7.59 - 7.72 (m, 1H), 7.34 - 7.42 (m, 1H), 6.98 - 7.26 (m, 3H), 3.20 - 3.45 (m, 1H), 2.91 (dd, *J* = 4.68, 14.05 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 8.20, 14.05 Hz, 1H), 1.19 (d, *J* = 6.25 Hz, 3H); LC-MS found 175.3 [M + H]⁺.

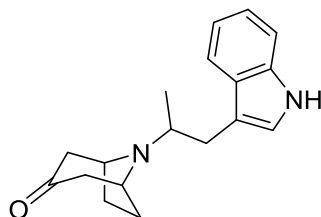
TROPB



5

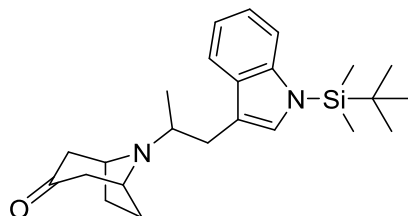
The Tropinone (4) (1 eq, 12.9 mmol, 2 gr) was solubilized in acetone (10 ml). Thereafter was added dropwise methyl iodide (1.1 eq, 14.2 mmol, 2.012 gr). The reaction was stirred for 1h at room temperature. Then the crude was filtered under vacuum and washed several times with acetone and then with a hexane / EtOAc mixture. The crude product was used as it without further purification. Yield 98%; $C_9H_{16}INO$; PM: 281,13 g/mol; 1H NMR (200 MHz, DMSO- d_6) δ 4.15 (br. s., 2H), 3.37 (d, $J = 3.17$ Hz, 3H), 3.16 (d, $J = 3.49$ Hz, 3H), 3.08 (br. s., 2H), 2.50 (d, $J = 17.44$ Hz, 4H), 1.94 (d, $J = 8.56$ Hz, 2H); mp: 219°C.

PAB 1-23



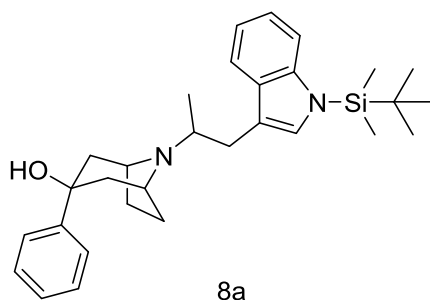
6

The 1-(1H-indol-3-yl)propan-2-amine (3) (1 eq, 1.6 mmol, 279 mg) was dissolved in 10 ml of EtOH. K_2CO_3 (2.1 eq, 3.36 mmol, 465 mg) was dissolved in 2 ml distilled water and added to the mixture. The resulting solution was brought to reflux. A solution of TROPB (5) (1.1 eq, 1.76 mmol, 497 mg) in 5 ml of water was added dropwise. The reaction was refluxed (95°C) overnight. Subsequently, the solvent was evaporated and the crude dissolved in DCM and washed with a saturated solution of $NaHCO_3$ brine. The organic solution was then passed through $NaSO_4$ and the solvent removed under vacuum. The crude product was purified via flash chromatography (6:4 EtOAc / Cyclohexane) to give the desired product. Yield 47%; $C_{18}H_{22}N_2O$; PM: 282,38 g/mol; 1H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-d) δ 8.08 (br. s., 1H), 7.58 (d, $J = 7.83$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 7.83$ Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 7.58$ Hz, 1H), 7.11 - 7.16 (m, 1H), 7.08 (d, $J = 1.47$ Hz, 1H), 4.05 (br. s., 1H), 3.91 (br. s., 1H), 3.28 (dd, $J = 3.42, 14.18$ Hz, 1H), 3.11 - 3.18 (m, 1H), 2.86 (dd, $J = 3.42, 16.10$ Hz, 1H), 2.73 (dd, $J = 9.29, 14.18$ Hz, 1H), 2.68 (dd, $J = 3.42, 16.14$ Hz, 1H), 2.16 - 2.29 (m, 2H), 2.03 - 2.12 (m, 2H), 1.62 - 1.72 (m, 2H), 1.16 (d, $J = 6.36$ Hz, 3H); LC-MS: 283.5 $[M + H]^+$.

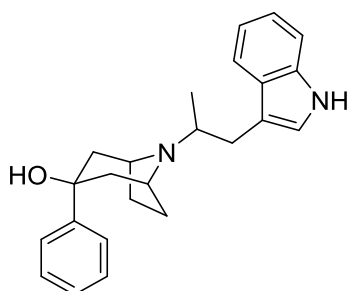


7

Sodium hydride (5 eq, 67mg, 1.68 mmol, 60% mineral oil suspension) was added portion wise to a stirred solution of 6 (1 eq, 0.335mmol, 100 mg) in acetonitrile (1 ml) and the mixture was stirred for 10 min. TBDMSCl 1M solution in CH₂Cl₂ (4 eq, 1.34 mmol, 1.34 ml) was added and the mixture was stirred for 1h at room temperature under nitrogen atmosphere. After 1h an extra NaH and TBDMSCl equivalent was added. the crude product was quenched with water then it was evaporated to dryness. The crude was dissolved in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried with Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. The resulting product was purified via flash chromatography eluting 0-100% EtOAc in cyclohexane to give the desired product. Yield 80%; C₂₄H₃₆N₂OSi; PM: 396.64 g/mol; ¹H NMR (200 MHz, CHLOROFORM-d) δ 7.47 - 7.57 (m, 2H), 7.11 - 7.19 (m, 2H), 7.02 (s, 1H), 3.98 (d, *J* = 1.00 Hz, 2H), 3.24 (dd, *J* = 3.20, 14 Hz, 1H), 3.05 - 3.18 (m, 1H), 2.82 (dd, *J* = 3.20, 14.00 Hz, 1H), 2.69 (dd, *J* = 9.20, 14.00 Hz, 2H), 2.19 - 2.32 (m, 2H), 1.58 - 1.74 (m, 4H), 1.14 (d, *J* = 6.34 Hz, 3H), 0.88 - 0.99 (m, 9H), 0.61 (d, *J* = 2.22 Hz, 6H); LC-MS: 397.8 [M + H]⁺.



