

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"



FACOLTA' DI FARMACIA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO
XXII CICLO

Progettazione e sintesi di nuovi ligandi
per i recettori della serotonina

Coordinatore

Prof. Maria Valeria D'Auria

Tutor

Prof. Elisa Perissutti

Candidata

Dott.ssa Francesca De Angelis

1. INTRODUZIONE

1.1 SEROTONINA

La serotonina (5-HT, 5-idrossitriptamina) isolata per la prima volta nel 1948 da cellule della mucosa gastrointestinale, è un'ammina biogena a basso peso molecolare che corrisponde chimicamente al 3-(β -amminoetil)-5-idrossi-indolo; essa fu inizialmente chiamata "enteramina", data la sua peculiare localizzazione. Solo agli inizi degli anni '60 si riuscì a dimostrare che la 5-HT, oltre ad agire a livello periferico, rappresenta anche un importante neurotrasmettitore coinvolto nella regolazione di fondamentali processi fisiologici e fisiopatologici.

Nell'uomo, la quantità di serotonina endogena si aggira intorno ai 10 mg, di cui il 90% circa è localizzato nelle cellule enterocromaffini del tratto gastrointestinale, l'8% nelle piastrine e il restante 2% è distribuito in diverse aree del SNC, dove funge da neurotrasmettitore [1].

La 5-HT viene sintetizzata a partire dall'aminoacido essenziale *triptofano* utilizzando due passaggi enzimatici. Il triptofano viene attivamente captato dalle cellule cerebrali attraverso un trasportatore in grado di trasportare anche altri aminoacidi di grosse dimensioni, neutri e con catene ramificate.

Il triptofano subisce ossidrilazione sull'anello indolico e successiva decarbossilazione dell'amminoacido. Il prodotto sintetizzato, la 5-HT, viene immagazzinato in granuli secretori da un trasportatore vescicolare; la 5-HT immagazzinata viene rilasciata attraverso esocitosi da neuroni serotoninergici.

Nel sistema nervoso, l'azione della 5-HT rilasciata viene terminata attraverso captazione neuronale mediata da un trasportatore specifico Na^+ -dipendente. Tale trasportatore è localizzato nella membrana delle terminazioni assoniche dei neuroni serotoninergici (dove si

esaurisce l'azione della 5-HT a livello della sinapsi) e a livello della membrana delle piastrine (dove avviene la captazione della 5-HT dal sangue).

La principale via metabolica della 5-HT coinvolge una deaminazione ossidativa per mezzo della monoamino-ossidasi (MAO), formando la 5-idrossiindolo-acetaldeide; l'aldeide viene trasformata in acido 5-idrossi-indolacetico (5-HIAA) da un enzima ubiquitario, l'aldeide deidrogenasi.

E' stata suggerita l'esistenza anche di altre vie minori di metabolizzazione della 5-HT, come la solfatazione e la O- e N-metilazione [2].

Relativamente alla sua localizzazione, studi sperimentali hanno evidenziato dettagli circa la distribuzione della serotonina nelle varie aree cerebrali, rivelando che essa è particolarmente concentrata a livello dell'ipotalamo, del mesencefalo e del sistema limbico [3].

Nell'ipotalamo, in particolare, le massime concentrazioni di 5-HT sono state individuate nell'eminenza mediana, nel nucleo arcuato, nel nucleo soprachiasmatico e nel nucleo preottico-soprachiasmatico [4].

Nel SNC le vie serotoninergiche presentano una distribuzione topografica analoga a quella delle vie noradrenergiche. I corpi cellulari, infatti, sono localizzati nel segmento inferiore del tronco encefalico (ponte bulbo), a livello dei nuclei del rafe. Da qui si dipartono sia vie ascendenti, che innervano aree corticali e sottocorticali, sia discendenti, che terminano nel midollo spinale [5-6].

Neuroni serotoninergici sono stati documentati in molte altre aree cerebrali: nel sistema extrapiramidale e nelle diverse aree deputate al controllo della funzione cardiovascolare. In particolare, le connessioni dei nuclei ad irradiazione serotoninergica, a partire dal tronco encefalico, appaiono ampie e molteplici, estendendosi dalle strutture

limbiche, alla corteccia cerebrale, al cervelletto, ecc. Oltre che nel sistema nervoso centrale, i neuroni serotoninergici sono presenti nelle stazioni gangliari, dove svolgono una funzione modulatoria sulla trasmissione nervosa verso lo stomaco, l'intestino, il cuore, i vasi, ecc. [7].

I metodi fluorimetrici, la cromatografia liquida e le tecniche d'immunoistochimica hanno dimostrato la presenza di grandi quantità di serotonina nei corpi carotidei di diverse specie animali, compreso l'uomo. Ricerche sperimentali su tessuti privati dei vasi hanno dimostrato che la serotonina può essere ricaptata, accumulata e rilasciata dalle terminazioni simpatiche. Nelle vescicole delle fibre simpatiche che raggiungono l'ipofisi, la serotonina è conservata insieme alla noradrenalina; ciò ha fornito la prima dimostrazione di come una cellula nervosa possa contenere più di un neurotrasmettitore. Resta da stabilire quale precisa influenza sulle attività vascolari abbia *in vivo* la serotonina accumulata ed eventualmente rilasciata dalle terminazioni simpatiche [8].

1.2 AZIONI CENTRALI E PERIFERICHE DELLA SEROTONINA

E' noto che la serotonina partecipa alla regolazione della liberazione di ormoni, particolarmente di quelli ipofisari, come l'ormone somatotropo, la prolattina, la corticotropina e la tireotropina. Sono noti, inoltre, effetti inibitori sul comportamento sessuale in parte dovuti a modulazione della produzione di ormoni sessuali.

La 5-HT sembra svolgere un'importante azione antinocicettiva a livello spinale, nonché un interessante ruolo di attivazione del sonno ed effetti sul controllo del vomito e dell'umore. E' ormai ben dimostrato il suo coinvolgimento, unitamente alle catecolamine e a numerosi peptidi, nella regolazione centrale delle sensazioni connesse all'assunzione del cibo; tuttavia non risulta perfettamente chiaro quale sia il sito o i siti in cui tale azione viene esplicitata [9].

La 5-idrossitriptamina partecipa anche ai meccanismi centrali di termoregolazione, nonostante il suo ruolo non sia perfettamente chiaro, tenuto conto che studi farmacologici mostrano effetti sia ipertermici che ipotermici, a seconda delle condizioni sperimentali adottate.

Infine, un'alterata regolazione della trasmissione serotoninergica incide su numerosi aspetti comportamentali e può risultare alla base di patologie neuropsichiatriche come ad esempio la schizofrenia, l'ansia, lo stress, la depressione. Per questo motivo, molte sostanze che modulano il sistema serotoninergico sono alla base dei trattamenti farmacologici per queste malattie [10-12].

Gli effetti periferici prodotti da dosi farmacologiche di tale ammina sono complessi, essendo la risultante sia di azioni dirette che mediate dalla modulazione di altri neurotrasmettitori come la noradrenalina e l'acetilcolina. In particolare, alcuni degli effetti farmacologici della serotonina sono: aumento della motilità dell'intestino tenue, riduzione di quella dello stomaco e del colon, broncocostrizione, contrazione dell'utero e aumento della frequenza respiratoria.

Inoltre, stanno emergendo evidenze di un coinvolgimento di questo neurotrasmettitore in patologie come la sindrome di Down, l'autismo, il morbo di Alzheimer, l'epilessia e il cancro.

Infatti, recentemente è stato riscontrato che la serotonina viene prodotta in eccesso dalla maggior parte dei tumori carcinoidi, per cui la misura dell'escrezione di uno dei suoi principali metaboliti, quale l'acido 5-idrossi-indolacetico, nelle 24 ore può essere usata come test diagnostico per questo tipo di patologia.

La serotonina ematica, quella depositata nelle terminazioni simpatiche della parete vascolare e quella impegnata nella neurotrasmissione fra le aree centrali deputate al controllo

delle funzioni cardiovascolari, interviene attivamente nella regolazione delle variabili cardiache e vascolari. E' stato, infatti, ampiamente documentato che la serotonina partecipa, tramite il suo complesso sistema recettoriale, nella regolazione del tono vasale, della permeabilità capillare, dell'emostasi e dell'aggregazione piastrinica. Quindi, la serotonina svolgerebbe un ruolo importante in diverse condizioni patologiche che colpiscono l'apparato cardiovascolare.

Nell'uomo l'azione della serotonina sul circolo è variabile, considerando che l'attivazione dei meccanismi serotoninergici può causare sia vasodilatazione a livello dei muscoli scheletrici sia potente vasocostrizione [13].

La serotonina è in grado di indurre vasodilatazione non solo mediante liberazione dalle cellule endoteliali di EDRF (Endothelium derived releasing factor) e prostaciclina (PGI₂) ma anche mediante stimolazione dei recettori 5-HT₁ sulle terminazioni nervose simpatiche, a livello della muscolatura liscia di alcuni vasi, con conseguente inibizione della liberazione di noradrenalina [14].

La 5-idrossitriptamina determina, invece, vasocostrizione mediante i seguenti effetti:

- azione diretta sui recettori 5-HT₂ della muscolatura liscia vascolare;
- amplificazione degli effetti di altri agonisti vasocostrittori come la noradrenalina, l'istamina e l'angiotensina II;
- stimolazione del rilascio di noradrenalina dalle terminazioni adrenergiche.

La serotonina induce una triplice risposta sulla pressione arteriosa:

- 1) iniziale transitoria ipotensione, sostenuta dalla stimolazione dei recettori 5-HT₃;
- 2) fase ipertensiva, dovuta all'effetto diretto della serotonina sui vasi con l'aumento delle resistenze periferiche e dell'output cardiaco, mediata dai recettori 5-HT₂;
- 3) fase ipotensiva finale, sostenuta dalla vasodilatazione muscolare scheletrica e

dall'inibizione dei riflessi vagali, mediata dai recettori 5-HT₁.

Sul cuore, invece, la serotonina, sintetizzata anche in situ, esercita effetti inotropi e cronotropi positivi mediati dai recettori 5-HT₁.

E' probabile che la 5-HT che viene captata dal sangue e trasportata nelle piastrine sia coinvolta nell'aggregazione e nel processo di emostasi [1,3].

Concludendo, possiamo affermare che il sistema serotoninergico dei vertebrati è in grado di influenzare quasi tutte le funzioni fisiologiche dei mammiferi, dalla regolazione del sistema cardiovascolare, della respirazione e del sistema gastrointestinale alla termoregolazione. Inoltre, è coinvolto nel mantenimento del ritmo circadiano e nel controllo dell'appetito, dell'aggressività, del comportamento sessuale, dell'umore, dell'apprendimento, della memoria, del sonno e della sensibilità al dolore. Dato il suo coinvolgimento in un così ampio numero di funzioni fisiologiche, è facile dedurre che la serotonina sia anche coinvolta in un altrettanto ampio numero di processi patologici.

1.3 RECETTORI SEROTONINERGICI

La grande varietà di funzioni in cui abbiamo visto essere implicata la serotonina si riflette nella complessità farmacologica dei suoi recettori.

Come dimostrato sperimentalmente, l'effetto stimolante o inibente della 5-HT nei vari distretti dell'organismo è in relazione al sito e al tipo di recettore 5-HT interessato. La più recente classificazione dei recettori serotoninergici, proposta dalla IUPHAR nel 1998 e tutt'oggi ancora attuale, suggerisce la suddivisione in base alle caratteristiche farmacologiche, strutturali e trasduzzionali in sette classi: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇; a ciascun tipo di recettore appartengono diversi sottotipi recettoriali, distinguibili a loro volta dal punto di vista farmacologico e molecolare (Tabella 1) [15].

Tabella 1 - Caratteristiche dei recettori serotoninergici.

Nome	Effettore	Distribuzione	Agonista*	Antagonista	Patologia**
5-HT _{1A}	G _i /G _o cAMP↓ PLC ↑ Canali k ⁺	Ippocampo, setto, terminali nervosi Amigdala, Rafe, plesso mioenterico	8-OH-DPAT Buspirone	WAY100135 Metotiepina Spiperone	Ansia, ipertensione (?)
5-HT _{1B}	G _i /G _o cAMP↓ PLC ↑	Striato, Ippocampo, S. nigra, vasi terminali sinaptici del sistema autonomo	CP93129 L694247 RU24969	GR5562 Cianopindolo Metotiepina SB224289	Aggressività (?) Ansietà Depressione
5-HT _{1D}	G _i /G _o cAMP↓ PLC ↑	Striato, Accumbens Ippocampo, Rafe, n. della base, ganglio trigemino, muscolatura vasale	Sumatriptan L694247 Naratriptan	GR127935 BRL15572 Metotiepina	Emicrania Depressione Vasculopatie
5-HT _{1E}	G _i /G _o cAMP↓	Caudato, Putamen, Amigdala, Corteccia	----	----	----
5-HT _{1F}	G _i /G _o cAMP↓	Corteccia, Talamo, bulbo olfattorio, midollo spinale, utero, mesenteri	L7334370 LY344864	----	Emicrania
5-HT _{2A}	G _q /G ₁₁ PLC ↑	Corteccia, Ippocampo, bulbo olfattorio, midollo spinale, sist. gastrointestinale, musc. vasale e bronchiale, endotelio, piastrine	α-metil-5-HT DOI, DOB, Quipazina	Ritanserina Ketanserina Ciproptadina Trazodone Risiperidone Clozapina Metiserigide SB204741	Ipertensione Alterazione motilità intestinale
5-HT _{2B}	G _q /G ₁₁ PLC ↑	Muscolatura ileale, stomaco, utero, vasi, endotelio	BW723686	SB204741	----
5-HT _{2C} ***	G _q /G ₁₁ PLC ↑	Plessi coroidei, Ponte, Striato, Ippocampo, Ipotalamo, endotelio, midollo spinale	α-metil-5-HT	Mesulergina	Emicrania
5-HT ₃	Canale cationico	Striato, Ippocampo, S. nigra, gangli simpatici, neuroni sensitivi	2-metil-5-HT m-clorofenil-biguanide	Tropisetron Ondansetron Granisetron	Vomito
5-HT ₄	G _s cAMP↑ Canali del Ca ⁺⁺ ↑ Canali K ⁺ ↓	Striato, Talamo, Ippocampo, bulbo olfattorio, plesso mioenterico, musc. esofagea e vasale	BIMU8 RS67506 Renzapide Cisapride	GR113808 SB207226 RS100235	----
5-HT _{5A}	G _s cAMP↑	Ippocampo, Corteccia, Cervelletto, Abenula, midollo spinale	----	----	----
5-HT _{5B}	----	Ippocampo, Corteccia, Cervelletto, bulbo olfattorio, midollo spinale	----	----	----
5-HT ₆	G _s cAMP↑	Caudato, Putamen, Accumbens, Corteccia, Ippocampo, ganglio cervicale sup.	----	Ro046790	Psicosi ?
5-HT ₇	G _s cAMP↑ Canali Ca ⁺⁺ ↑	Ippocampo, Ipotalamo, Talamo, Collicolo sup., Rafe, gangli simpatici. Musc. vasale e intestinale	8-OH-DPAT 5-CT	SB258719 Clozapina	Ipertensione

* Agonisti ed antagonisti con maggiore selettività; la maggior parte di questi farmaci è in fase sperimentale.

** Vengono indicate le principali applicazioni cliniche dei farmaci attivi sul sottotipo recettoriale.

*** Il recettore 5-HT_{2C} era precedentemente chiamato 5-HT_{1C}.

Le famiglie dei recettori 5-HT₁, 5-HT₂ e 5-HT₄₋₇ fanno parte della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (*G protein coupled receptor*, *GPCR*). Il recettore 5-HT₃, invece, è un canale ionico operato da ligando che permette il flusso di Na⁺ e K⁺.

1.4.1 Recettori 5-HT₁

Tutti i recettori 5-HT₁ finora individuati mostrano alcune caratteristiche comuni nei loro siti di legame, come la presenza di sette domini transmembranari e l'accoppiamento negativo all'adenilato ciclasi attraverso proteine G inibitorie. Tra questi, il recettore 5-HT_{1A} attiva anche un canale per il K⁺ recettore-dipendente e inibisce un canale per il Ca²⁺ voltaggio-dipendente [2].

Tutti i recettori 5-HT₁ regolano essenzialmente le seguenti funzioni:

- 1 - inibizione nel sistema nervoso della liberazione di noradrenalina, serotonina e acetilcolina;
- 2 - influenza su alcune funzioni controllate dal SNC quali il comportamento, l'attività cardiovascolare e gastrointestinale;
- 3 - vasodilatazione a livello cardiovascolare (solo in rari casi vasocostrizione) con ipotensione arteriosa, aumento del flusso aortico e tachicardia.

Considerando nello specifico i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, essi si trovano in aree del SNC che fanno parte del sistema limbico o che comunque sono coinvolte nella modulazione delle emozioni [16]; dunque, gli effetti riferiti alla serotonina sui meccanismi emozionali potrebbero essere mediati dai recettori 5-HT_{1A}. I sottotipi recettoriali 5-HT_{1A} agiscono come autorecettori somatodendritici inibitori sui corpi cellulari dei neuroni serotoninergici e, in quanto tali, modulano l'attività dei neuroni serotoninergici stessi nei nuclei del rafe e sono coinvolti nelle funzioni dell'ipotalamo, nella regolazione della

propriocezione e nelle funzioni integrative della neocorteccia. Gli agonisti dei recettori 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, buspirone) causano iperfagia e stimolano l'attività locomotoria [17-18].