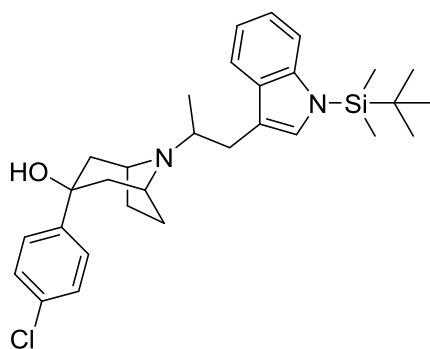
Intermediate 8 (1 eq, 73 mg, 0.177 mmol) was solubilized in anhydrous THF (0.5 ml) and subsequently to this mixture was added phenylmagnesium bromide (5 eq, 0.884 mmol, 1ml) and the mixture was stirred at reflux overnight. After confirmation by LC-MS analysis, the reaction was quenched with few drops of HCl 1N. The crude was evaporated, dissolved in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried with Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. The resulting product was used as it without further purification. C₃₀H₄₂N₂OSi; PM: 474.75 g/mol; LC-MS found 475.9 [M + H]⁺.



9-a

A solution of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in THF 1M (2 eq, 0.473 mmol, 0.5ml) was added to a stirred solution of 8a (1 eq, 0.236 mmol, 116 mg) in THF (2 ml), under nitrogen atmosphere. The solution was stirred for 20 min at room temperature. The reaction was stopped, the crude was dissolved in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. The resulting product was purified via flash chromatography eluting 0-10% MeOH/4 % NH₄OH in DCM. The crude was precipitated in CHCl₃ and the precipitate (white powder) was filtered under vacuum to give the desired product. Yield 18%; C₂₄H₂₈N₂O; PM: 360.49 g/mol; ¹H NMR (500 MHz, METHANOL-d₄) δ 7.58 (d, J = 7.83 Hz, 3H), 7.34 - 7.43 (m, 3H), 7.24 - 7.30 (m, 2H), 7.16 (t, J = 7.58 Hz, 1H), 7.04 - 7.11 (m, 1H), 4.47 - 4.67 (m, 1H), 4.41 (br. s., 1H), 3.54 (dd, J = 3.67, 14.43 Hz, 1H), 3.09 (dd, J = 9.29, 14.18 Hz, 1H), 2.53 - 2.83 (m, 5H), 2.14 - 2.32 (m, 4H), 1.43 (d, J = 6.36 Hz, 3H); LC-MS found 361.6 [M + H]⁺.

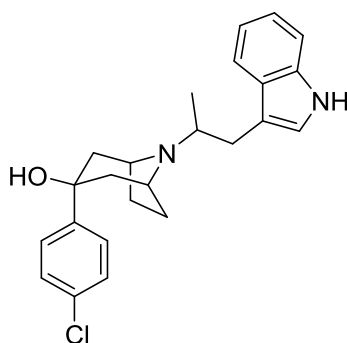
MIC 1-5



8b

Intermediate 7 (1 eq, 0.24 mmol, 95 mg) was solubilized in anhydrous THF (0.5 ml) and subsequently to the mixture was added 4-Chloro-phenylmagnesium bromide (5 eq, 1.2 mmol, 258 mg) and the mixture was kept under reflux overnight. After confirmation by LC-MS analysis, the reaction was quenched with few drops of HCl 1N solution. The crude was evaporated, dissolved in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried with Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. The resulting product was used as it without further purification. C₃₀H₄₁ClN₂OSi; PM: 509.20 g/mol; LC-MS found 510.3 [M + H]⁺.

PAB 1-57



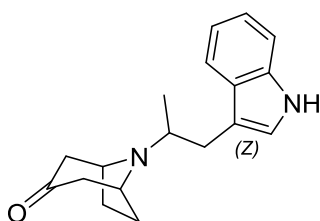
9b

A solution of tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in THF 1M (2 eq, 0.48 mmol, 0.5ml) was added to a stirred solution of reagent (8b) (1 eq, 122 mg, 0.24 mmol) in THF (2 ml), under nitrogen atmosphere. After the solution was stirred overnight at room temperature. The reaction was stopped, the crude was dissolved in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated. The resulting product was purified via flash chromatography eluting 0-10% MeOH/4 % NH₄OH in DCM. The crude was precipitated in CHCl₃ and the precipitate (white powder) was filtered under vacuum to give the desired product. Yield 27%; C₂₄H₂₇ClN₂O; PM: 394.94 g/mol; ¹H NMR (500 MHz, METHANOL-d₄) δ 7.58 - 7.61 (m, 3H), 7.43 (d, J = 8.31 Hz, 1H), 7.39 (d, J = 8.31 Hz, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.18 (t, J = 7.34 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 4.53 - 4.68 (m, 1H), 4.42 (br. s, 1H), 3.56 (dd, J = 3.67, 14.20 Hz, 1H), 3.10 (dd, J = 9.30, 14.20 Hz, 1H), 2.69 - 2.83 (m, 3H), 2.53 - 2.67 (m, 2H), 2.16 - 2.33 (m, 4H), 1.45 (d, J = 1.00 Hz, 3H)); LC-MS found 396.1 [M + H]⁺