Gli agonisti parziali dei 5-HT_{1A} post-sinaptici dell'ippocampo hanno proprietà ansiolitica. Tale proprietà è dimostrata dagli azaspirodecandioni (buspirone, gepirone e ipsapirone) [18-20] che, in questo senso, hanno un'efficacia paragonabile a quella delle benzodiazepine. Dati clinici, inoltre, suggeriscono un'addizionale attività antidepressiva. Alcuni agonisti dei recettori 5-HT_{1A} centrali quali 8-OH-DPAT, urapidile e 5-metilurapidile sono usati come anti-ipertensivi [19].

1.4.2 Recettori 5-HT₂

Riguardo ai recettori 5-HT₂, essi producono un aumento dell'idrolisi del fosfatidilinositolo mediante accoppiamento a proteine G_q e, fino a poco tempo fa, non esistevano prove a sostegno della loro eterogeneità. Tali recettori, particolarmente diffusi sia a livello centrale che periferico, mediano molte delle azioni della 5-HT. L'elevato grado di omologia tra i recettori 5-HT_{1C} e 5-HT₂, insieme ad un comune sistema di trasduzione (ciclo del fosfatidilinositolo), ha indotto a considerare il recettore 5-HT_{1C} come un sottotipo recettoriale 5-HT₂. Infatti, secondo il più recente sistema di nomenclatura, i 5-HT_{1C} sono ora definiti come 5-HT_{2C}, mentre i "classici" recettori 5-HT₂ e 5-HT_{2F} sono chiamati rispettivamente 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}.

I recettori 5-HT_{2A} sono ampiamente distribuiti nel SNC, soprattutto nelle zone di terminazione degli assoni serotonergici. In particolare, si sono trovate alte concentrazioni di recettori 5-HT_{2A} nella corteccia prefrontale, parietale e somato-sensoriale e nel claustrum. Inoltre, tale sottotipo recettoriale è anche largamente distribuito nei tessuti periferici e nelle piastrine [2].

La stimolazione dei sottotipi recettoriali 5-HT_{2A} [20-21] media le seguenti azioni farmacologiche:

- 1 - depolarizzazione di motoneuroni nel sistema nervoso;
- 2 - vasocostrizione;
- 3 - contrazione della muscolatura liscia gastrointestinale, bronchiale, urogenitale;
- 4 - attivazione dell'aggregazione piastrinica e aumento della permeabilità capillare.

Gli antagonisti dei recettori 5-HT_{2A} (ketanserina, pirenperone e spiperone), che agiscono anche su recettori non serotonergici come l' α -adrenocettore, il recettore istaminergico, dopaminergico e muscarinico, sono usati nella terapia dell'ipertensione. La ketanserina è anche in grado di inibire la broncocostrizione da adenosina. I bloccanti 5-HT_{2A} potrebbero essere utili anche nel trattamento dei disturbi psicotici. Recenti studi hanno, inoltre, dimostrato il coinvolgimento dei recettori 5-HT_{2A} nelle linee cellulari del carcinoma della mammella sottolineando la necessità di antagonisti altamente selettivi per tale sottotipo recettoriale [22].

I recettori 5-HT_{2B} furono inizialmente identificati nel fondo dello stomaco. In ogni caso, le conoscenze relative a tale sottotipo recettoriale sono alquanto limitate.

I sottotipi recettoriali 5-HT_{2C} si trovano soprattutto nel SNC e sono localizzati, in massima parte, nelle cellule epiteliali del plesso coroideo, che è il sito primario della produzione di liquido cerebrospinale. Si ipotizza, infatti, che i recettori 5-HT_{2C} siano capaci di regolare la composizione ed il volume del fluido cerebrospinale. Il recettore 5-HT_{2C} è stato, inoltre, implicato nel controllo dei comportamenti alimentari e nella propensione a sviluppare convulsioni. Tuttavia, la mancanza di agonisti ed antagonisti specifici per questi recettori, limita fortemente le conoscenze sul ruolo funzionale dei recettori 5-HT_{2C}. L'attivazione dei recettori 5-HT_{2A} potrebbe essere mediata dalla stimolazione dei 5-HT_{2C}, a causa delle

somiglianze strutturali tra i due recettori [2].

Gli agonisti, come mCPP, inducono ipolocomozione e ipofagia.

Gli antagonisti, quali la metisergide, sono usati nel trattamento delle cefalee di origine vascolare. Recentemente gli antagonisti 5-HT_{2C} sono stati proposti come potenziali ansiolitici.

1.4.3 Recettori 5-HT₃

Il recettore 5-HT₃ è assai particolare poiché è l'unico esempio di recettore per un trasmettitore monoaminico che funziona come canale ionico attivato da un ligando [2]. Questi recettori sono localizzati sulle terminazioni parasimpatiche nel tratto gastrointestinale, nelle afferenze vagali e splancniche, mentre, a livello del SNC, si trovano prevalentemente nel nucleo del tratto solitario e nell'area postrema. I recettori 5-HT₃, presenti sia nel canale gastroenterico che nel SNC, sono coinvolti nella risposta emetica.

1.4.4 Recettori 5-HT₄

I recettori 5-HT₄ sono accoppiati alla proteina G_s per attivare l'adenilato ciclasi, producendo così un aumento dei livelli intracellulari di AMP ciclico. Essi sono ampiamente diffusi in tutto il corpo. In particolare, a livello del SNC si ritrovano nei neuroni dei collicoli superiore e inferiore e nell'ippocampo, mentre nel canale gastroenterico sono localizzati nei neuroni del plesso mesenterico, sui muscoli lisci e sulle cellule secretorie. Si pensa che nel canale digerente il recettore 5-HT₄ sia in grado di evocare la secrezione e facilitare il riflesso peristaltico. Agonisti di tali recettori potrebbero essere utilizzati per il trattamento di disturbi gastrointestinali [2].

Una ricerca recente identifica la serotonina come neurotrasmettitore coinvolto nella proliferazione di alcuni tumori. In particolare, i recettori 5-HT₄, unitamente ai sottotipi

recettoriali 5-HT₁ e 5-HT₂, sono stati identificati nelle linee cellulari del carcinoma prostatico e la loro stimolazione è correlata ad una attività di promozione della crescita e possono essere funzionalmente correlati agli oncogeni [23-24].

1.4.5 Altri recettori

Relativamente alle altre classi di recettori serotoninergici, 5-HT₅, 5-HT₆ e 5-HT₇, i dati a nostra disposizione, insieme anche all'assenza di ligandi selettivi, non sono attualmente sufficienti a definirne le funzioni e i meccanismi di trasduzione del segnale.

Tra i vari sottotipi recettoriali serotoninergici, la maggiore attenzione è stata fino ad ora rivolta ai sottotipi 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, in quanto le funzioni di tali recettori risultano essere più chiare e definite e più chiaro è anche il loro coinvolgimento in patologie soprattutto a carico del SNC. Ciò ha permesso di individuare un considerevole numero di composti (agonisti, agonisti parziali e antagonisti dei sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}) appartenenti a differenti classi chimiche che si sono dimostrati utili nella terapia dell'ansia [25-26], della depressione [27-28], della nausea e del vomito [29-30], dell'Alzheimer [31], del cancro della prostata [23-24], dell'ipertensione [32-33] e dell'alcolismo [34].

In ogni caso, la farmacologia dei recettori serotoninergici è relativamente giovane ed in continuo sviluppo e pochi sono comunque i farmaci attualmente in commercio (esempi in Tabella 2) che sono attivi a livello recettoriale e la loro specificità è relativamente bassa a causa soprattutto dell'elevata omologia strutturale tra i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} ed altri recettori, quali quelli dopaminergici D₁ e D₂ ed adrenergici α_1 ed α_2 .

Tabella 2 – Principali sostanze farmaceutiche attive sul sistema serotonergico.

Sostanza farmaceutica	Principale indicazione clinica	Probabile meccanismo d'azione
Buspirone	Ansiolitico	Agonista parziale 5-HT_{1A}/antagonista D₂
Cisapride Alizapride Bromapride	Disturbi motilità Gastrointestinale	5-HT₄/antagonista 5-HT₃
Mianserina	Antidepressivo	Antagonista non selettivo
Almotriptan Naratripan Rizatriptan Sumatriptan Zolmitriptan	Anti emicrania	Agonisti 5-HT₁
Metisergide	Anti emicrania	Antagonista 5-HT₂ Agonista 5-HT_{1D} non selettivo
Ketanserina	Anti-ipertensivo	Antagonista 5-HT₂ α_1-adrenergico
Ondansetron Dolasetron Granisetron Tropisetron	Antiemetico	Antagonista 5-HT₃
Fenfluramina	Terapia obesità	Agonista indiretto
Reserpina	Anti-ipertensivo neurolettico	Inibizione accumulo vescicolare (non specifico per 5-HT)
Citalopram Fluoxamina Fluoxetina Paroxetina Sertalina	Antidepressivi	Inibitori selettivi della ricaptazione
Amitriptilina	Antidepressivo	Inibizione della ricaptazione (non specifico per 5-HT)
Isocarboxazide Nialamide Feneizina	Antidepressivi	Inibitori MAO non selettivi
Moclobemide tolaxatone	Antidepressivi	Inibitori MAO A

2. IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

In considerazione delle innumerevoli potenzialità terapeutiche derivanti da composti in grado di interagire con i recettori serotoninergici e in considerazione del fatto che, come già detto precedentemente, al momento i farmaci attivi sul sistema serotoninergico sono non solo relativamente pochi ma anche scarsamente selettivi, la ricerca in tale settore è ancora più che mai viva e attiva.

Il gruppo di ricerca con il quale ho svolto il mio lavoro di dottorato è impegnato da diversi anni in un filone di ricerca che ha come obiettivo principale la progettazione e la sintesi di nuove molecole dotate non solo di affinità, ma anche di selettività, nei confronti dei sottotipi recettoriali serotoninergici di interesse 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. Sono state, infatti, sintetizzate diverse serie di composti, a nucleo benzotriazolico [35], benzoiltriazolico [36], benzotriazinonico [37-38], idrossibenzotriazinonico, saccarinico [39-40] ed N-idrossinorbornenico [41].

Tutti i composti sintetizzati sono accomunati dalla presenza di una struttura generale (Figura 1) caratterizzata da un anello 4-fenilpiperazinico variamente sostituito (R') legato attraverso una catena polimetilenica di lunghezza variabile (n) ad un nucleo eterociclico (R). Tutti questi elementi, così come confermato da dati presenti in letteratura [35-41], sembrano modulare in modo particolare l'affinità e selettività nei confronti del sottotipo recettoriale 5HT_{1A} [42].

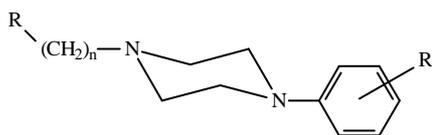
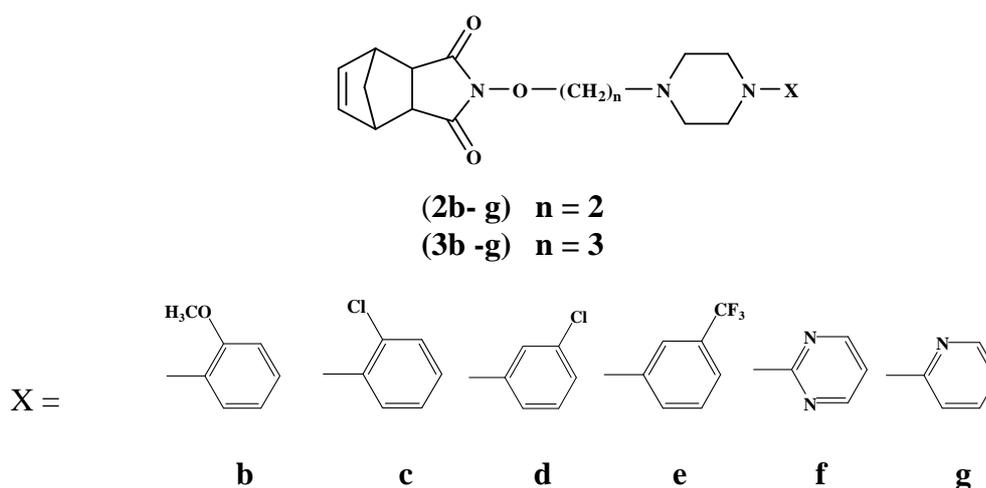


Figura 1. Struttura generale dei composti arilpiperazinici.

Nell'ambito dell'ultima serie di composti sintetizzati, a nucleo N-idrossinorbornenico [41] (Schema 1), sottoposti a sperimentazione farmacologica attraverso saggi di *binding*, sono stati riscontrati numerosi derivati con interessanti profili di affinità e selettività per i recettori 5-HT_{1A}. Tra questi il più attivo è risultato il composto caratterizzato da una catena alchilica spaziatrice a tre termini tra il nucleo N-idrossinorbornenico e quello piperazinico e dalla presenza in posizione 4- della piperazina di un anello fenilico orto metossi sostituito (composto **3b**). Tale derivato, infatti, ha esibito un valore della costante di inibizione K_i per il sottotipo recettoriale 5HT_{1A} pari a 0,021 nM, mentre nessuna affinità è stata esibita nei confronti degli altri due recettori serotoninergici 5HT_{2A} e 5HT_{2C}.



Schema 1. Derivati N-idrossinorbornenici [41].

Per questa serie di derivati, al fine di meglio interpretare i dati relativi ai saggi di affinità recettoriale, sono stati anche effettuati studi di *molecular modeling* mediante l'utilizzo del programma DISCOVER su un computer Silicon Graphics O2 R5000. I risultati hanno evidenziato che il composto di maggiore interesse (**3b**) riesce a formare un legame idrogeno addizionale con l'Asn 386 situata nel sito di legame del recettore grazie all'ideale lunghezza

della catena alchilica (Figura 2). Questo risultato spiega la differenza di affinità rispetto al congener **2b** con una catena alchilica a due atomi di carbonio.

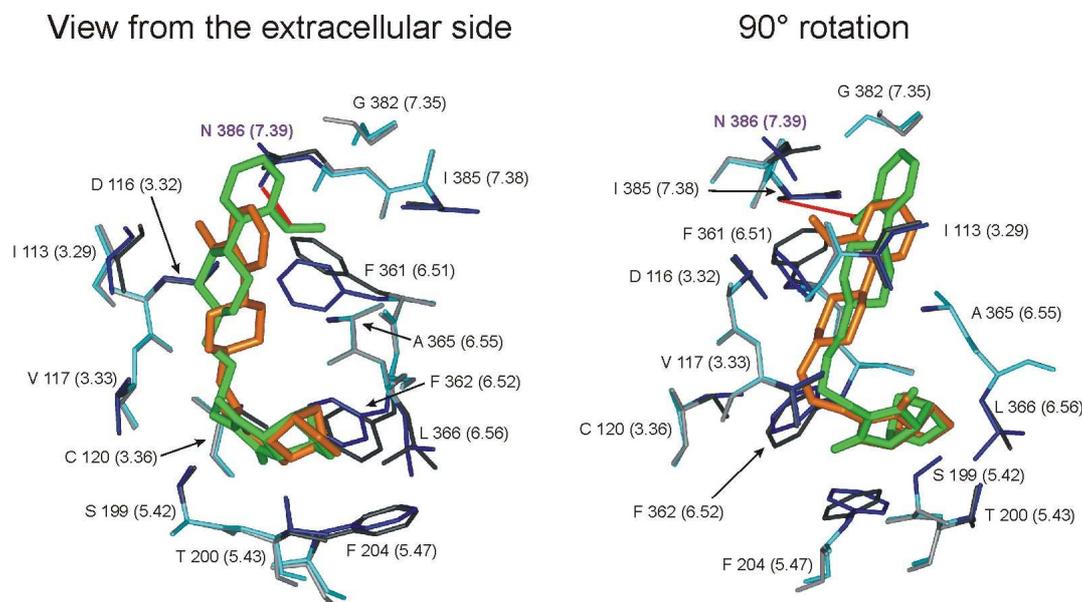
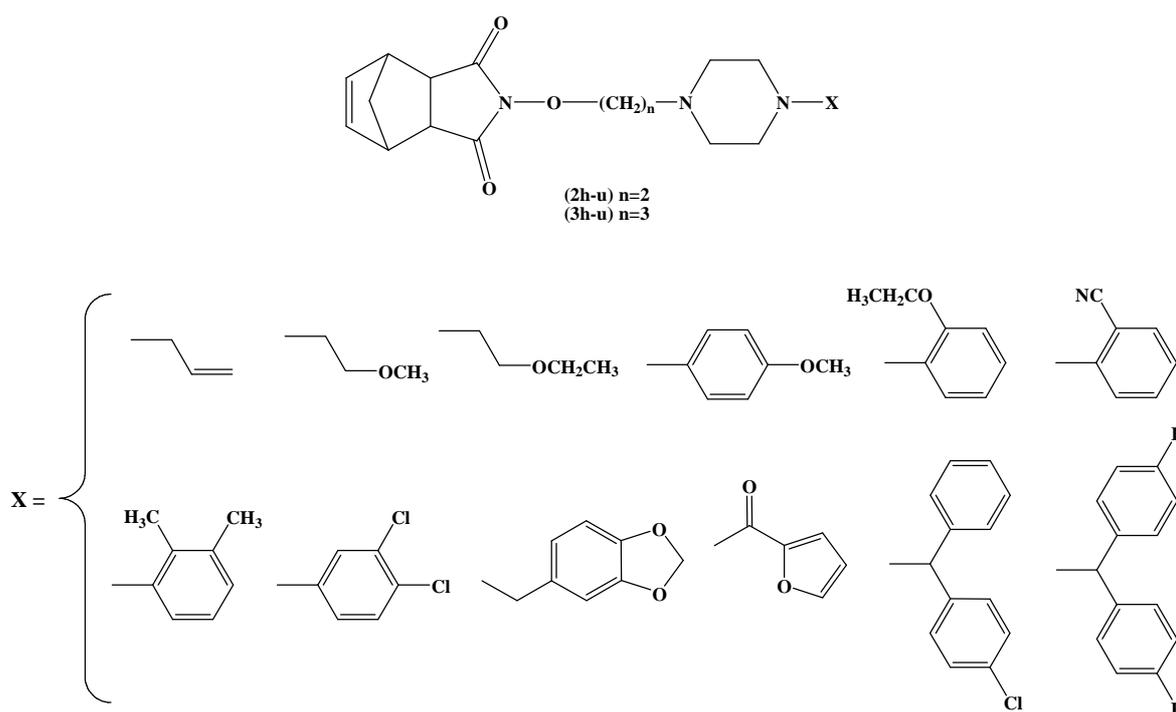