5. CONCLUSIONI: ligandi selettivi σ_2

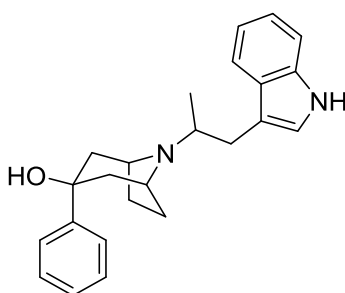
Ad oggi sono stati sintetizzati :

- il composto (6), su cui erano stati fatti gli studi di allineamento flessibile e che aveva dimostrato possedere una sovrapposizione pressochè totale con l'ibogaina;



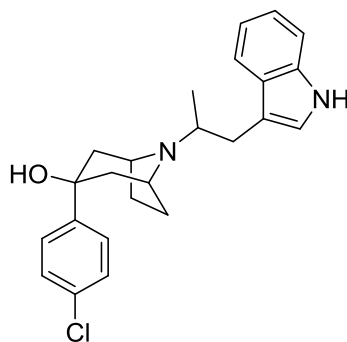
6

- il composto (9-a), ovvero il phenyl-derivato del composto (6)



9-a

- il composto (9-b), ovvero il 4-chloro-phenyl- derivato del composto (6).



9-b

I composti sono stati purificati attraverso MPLC, ed analizzati mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ ed analisi LC-MS.

È stato effettuato un lavoro di allineamento flessibile sul composto (6) nei confronti di un ligando selettivo σ_2 , quale l'ibogaina, riscontrando parecchie sovrapposizioni ed arrivando alla conclusione che il nostro composto (6) mima quasi totalmente l'ibogaina.

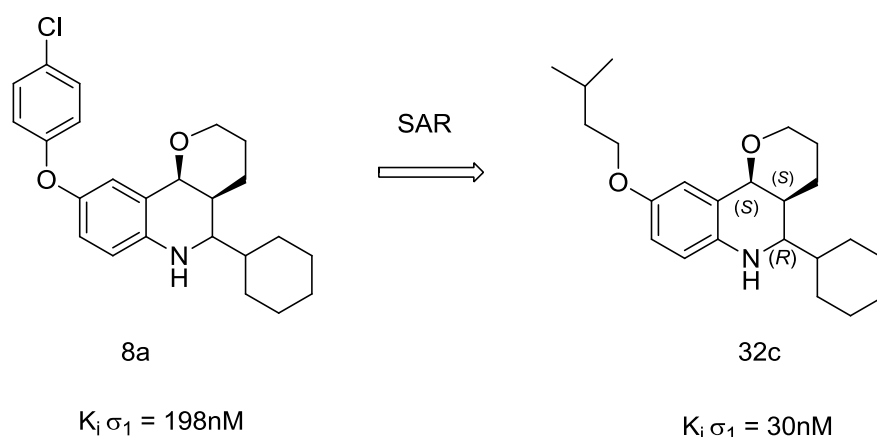
Attualmente si è in attesa dei risultati dei test di binding.

Nel frattempo si continua nella sintesi di una serie di molecole derivate del composto (6), cercando di aumentare maggiormente la selettività per il recettore σ_2 .

6. RAZIONALE: ligandi selettivi σ_1

Il secondo studio si è incentrato sulla sintesi e la progettazione di una serie di composti selettivi σ_1 con una struttura diversa dai classici ligandi σ_1 .

Recentemente è stato pubblicato uno studio riguardante la sintesi e la progettazione di una serie di hexahydro-2H-pyran-[3,2-c]-quinoline derivate presentate come potenti ligandi del recettore σ_1 .



Questa famiglia, non presenta il gruppo amminico altamente basico a differenza dei classici ligandi σ_1 . Sappiamo, infatti, che questi si presentano normalmente con un'amina e almeno due regioni idrofobiche ad una certa distanza. Inoltre il loro pK_a normalmente è intorno a 6.5⁴¹; invece il composto 8a mostrava due gruppi idrofobi ad una distanza adeguata, ma una pK_a di 4.6. Questa serie ha mostrato elevata selettività σ_1 rispetto al σ_2 ; l'attività è stata riscontrata in uno solo dei quattro possibili diastereoisomeri (Fig.6), che presentavano una corrispondenza perfetta con noti farmacofori σ_1 .⁴⁷

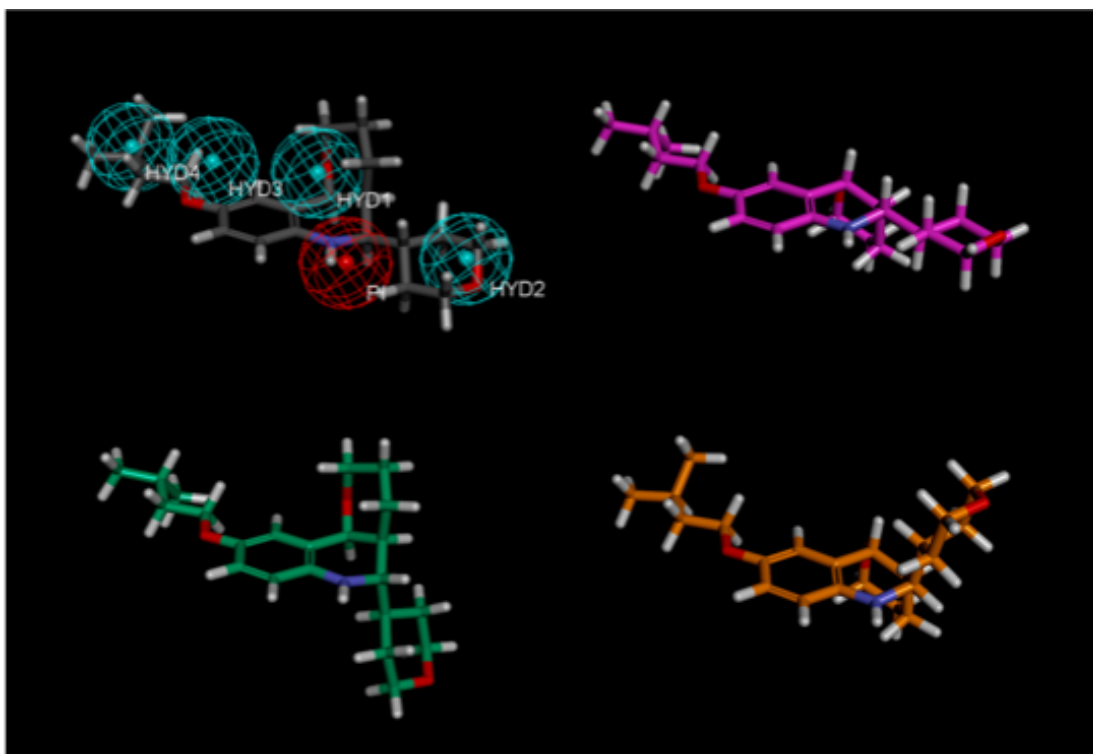
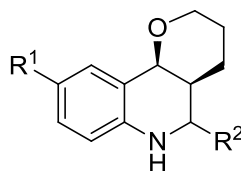


Fig.6 Minimizzazione delle strutture dei quattro diastereoisomeri possibili del composto 32. In alto a sinistra in grigio si mostra il diastereoisomero (32c) 4aS,5R,10bS e la sovrapposizione con il farmacoforo del recettore σ_1 descritto da Laggner,⁴⁵ in alto a destra in rosa il diastereoisomero (32d) 4aR,5S,10bR, in basso a sinistra in verde il diastereoisomero (32e) 5S,10bS diastereomer (32e), e in basso a destra in arancione in diastereoisomero (32f) 4aR,5R,10bR

Il composto 8a ha mostrato possedere un'affinità submicromolare per il recettore σ_1 e una K_i superiore a 1000 nM rispetto al recettore σ_2 . Proprio per questo motivo il composto 8a è stato utilizzato come lead per la progettazione di una serie di ligandi con potenziale selettività σ_1 rispetto a σ_2 .



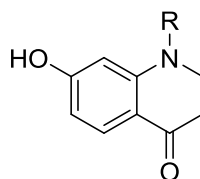
Composto	R ¹	R ²	cLogP	K _i (h σ_1) ^a (nM)
8a	4-Cl-phenyloxy	Cyclohexyl	7.0	194±75
16a	Butoxy	Cyclohexyl	5.9	178±18

17a	Isopentyloxy	Cyclohexyl	6.3	52±3
18a	4-(fluorobenzyl)-oxy	Cyclohexyl	6.2	> 1000
32a	Isopentyloxy	Tetrahydro-2H-pyran-4-yl	3.9	84±23

Tab.12 Affinità di binding al recettore umano σ_1 ($h\sigma_1$) in membrane transfettate HEK-293 usando [3H]-(+)-pentazocine come radioligando. Questo valore è la media \pm SD di due determinazioni

Un programma basato sullo screening high-throughput di una serie di lead come per esempio il composto 8a, ha portato all'identificazione del composto 32c, che presenta un sensibile miglioramento di attività e proprietà fisico-chimiche. Il composto 32c mostra anche un buon ADMET (assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione, tossicità) e un buon profilo farmacologico, infatti, è stato identificato come un antagonista del recettore σ_1 sulla base della sua attività analgesica in modelli murini capsaicina e formalina di dolore neurogeno.⁴⁷

Da queste informazioni si è deciso di procedere con la progettazione e la sintesi di una serie di ligandi σ_1 con un nucleo simile alle molecole sopra citate, ovvero molecole che presentano una struttura non comune ai classici ligandi σ_1 con un azoto altamente basico;



ed inserendo come R dei sostituenti con caratteristiche simili a quelle dei ligandi σ , descritti.