Figura 2. Visione dettagliata del sito di legame. Il complesso 5HT_{1A} / **3b** è mostrato in blu (recettore) e in verde (**3b**). Sono mostrati solo i residui amminoacidici del recettore 5HT_{1A} che hanno una distanza inferiore ai 3 Å dal ligando **3b**. Il complesso 5HT_{1A} / **2b** è colorato in grigio (recettore) e in arancio (**2b**). Il backbone peptidico è rappresentato in grigio chiaro o in blu chiaro, mentre le catene laterali con colori scuri. La linea rossa segna il legame idrogeno tra Asn-386 (7.39) e il ligando **3b**.

La valutazione dei risultati ottenuti per questi composti precedentemente sintetizzati a nucleo N-idrossinorbornenico, sia per quanto riguarda i saggi di affinità recettoriale sia per gli studi di *Molecular Modeling*, ha permesso di tracciare un valido profilo per le relazioni struttura-attività, in quanto ha dimostrato l'importanza sia della lunghezza della catena alchilica che del sostituito in posizione -4 dell'anello piperazinico per l'interazione con i recettori 5-HT_{1A}.

Da un'opportuna analisi retrospettiva e sulla base dei dati già presenti in letteratura, al fine di ampliare ulteriormente gli studi di relazione struttura-affinità tesi a chiarire quelli che

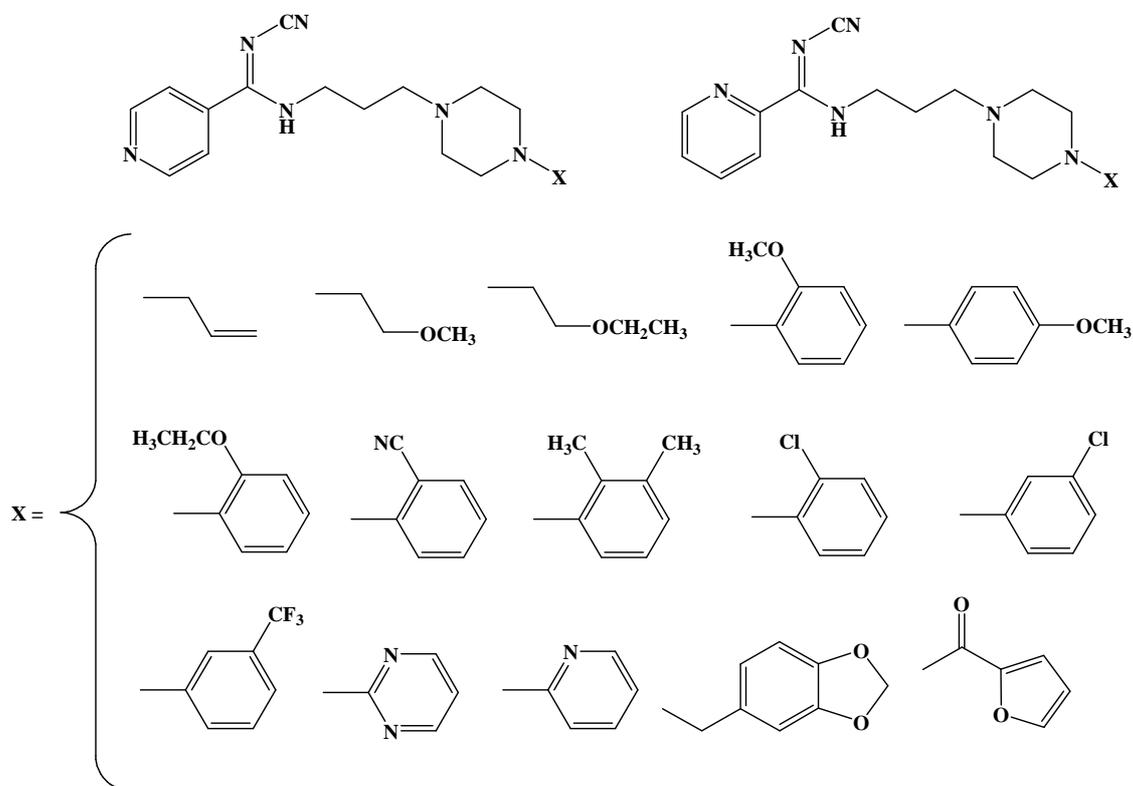
sono i requisiti strutturali per un'ottimale affinità di legame e una maggiore selettività, il progetto di ricerca ha previsto dapprima la sintesi di molecole che vanno ad ampliare la serie N-idrossinorbornenica (**2h-u** e **3h-u**) [43]. Tali composti sono caratterizzati dalla presenza in posizione -4 dell'anello piperazinico di nuovi sostituenti, sia di natura alifatica che aromatica, con diverse proprietà steriche, elettroniche e lipofile (Schema 2).



Schema 2. Derivati N-idrossinorbornenici [43].

Parallelamente al completamento della serie N-idrossinorbornenica, sono state progettate e sintetizzate due nuove serie di derivati caratterizzati dalla presenza di un diverso nucleo eterociclico: l'N'-cianoisonicotinamidinico e l'N'-cianopicolinamidinico. La diversa posizione dell'azoto eterociclico in tali nuclei potrebbe determinare una diversa interazione dei gruppi elettron-donatori, supportati dall'anello eterociclico, con il sito recettoriale.

I nuclei N'-cianoisonicotinamidinico ed N'-cianopicolinamidinico sono legati, attraverso una catena alchilica a tre atomi di carbonio (lunghezza che nella prima serie N-idrossinorbornenica aveva fornito i migliori risultati di affinità recettoriale), ad un anello piperazinico supportante gli stessi sostituenti della serie completa degli N-idrossinorbornenici, fatta eccezione per i sostituenti diarilici (Schema 3).



Schema 3. Derivati N'-cianoisonicotinamidinici ed N'-cianopicolinamidinici.

Idonee procedure di sintesi, purificazione e caratterizzazione hanno portato all'ottenimento di tutti i derivati oggetto del progetto di ricerca (Schema 2 e 3). Tutti i

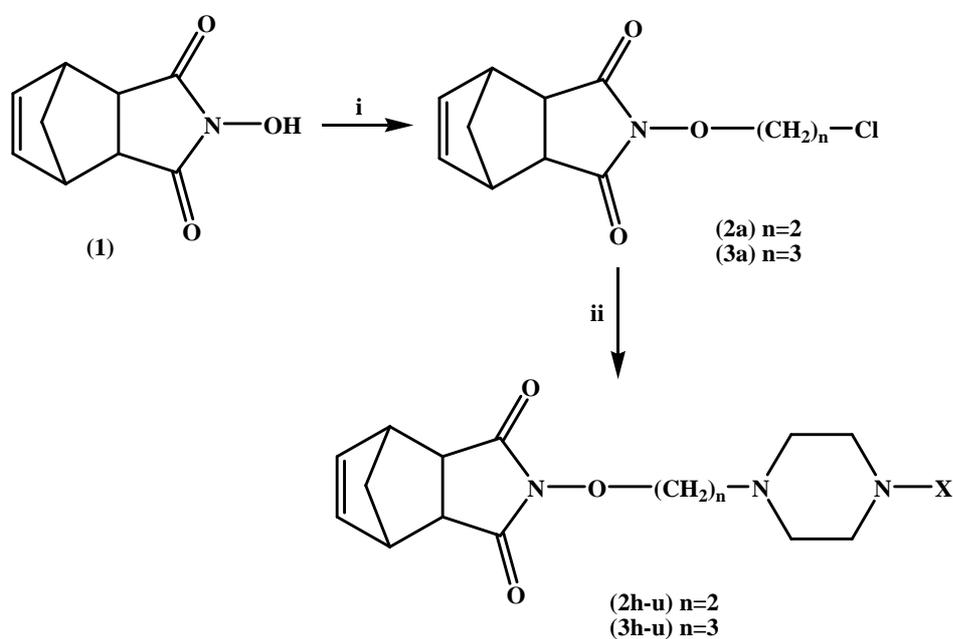
composti sintetizzati sono stati sottoposti a saggi di *binding* con radioligandi al fine di valutarne l'affinità verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. In ciascuna serie, inoltre, per i composti che si sono rivelati più interessanti è stata valutata anche l'affinità verso i recettori dopaminergici D₁ e D₂ ed i recettori adrenergici α_1 e α_2 .