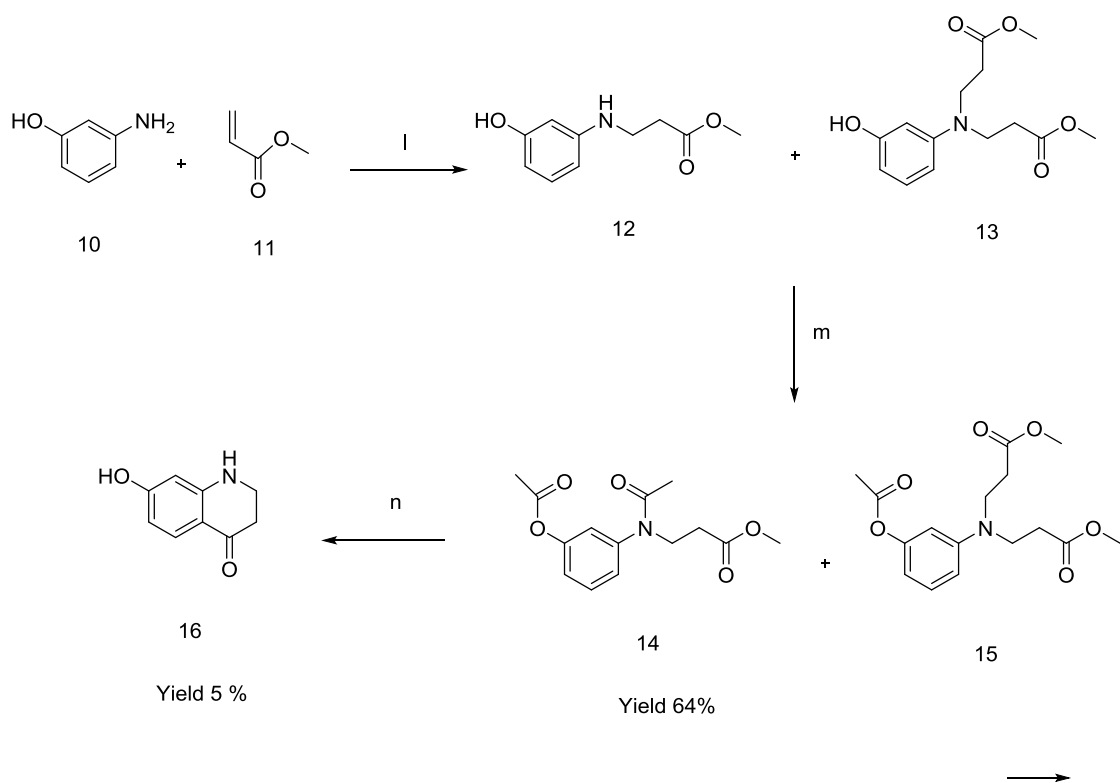
7. DISCUSSIONE CHIMICA: ligandi selettivi σ_1

La sintesi del l'intermedio di reazione 7-hydroxy-2,3-dihydroquinolin-4(1H)-one (16) è riportata nello schema di reazione 5.

Alla miscela di 3-amino-fenolo (10), metilacrilato (11) e acqua, è stato aggiunto MeOH (in rapporto 1:1) per ottenere una reazione fasica. La miscela è stata lasciata in agitazione, a 80°C, overnight. Attraverso analisi LC-MS si è notato di aver ottenuto due prodotti di reazione, methyl 3-((3-hydroxyphenyl)amino)propanoate (12) e dimethyl 3,3'-((3-hydroxyphenyl)azanediyl)dipropionate (13).

La miscela di prodotti (12) e (13) è stata fatta reagire con anidride acetica, a 100°C, overnight. Il prodotto ottenuto e purificato methyl 3-(N-(3-acetoxyphenyl)acetamido)propanoate (14) è stato fatto reagire con acido solforico, sotto agitazione, a 15°C, overnight per due giorni. Essendo presente ancora prodotto di partenza, la miscela di reazione è stata fatta reagire per 10 minuti a 100°C e successivamente messa in ghiaccio per catalizzare la reazione. Il crudo di reazione è stato lasciato riposare per tutta la notte in freezer (-20°C). Dopo opportuna purificazione è stato ottenuto l'intermedio di reazione 7-hydroxy-2,3-dihydroquinolin-4(1H)-one (16) con una resa del 5 %..

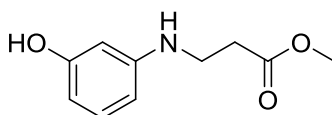
Schema 5



l) H₂O, MeOH, 80°C, o.n.; m) Acetic anhydride, 100°C, o.n.; n) Sulfuric acid, 15°C, o.n. (2 day) and after 100°C, 10 min

8. SPERIMENTALE : ligandi selettivi σ_1

ALA1-31



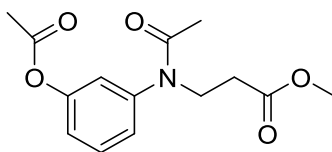
12

In a flask insert 3-amino-phenol (1 eq, 55 mmol, 6 g), methyl acrylate (3 eq, 165 mmol, 14,8 ml) and water. Add methanol (54 ml) to obtain a phasic solution (Methanol / Water 1:1). The reaction was stirred at 80 ° C overnight.

The product shows a certain amount of di-alkylation. The reaction was stopped, the crude was dissolved in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated under vacuum at room temperature, to prevent further acrylic in the bathroom of a rotavapor. .

C₁₀H₁₃NO₃; PM: 195.22 g/mol; LC-MS: found 196.2 [M + H]⁺.

ALA1-40

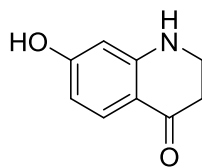


14

A mixture of (13-14) (1 eq, 50.3 mmol, 9.8 g) and acetic anhydride (50 eq, 2513 mmol, 238 ml) was stirred at 100 ° C overnight. Acetic anhydride was evaporated under vacuum. The resulting product was purified via flash chromatography eluting 0-100% EtOAc in Cyclohexane The intermediate (14), was obtained with a yield of 64 %.

Yield 64 %; C₁₄H₁₇NO₅; PM: 279.29 g/mol; ¹H NMR (200 MHz, CHLOROFORM-d) δ 7.43 (t, *J* = 1.00 Hz, 1H), 7.03 - 7.15 (m, 2H), 6.96 (t, *J* = 1.00 Hz, 1H), 3.99 (t, *J* = 7.29 Hz, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.58 (t, *J* = 7.29 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H), 1.86 (s, 3H); LC-MS found 280 [M + H]⁺.

ALA1-44



16

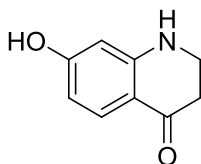
A mixture of intermediate 14 and sulfuric acid was stirred at 15 ° C overnight for 2 days. After, there was still further starting product, was reacted for 10 min at 100 ° C, and then immediately in ice, to catalyze the reaction. Stored at -20 ° C for the week-end. The crude was dissolved in DCM and washed with a saturated solution of NaHCO₃ and brine. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and the solvent was evaporated under vacuum.

The resulting product was purified via flash chromatography eluting 0-4% MeOH/1 % NH₄OH in DCM to give the desired product.

Yield 5 %; C₉H₉NO₂; PM: 163.17 g/mol; ¹H NMR (200 MHz, CHLOROFORM-d) δ 8.23 - 8.78 (br. s., 1H), 7.75 (d, *J* = 8.88 Hz, 1H), 6.29 (dd, *J* = 2.22, 8.56 Hz, 1H), 6.13 (d, *J* = 2.22 Hz, 1H), 4.59 (br. s., 1H), 2.54 - 2.72 (m, 4H) ; LC-MS found 164 [M + H]⁺.

9. CONCLUSIONI: ligandi selettivi σ_1

Attualmente la sintesi è giunta all'intermedio di reazione (16).



16

Gli intermedi ottenuti fino ad ora sono stati purificati attraverso flash cromatografia o MPLC, ed analizzati e confermati mediante spettrometria NMR e analisi LC-MS. La sintesi delle molecole progettate, sta proseguendo e si è in attesa di conferme spettroscopiche riguardanti uno dei composti finali progettati. Successivamente si proseguirà con i test di binding.

10. MATERIALI E METODI

Tutti i prodotti commerciali usati come reagenti e solventi sono stati acquistati da Sigma Aldrich Chemical & Co o da Fisher Scientific. La cromatografia su strato sottile è stata eseguita mediante fogli di alluminio al gel di silice 60 F₂₅₄ (Merck) con indicatore di fluorescenza. I prodotti sono stati visualizzati tramite luce UV ($\lambda = 254$ e 365 nm), vapori di Iodio e indicatore acido-base. La flash chromatography è stata eseguita utilizzando colonne impaccate con gel di silice 60 230-400 mesh (Merck) o utilizzando MPLC interchim puriflash 430 con colonne pre-impaccate interchim puriflash Si-HP o Biotage snap cartridge KP-Sil. Gli spettri NMR sono stati registrati in fase liquida utilizzando come solventi deuterati DMSO-d₆, CDCl₃ e CD₃OD con gli spettrometri Varian Inova-200 e Varian Inova-500. Gli spettri NMR sono stati processati tramite SCD/NMR Processor Edition versione 12.01. Le nomenclature sono state generate usando Chem Sketch 11.0. Il punto di fusione è stato misurato attraverso lo strumento Stuart – Melting Point SMP30. Le analisi LC-MS sono state effettuate con lo strumento API2000 LC/MS/MS System AB Sciex abbinato ad UHPLC Perkin Elmer Flexar FX-10 UHPLC System e con un rivelatore UV-visibile a singola lunghezza d'onda; con colonne Waters X-Terra RP 18 3.00x150mm 3.5 μ m o Thermo Fisher Scientific Hypersil WP300 C8 4.6x100mm 5 μ m; e gli spettri sono stati processati con Analyst version 1.6.1

BIBLIOGRAFIA

- (1) Lesma, Salvadori, Airaghi, Bojnik, Borsodi, Recca, Sacchetti, Balboni, Silvani. *Mol. Divers* **2013**, 17, 19-31. “Synthesis, pharmacological evaluation and conformational investigation of endomorphin-2 hybrid analogues”
- (2) Matsumoto, R. R.; Liu, Y.; Lerner, M.; Howard, E. W.; Brackett, D. J. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, 469, 1–12. “ σ receptors: potential medication development target for anti-cocaine agents“
- (3) Maurice, T.; Su, T.-P. *Pharmacol. Ther.* **2009**, 124, 195–206. “ The pharmacology of sigma-1 receptors”
- (4) Glennon, C. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2005**, 41. “ Binding characteristics of σ_2 receptor ligands ”
- (5) Ablordeppey, Fischer, Glennon. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, 8, 2105-2111. “Is a Nitrogen Atom an Important Pharmacophoric Element in Sigma Ligand Binding?”
- (6) Crawford, Bowen. *Cancer Research* **2002**, 62,313-322. “Sigma-2 Receptor Agonists Activate a Novel Apoptotic Pathway and Potentiate Antineoplastic Drugs in Breast Tumor Cell Lines.”
- (7) Collina, Gaggeri, Marra, Bassi Negrinotti, Negri, Rossi. *University of Pavia, Department of Drug Science, Medicinal Chemistry and Pharmaceutical Thecnology*

Section, Pavia, Italy. 2013, 23, 597-613. “Sigma receptor modulators: a patent review”

(8) Mavlyutov, Epstein, Liu, Verbny, Ziskind- Conhaim, and Ruoho, *Neurosciences* **2012**, 206, 60-68. “Development of the sigma-1 receptor in C-terminals of motoneurons and colocalization with the N,N'-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-N-methyl transferase”