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. SOMMARIO DELLE OPERAZIONI

3.1.1 DERIVATI A NUCLEO N-IDROSSINORBORNENICO

La preparazione dei derivati (**2h-u** e **3h-u**) è stata effettuata seguendo le tappe illustrate nello Schema 4.



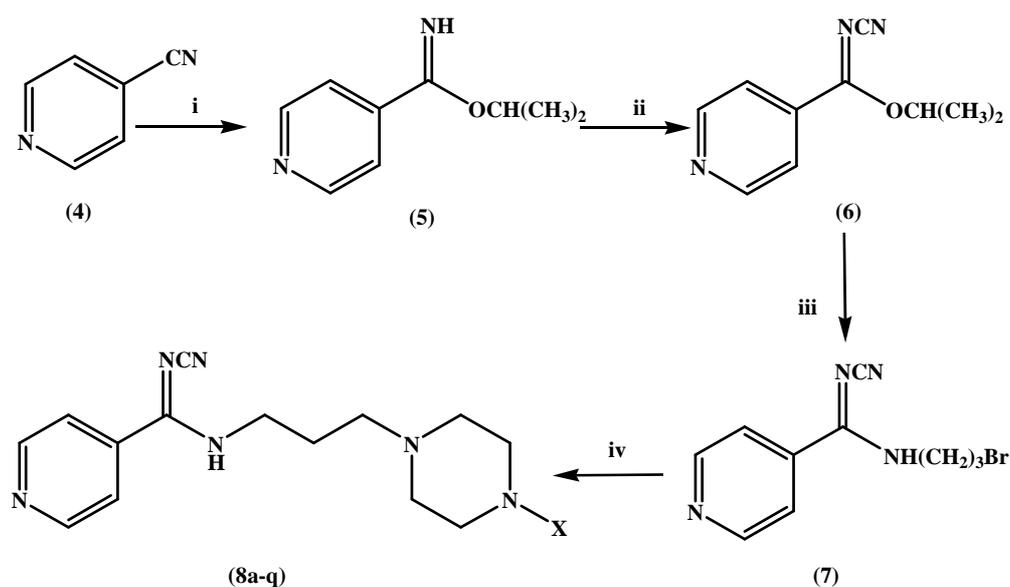
Schema 4. Reagenti e condizioni: (i) $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{Cl}$, NaOH, EtOH assoluto, 70°C , 24 h; (ii) piperazina-4-X-sostituita, K_2CO_3 , NaI, CH_3CN , riflusso, 24 h.

Il nucleo di partenza l'endo,cis-N-idrossi-5-norbornene-2,3-dicarbossimide (**1**) viene alchilato con 1-bromo-2-cloroetano e 1-bromo-3-cloropropano, in presenza di NaOH in etanolo assoluto, a 70°C per 24 ore, per fornire i corrispondenti 2-cloro-etilossi (**2a**) o 3-cloropropilossi (**3a**) derivati. Successivamente gli intermedi così ottenuti vengono condensati

con le opportune piperazine N-sostituite, in presenza di K_2CO_3 , NaI in acetonitrile. I prodotti finali **2h-u** e **3h-u** sono stati ottenuti con una resa compresa tra il 45 e il 75% dopo essere stati isolati mediante cromatografia su colonna di gel di silice e purificati mediante cristallizzazione da dietilere/etanolo e caratterizzati mediante 1H -NMR, ^{13}C -NMR e ESI-MS.

3.1.2 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOISONICOTINAMIDINICO

La preparazione dei derivati (**8a-t**) è stata effettuata seguendo le tappe illustrate nello Schema 5.



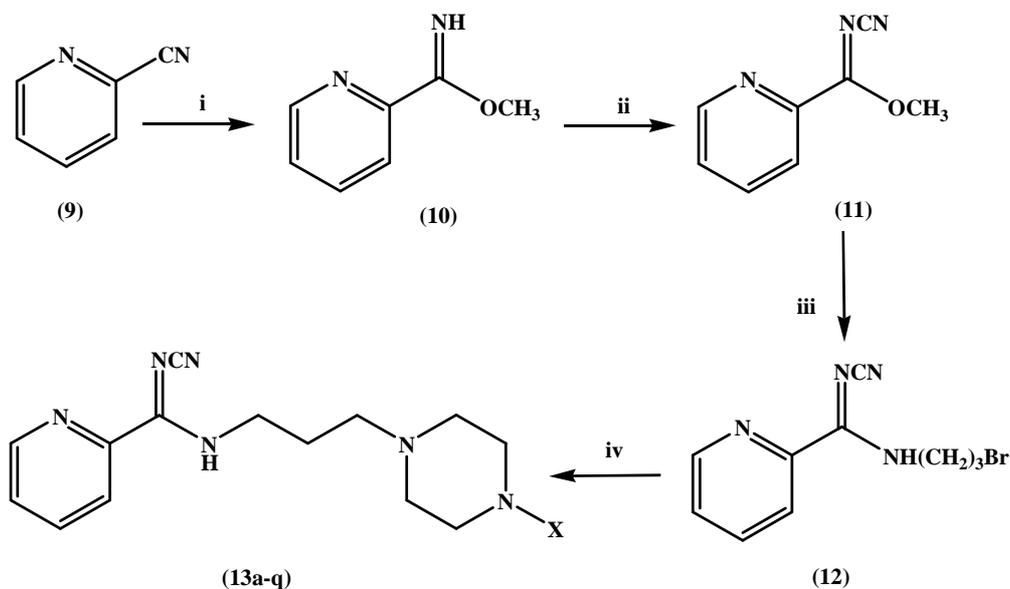
Schema 5. Reagenti e condizioni: (i) CH_3ONa , H_2NCN , $iPrOH$; (ii) $Br(CH_2)_3NH_2 \cdot HBr$, CH_3ONa , CH_3OH anidro; (iii) Piperazine-4-X-sostituite, K_2CO_3 , NaI, CH_3CN , $70^\circ C$, 4 h.

Il composto di partenza, la 4-cianopiridina (**4**), viene trattato con isopropanolo in presenza di sodio metossido e successivamente con NH_2CN in tampone fosfato per fornire il derivato (**6**). Questo viene fatto reagire con la 3-bromo-propilammina bromidrato in presenza di metossido di sodio in metanolo anidro. L'-N-(3-bromopropil)-N'-cianoisonicotinamidina

così ottenuta (**7**) viene condensata con le opportune piperazine N-sostituite in presenza di K_2CO_3 , NaI in acetonitrile. I prodotti finali (**8a-q**) così ottenuti sono stati isolati mediante cromatografia su colonna di gel di silice, purificati mediante cristallizzazione da etere/etanolo e caratterizzati mediante 1H -NMR, ^{13}C -NMR e ESI-MS.

3.1.3 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO

I derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**13a-q**) sono stati ottenuti impiegando la procedura sintetica riportata nello Schema 6.



Schema 6. Reagenti e condizioni: (i) CH_3ONa , CH_3OH anidro; (ii) H_2NCN , $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, Na_2HPO_4 , H_2O ; (iii) $Br(CH_2)_3NH_2 \cdot HBr$, TEA, CH_3OH anidro; (iv) piperazina 4-X-sostituita, K_2CO_3 , NaI, CH_3CN , $70^\circ C$, 2-3 h.