(9) Ortega-Roldan, J. L.; Ossa, F.; Schnell, J. R. *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 21448–21457. “Characterization of the Human Sigma-1 Receptor Chaperone Domain Structure and Binding Immunoglobulin Protein (BiP) Interactions”

(10) Mach, R. H.; Zeng, C.; Hawkins, W. G. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 7137–7160. “The σ_2 Receptor: A Novel Protein for the Imaging and Treatment of Cancer”

(11) Bowen, Bertha, Vilner, Rice. *European Journal of Pharmacology* 278 (1995) 257-260. “CB-64D and CB-184: ligand with high sigma-2 receptor affinity and subtype selectivity”

(12) Sikazwe, D. M. N.; Li, S.; Mardenborough, L.; Cody, V.; Roth, B. L.; Ablordeppey, S. Y. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 5739–5742. “Haloperidol: towards further understanding of the structural contributions of its pharmacophoric elements at D2-like receptors”

(13) Monnet, De Costa, Bowen, *Br. J. Pharm.* **1996**, 119,65-72 “Differentiation of

a ligand-activated receptor subtypes that modulate NMDA-evoked [3H]-noradrenaline release in rat hippocampal slices”

(14) Mamolo, M. G.; Zampieri, D.; Zanette, C.; Florio, C.; Collina, S.; Urbano, M.; Azzolina, O.; Vio, L. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 2073–2081. “Substituted benzylaminoalkylindoles with preference for the σ_2 binding site”

(15) Bangaru, Weihrauch, Tang, Zoga, Hogan, Wu, *Molecular Pain* **2013**, *9*, 47
“Sigma-1 receptor expression in sensory neurons and the effect of painful peripheral nerve injury”.

(16) Julius, Basbaum, *Nature* **2001**, 413. “Molecular mechanism of nociception”

(17) Trescot, Datta, Lee, Hansen, *Pain Physician* **2008**, “Opioid pharmacology”

(18) Marrazzo, A.; Parenti, C.; Scavo, V.; Ronsisvalle, S.; Scoto, G. M.; Ronsisvalle, G. *Life Sci.* **2006**, *78*, 2449–2453. “In vivo evaluation of (+)-MR200 as a new selective sigma ligand modulating MOP, DOP and KOP supraspinal analgesia”

(19) Vidal-Torres, A.; Puente, B. de la; Rocasalbas, M.; Touriño, C.; Bura, S. A.; Fernández-Pastor, B.; Romero, L.; Codony, X.; Zamanillo, D.; Buschmann, H.; Merlos, M.; Baeyens, J. M.; Maldonado, R.; Vela, J. M. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *711*, 63–72. “Sigma-1 receptor antagonism as opioid adjuvant strategy: Enhancement of opioid antinociception without increasing adverse effects”

- (20) Rossi, Marra, Picconi, Serra, Catenacci, Sorrenti, Laurini, Fermeiglia, Pricl, Brambilla, Almirante, Peviani, Curti, Collina; *Biorg. Med. Chem* **2013**, 21, 2577-2586
“Identification of RC-33 as a potent and select.”
- (21) Hyrskyluoto, A.; Pulli, I.; Törnqvist, K.; Ho, T. H.; Korhonen, L.; Lindholm, D. *Cell Death Dis.* **2013**, 4, 646. “Sigma-1 receptor agonist PRE084 is protective against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of calpastatin and the NF- κ B pathway”
- (22) Peviani, M.; Salvaneschi, E.; Bontempi, L.; Petese, A.; Manzo, A.; Rossi, D.; Salmona, M.; Collina, S.; Bigini, P.; Curti, D. *Neurobiol. Dis.* **2013**, 62, 218–232.
“Neuroprotective effects of the Sigma-1 receptor (S1R) agonist PRE-084, in a mouse model of motor neuron disease not linked to SOD1 mutation”
- (23) Huang, Y.-S.; Lu, H.-L.; Zhang, L.-J.; Wu, Z. *Med. Res. Rev.* **2013**.” Sigma-2 Receptor Ligands and Their Perspectives in Cancer Diagnosis and Therapy”
- (24) Abate, C.; Selivanova, S. V.; Müller, A.; Krämer, S. D.; Schibli, R.; Marottoli, R.; Perrone, R.; Berardi, F.; Niso, M.; Ametamey, S. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 69, 920–930. “Development of 3,4-dihydroisoquinolin-1(2H)-one derivatives for the Positron Emission Tomography (PET) imaging of σ 2 receptors”
- (25) Zeng, C.; Rothfuss, J.; Zhang, J.; Chu, W.; Vangveravong, S.; Tu, Z.; Pan, F.; Chang, K. C.; Hotchkiss, R.; Mach, R. H. *Br. J. Cancer* **2012**, 106, 693–701.” Sigma-2 ligands induce tumour cell death by multiple signalling pathways”

- (26) Iñiguez, M. A.; Punzón, C.; Nieto, R.; Burgueño, J.; Vela, J. M.; Fresno, M. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*. “Inhibitory Effects of Sigma-2 Receptor Agonists on T Lymphocyte Activation”
- (27) Xu, Zeng, Chu, Pan, Rothfuss, Zhang, Tu, Zhou, Zeng, Vangveravong, Johnston, Spitzer, Chang, Hotchkiss, Hawkins, Wheeler, Mach *Nat Commun.* ; *2*: 380
“Identification of the PGRMC1 protein complex as the putative sigma-2 receptor binding site”
- (28) Bali, N.; Morgan, T. E.; Finch, C. E. *Front. Neurosci.* **2013**, *7*. “Pgrmc1: new roles in the microglial mediation of progesterone-antagonism of estradiol-dependent neurite sprouting and in microglial activation”
- (29) Spirkosky, Melo, Crujic, Calounova, Lundequist, Wernersson, Pejler. *BioChem. Pharm.* **2012** , *84*, 1671-1680 “Mast cell apoptosis induced by siramesine, a sigma-2 receptor agonist.”
- (30) Česen, M. H.; Repnik, U.; Turk, V.; Turk, B. *Cell Death Dis.* **2013**, *4*, 818.
“Siramesine triggers cell death through destabilisation of mitochondria, but not lysosomes”
- (31) Li, S.; Zhang, Y.; Huang; Zhang; Gao; Gibbs *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *4473*. “Incorporation of a selective sigma-2 receptor ligand enhances uptake of liposomes by multiple cancer cells”

- (32) Cratteri, Romanelli, Cruciani, Bonaccini, Melani *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2004** 18: 361–374. “GRIND-derived pharmacophore model for a series of α -tropanyl derivative ligands of the sigma-2 receptor”.
- (33) Antonio, T.; Childers, S. R.; Rothman, R. B.; Dersch, C. M.; King, C.; Kuehne, M.; Bornmann, W. G.; Eshleman, A. J.; Janowsky, A.; Simon, E. R.; Reith, M. E. A.; Alper, K.; Seifert, R. *PLoS ONE* **2013**, 8, 77262. “Effect of Iboga Alkaloids on μ -Opioid Receptor-Coupled G Protein Activation”
- (34) Br. J. Anaesth.-2013-ibogaina.
- (35) O’Hearn, Molliver *J. Neurosc.* **1997**, 17(22), 8828-8841 “The Olivocerebellar Projection Mediates Ibogaine-Induced Degeneration of Purkinje Cells: A Model of Indirect, Trans-Synaptic Excitotoxicity.”
- (36) Mach, Smith, Childer, *Life Sciences* **1995** , 57, 57-62 “Ibogaine possesses a selective affinity for sigma-2 receptors.”
- (37) Bowen, Vilner, Williams, Bertha, Kuehne, Jacobson *Europ.of Pharm.* **1995** , 279, R1-R3 “Ibogaine and its congeners are sigma-2 receptor selective ligands with moderate affinity”
- (38) Berardi, Santoro, Perrone, Tortorella, Govoni, Lucchi. *J. Med. Chem* **1998** , 41,3940-3947 “N-[-(Tetralin-1-yl)alkyl] Derivatives of 3,3-Dimethylpiperidine Are

Highly.”

(39) Mésangeau, C.; Amata, E.; Alsharif, W.; Seminerio, M. J.; Robson, M. J.; Matsumoto, R. R.; Poupaert, J. H.; McCurdy, C. R. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5154–5161. “Synthesis and pharmacological evaluation of indole-based sigma receptor ligands”

(40) Perregaard, Moltzen, Meyer, Sanchez. *J. Med. Chem.* **1995** , *38*, 1998-2008.”sigma ligands with subnanomolar affinity and preference for sigma-2 binding site. 1.3(ω -aminoalkyl)-1H-indoles”

(41) Marrazzo, A.; Cobos, E. J.; Parenti, C.; Aricò, G.; Marrazzo, G.; Ronsisvalle, S.; Pasquinucci, L.; Prezzavento, O.; Colabufo, N. A.; Contino, M.; González, L. G.; Scoto, G. M.; Ronsisvalle, G. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3669–3673. “Novel Potent and Selective σ Ligands: Evaluation of Their Agonist and Antagonist Properties”

(42) Robaa, Enzensperger, Eldin Abulazm, Hefnawy, Subbagh, Wani, Lehmann, Supporting Information “Chiral Indolo[3,2-*f*][3]benzazecine-type Dopamine Receptor Antagonists - Synthesis and Activity of Racemic and Enantiopure Derivatives.”

(43) Heinzelman, Anthony, Lyttle, Szmuskovicz **1960** , *25* “The synthesis of α -methyl-triptophans and α -alkyl-triptamines”

(44) Willand, N.; Folléas, B.; Boutillon, C.; Verbraeken, L.; Gesquière, J.-C.; Tartar, A.; Deprez, B. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5007–5011.” Efficient, two-step

synthesis of N-substituted nortropinone derivatives”

(45) Laggner, C.; Schieferer, C.; Fiechtner, B.; Poles, G.; Hoffmann, R. D.; Glossmann, H.; Langer, T.; Moebius, F. F. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4754–4764. “Discovery of High-Affinity Ligands of σ_1 Receptor, ERG2, and Emopamil Binding Protein by Pharmacophore Modeling and Virtual Screening”

(46) Roh, Yoon, *Biol. Pharm. Bull.* **2013** , DOI:10.1248/bpb.13-00690 “Sigma-1 Receptor Antagonist, BD1047 Reduces Nociceptive Responses and Phosphorylation of p38 MAPK in Mice Orofacial Formalin Model”

(47) Diaz, Christmann, Fernández, Luengo, Bordas, Enrech, Carro, Pascual, Burgueño, Merlos, Benet-Buchholz, Ceroñ-Bertran, Ramírez, Reinoso, Fernándezde Henestrosa, Vela, Almansa, *J. Med.Chem.* **2013**, *56*, 3656–3665. “Synthesis and Biological Evaluation of a New Series of Hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]quinolines as Novel Selective σ_1 Receptor Ligands”