Il composto di partenza, la 2-cianopiridina (**9**), viene trattato con metanolo anidro in presenza di CH_3ONa e successivamente con acido acetico. Il trattamento con dietilere porta alla formazione di un precipitato che viene allontanato mediante filtrazione. Dal filtrato evaporato si ottiene il corrispondente metil-2-piridincarbossimmidato grezzo (**10**), come un

olio bruno, che viene aggiunto ad una miscela di NH_2CN in tampone fosfato (pH 5.4) per fornire il corrispondente metil-N'-ciano-2-piridincarbosimmidato (**11**). La reazione del composto (**11**) con la 3-bromopropilammina bromidrato, in presenza di TEA e metanolo anidro, fornisce l'N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (**12**). La successiva condensazione con le opportune piperazine N-sostituite in presenza di K_2CO_3 e NaI in acetonitrile porta all'ottenimento dei prodotti finali (**13a-q**). I prodotti vengono isolati mediante cromatografia su colonna di gel di silice, purificati mediante cristallizzazione da etere/etanolo e caratterizzati mediante $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ e ESI-MS.

3.2 PROCEDIMENTI SPERIMENTALI DELLE SINTESI

3.2.1 DERIVATI A NUCLEO N-IDROSSINORBORNENICO

3.2.1.1 *Procedura generale per la preparazione degli intermedi 2 e 3-(cloro-alchilossi)-5-norbornene-2,3-dicarbossimide (Schema 4: composti 2a e 3a)*

Una soluzione di etanolo assoluto (50 mL) e NaOH (0.018 mol) viene fatta reagire con 0.018 mol di (3aR,4S,7R,7aS)-endo,cis-N-idrossi-5-norbornene-2,3-dicarbossimide (**1**), commercialmente disponibile, e 0.018 mol di 1-bromo-2-cloroetano o 1-bromo-3-cloropropano. La miscela di reazione viene tenuta sotto agitazione e.m. a 70°C per 24 ore. Successivamente il solvente viene allontanato per evaporazione sotto vuoto ed il residuo ripreso con acqua (40mL) ed estratto per tre volte, in imbuto separatore, con diclorometano. Le fasi organiche riunite vengono anidrificate con Na₂SO₄ anidro, filtrate ed evaporate sotto vuoto. Il residuo così ottenuto è purificato mediante cromatografia su colonna, utilizzando gel di silice come fase stazionaria e dietilere/etanolo 9:1 (v/v) come eluente. Le frazioni ottenute, riunite ed evaporate, vengono cristallizzate da dietilere/esano fornendo i derivati **2a** (p.f.: 56-58°C) e **3a** (p.f.: 59-61°C), con una resa rispettivamente dell'80% e 94%.

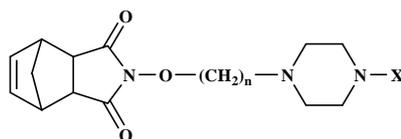
3.2.1.2 *Procedura generale per la preparazione dei prodotti finali (Schema 4: composti 2h-u e 3h-u)*

Una miscela di 4-(2-cloroetossi)-4-aza-triciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione (**2a**) o di 4-(3-cloropropossi)-4-aza-triciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione (**3a**) (0.006 mol) e NaI (0.009 mol) in acetonitrile (100 mL) viene portata a riflusso e tenuta in tali condizioni per 30 minuti. Successivamente, viene aggiunto K₂CO₃ (0.009 mol) e l'opportuna piperazina 4-sostituita (0.03 mol). La miscela di reazione così ottenuta viene tenuta sotto agitazione

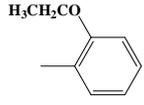
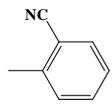
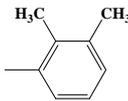
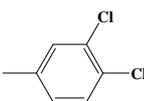
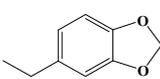
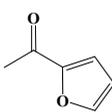
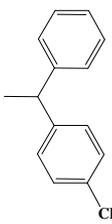
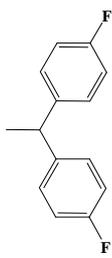
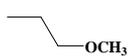
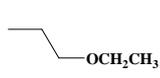
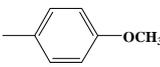
elettromagnetica e a ricadere per 24 ore. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, la soluzione viene filtrata per allontanare il K_2CO_3 e portata a secco allontanando il solvente mediante evaporazione sotto vuoto. Il residuo ottenuto viene ripreso con acqua (50 mL), ed estratto per tre volte, in imbuto separatore, con diclorometano. La fase organica viene anidrificata con Na_2SO_4 anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto ed i prodotti grezzi ottenuti vengono purificati mediante cromatografia su colonna, utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente una miscela di diclorometano/metanolo in diversi rapporti (9,5:0,5; 9:1). La successiva cristallizzazione da dietilere/etanolo fornisce i composti finali **2h-u** e **3h-u**.

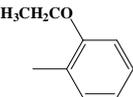
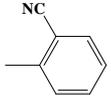
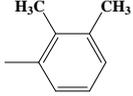
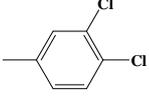
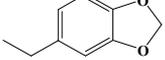
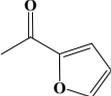
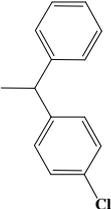
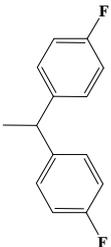
In Tabella 3 sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 3. Composti N-idrossinorbornenici **2h-u** e **3h-u** con relative rese percentuali e punti di fusione.



Composto	X	n	Formula	P.M.	p.f. (°C)	Resa (%)
2h		2	$C_{18}H_{25}N_3O_3$	331.41	75-76	54
2i		2	$C_{18}H_{27}N_3O_4$	349.42	70-72	55
2l		2	$C_{19}H_{29}N_3O_4$	363.2	215-216	68
2m		2	$C_{22}H_{27}N_3O_4$	397.47	96-97	54

2n		2	$C_{23}H_{29}N_3O_4$	411.49	81-82	61
2o		2	$C_{22}H_{24}N_4O_3$	392.45	80-82	50
2p		2	$C_{23}H_{29}N_3O_3$	395.49	146-147	67
2q		2	$C_{21}H_{23}Cl_2N_3O_3$	436.33	104-105	56
2r		2	$C_{23}H_{27}N_3O_5$	425.48	93-95	58
2s		2	$C_{20}H_{23}N_3O_5$	385.41	115-117	47
2t		2	$C_{28}H_{30}ClN_3O_3$	492.01	62-65	57
2u		2	$C_{28}H_{29}F_2N_3O_3$	493.54	54-56	67
3h		3	$C_{19}H_{27}N_3O_3$	345.44	250-251	58
3i		3	$C_{19}H_{29}N_3O_4$	363.3	207-208	70
3l		3	$C_{20}H_{31}N_3O_4$	377.48	208-210	58
3m		3	$C_{23}H_{29}N_3O_4$	411.49	98-100	45

3n		3	$C_{24}H_{31}N_3O_4$	425.52	121-123	48
3o		3	$C_{23}H_{26}N_4O_3$	406.48	104-105	47
3p		3	$C_{24}H_{31}N_3O_3$	409.52	94-95	60
3q		3	$C_{22}H_{25}Cl_2N_3O_3$	450.36	118-120	72
3r		3	$C_{24}H_{29}N_3O_5$	439.50	105-106	62
3s		3	$C_{21}H_{25}N_3O_5$	399.44	94-96	50
3t		3	$C_{29}H_{32}ClN_3O_3$	506.04	52-54	74
3u		3	$C_{29}H_{31}F_2N_3O_3$	507.57	124-127	60

3.2.2 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOISONICOTINAMIDINICO

3.2.2.1 Sintesi dell'isopropil N'-ciano-4-piridincarbossimmidato (Schema 5: composto 6)

Una miscela composta dalla 4-cianopiridina (**4**) (0,144 mol) e da sodio metossido (0,0044 mol) in isopropanolo anidro (180 mL) è lasciata sotto agitazione e.m. a 0°C per 12 ore. Successivamente alla miscela di reazione portata a temperatura ambiente, viene aggiunto acido acetico (0,0042 mol) fino a neutralizzazione della soluzione che viene poi evaporata sotto vuoto. Al residuo così ottenuto, vengono aggiunti 150 mL di esano. Si ottiene la formazione di un precipitato che viene allontanato per filtrazione. Il filtrato, evaporato sotto vuoto, fornisce il corrispondente isopropil-4-piridincarbossimmidato grezzo (**5**) (18,6 g; 0.11 mol) il quale come composto grezzo (olio bruno) viene immediatamente aggiunto ad una miscela di NH₂CN (0,21 mol) in tampone fosfato (65,55 g di NaH₂PO₄·2H₂O; 14,9 g di Na₂HPO₄; 112,5 mL di acqua) a pH 5.4. La miscela così ottenuta è lasciata per 6 ore a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione e.m.. Successivamente la soluzione viene estratta per tre volte, in imbuto separatore, con diclorometano. La fase organica, anidrificata con Na₂SO₄ anidro, viene filtrata ed evaporata sotto vuoto per fornire il corrispondente isopropil N'-ciano-4-piridincarbossimmidato grezzo (**6**, 21,9 g).

3.2.2.2 N-(3-bromopropil)-N'-cianoisonicotinamidina (Schema 5: composto7)

Ad una soluzione di isopropil-N'-ciano-4-piridincarbossimmidato (**6**) (0,116 mol) in metanolo anidro (120 mL) vengono aggiunti la 3-bromopropilammina bromidrata (0,129 mol) ed il sodio metossido (0,125 mol). La miscela di reazione viene lasciata sotto agitazione e.m. per 8 ore a temperatura ambiente. Successivamente, dopo aver allontanato il solvente per evaporazione sotto vuoto, il residuo viene ripreso con acqua ed estratto per tre volte, in imbuto separatore, con diclorometano. La fase organica separata, anidrificata con Na₂SO₄

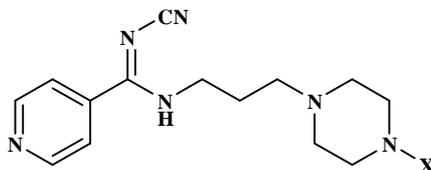
anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto fornisce un residuo che viene cristallizzato da dietil etere/etanolo. Dalla cristallizzazione si ottengono 12,5 g (40%) del prodotto desiderato (**7**) sottoforma di solido bianco: p.f. 115-117°C.

3.2.2.3 Procedura generale per la preparazione dei derivati N'-cianoisonicotinamidinici

(Schema 5: composti 8a-q)

Una miscela costituita dall'N-(3-bromopropil)-N'-cianoisonicotinamidina (**7**) (0,006 mol) e da NaI (0,009 mol) in acetonitrile è portata a riflusso, sotto agitazione e.m., per 30 minuti. Successivamente, viene aggiunta l'opportuna piperazine 4-X-sostituita (0,006 mol) e il K₂CO₃ anidro (0,009 mol). La miscela di reazione così ottenuta viene lasciata a ricadere sotto agitazione per 3-4 ore. Interrotta la reazione, si procede alla filtrazione per allontanare il K₂CO₃; dopodichè il solvente viene allontanato per evaporazione sotto vuoto e il residuo ottenuto ripreso con acqua ed estratto per tre volte, in imbuto separatore con diclorometano. La fase organica separata, anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto fornisce un residuo che viene purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente miscele di diversi solventi (diclorometano/metanolo o dietiletere/metanolo in diversi rapporti). I composti così isolati, vengono cristallizzati da etere o etere/etanolo e si ottengono così i prodotti finali **8a-q**. In Tabella 4 sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 4. Composti N'-cianoisonicotinamidinici (**8a-q**) con relative rese percentuali e punti di fusione.



Composto	X	Formula	P.M.	p.f. (°C)	Resa (%)
8a		C ₁₇ H ₂₄ N ₆	312,41	80-82	34
8b		C ₁₇ H ₂₆ N ₆ O	330,43	203-205	32
8c		C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O	344,48	209-211	25
8d		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	378,47	147-148	25
8e		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	378,47	132-133	40
8f		C ₂₂ H ₂₈ N ₆ O	392,50	117-119	25
8g		C ₂₁ H ₂₃ N ₇	373,45	169-171	20
8h		C ₂₂ H ₂₈ N ₆	376,50	138-140	34
8i		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	382,89	121-122	26
8l		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	382,89	125-126	26
8m		C ₂₁ H ₂₃ F ₃ N ₆	416,44	135-137	21
8n		C ₁₈ H ₂₂ N ₈	350,42	105-107	20
8o		C ₁₉ H ₂₃ N ₇	349,43	93-97	15
8p		C ₂₂ H ₂₆ N ₆ O ₂	406,48	118-119	35
8q		C ₁₉ H ₂₂ N ₆ O ₂	366,42	119-121	22

3.2.3 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO

3.2.3.1 Sintesi del metil-N'-ciano-2-piridincarbosimmidato (Schema 6: composto 11)

Una miscela di 2-cianopiridina (**11**) (0,192 mol) e sodio metossido (0,0096 mol) in metanolo anidro (100 mL) è lasciata sotto agitazione e.m. a temperatura ambiente per 12 ore. Successivamente viene aggiunto acido acetico (0,0106 mol) al fine di neutralizzare la soluzione che viene poi evaporata sotto vuoto. Al residuo così ottenuto, viene aggiunto dietiletere (100 mL), che porta alla formazione di un precipitato che viene allontanato per filtrazione. Dal filtrato, dopo allontanamento del solvente per evaporazione sotto vuoto, si ottiene il corrispondente metil-2-piridincarbosimmidato grezzo (**10**) (26,3 g; 0.193 mol) come un olio bruno. L'intermedio (**10**), senza essere purificato viene immediatamente aggiunto ad una miscela di NH₂CN (0,384 mol) in tampone fosfato (68,60 g di NaH₂PO₄·2H₂O, 15,62 g Na₂HPO₄, 140 mL di H₂O) a pH 5.4. La miscela così ottenuta è lasciata per 4 ore a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione e.m.. Successivamente la soluzione viene sottoposta ad estrazione in imbuto separatore con diclorometano. Le fasi organiche riunite sono state anidrificate con Na₂SO₄ anidro, filtrate ed evaporate sotto vuoto per fornire il corrispondente metil-N'-ciano-4-piridincarbosimmidato grezzo (**11**) (19 g), che viene utilizzato direttamente nella reazione successiva.

3.2.3.2 N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (Schema 6: composto 12)

Ad una soluzione di metil-N'-ciano-2-piridincarbosimmidato (**11**) (0,118 mol) in metanolo anidro (50 mL) viene successivamente aggiunta la 3-bromopropilammina bromidrata (0,129 mol) e la trietilammina (0,129 mol). la miscela di reazione è lasciata sotto agitazione per 4 ore a temperatura ambiente. Successivamente, dopo aver allontanato il solvente per evaporazione sotto vuoto, il residuo viene ripreso con acqua ed estratto in imbuto

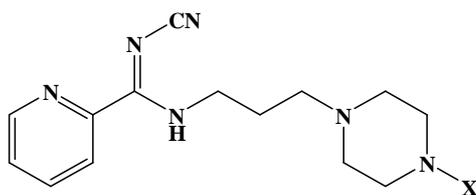
separatore con acetato di etile. La fase organica separata, anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto fornisce un residuo che viene purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice usando come eluente una miscela dietilere/etanolo (v/v 9,5:0,5). Il prodotto isolato viene cristallizzato e fornisce il prodotto desiderato (**12**) sottoforma di solido bruno (resa del 63%; p.f. 73-74°C).

3.2.3.3 Procedura generale per la preparazione dei derivati N'-cianopicolinamidinici (Schema 6: composti 13a-q)

Una miscela di N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (**12**) (0,006 mol) e NaI (0,009 mol) in aceto nitrile viene posta a ricadere, sotto agitazione e.m., per 30 minuti. Successivamente viene aggiunta l' opportuna piperazina 4-X sostituita (0.006 mol) e K₂CO₃ anidro (0,009 mol). La miscela di reazione così ottenuta viene lasciata a ricadere sotto agitazione per 2-3 ore (tempo variabile in funzione della piperazina utilizzata). Si procede, quindi alla filtrazione per allontanare il K₂CO₃; dal filtrato si allontana il solvente per evaporazione sotto vuoto e il residuo ottenuto viene ripreso con acqua ed estratto per tre volte in imbuto separatore con diclorometano. La fase organica separata, anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto fornisce un residuo che viene purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando come fase stazionaria gel di silice e come eluente miscele di diversi solventi (diclorometano/metanolo o dietilere/metanolo in diversi rapporti). I composti così isolati, vengono cristallizzati da dietilere/etanolo oppure dietilere/esano fornendo i prodotti finali **13a-q**.

In Tabella 5 sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 5. Derivati N'-cianopicolinamidinici (**13a-q**) con relative rese percentuali e punti di fusione.



Composto	X	Formula	P.M.	p.f. (°C)	Resa (%)
13a		C ₁₇ H ₂₄ N ₆	312,41	93-94	32
13b		C ₁₇ H ₂₆ N ₆ O	330,43	60-61	16
13c		C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O	344,48	liquido	56
13d		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	378,47	113-116	20
13e		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	378,47	106-108	15
13f		C ₂₂ H ₂₈ N ₆ O	392,50	122-125	14
13g		C ₂₁ H ₂₃ N ₇	373,45	118-120	19
13h		C ₂₂ H ₂₈ N ₆	376,50	119-120	15
13i		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	382,89	86-88	26
13l		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	382,89	148-149	30
13m		C ₂₁ H ₂₃ F ₃ N ₆	416,44	115-116	24
13n		C ₁₈ H ₂₂ N ₈	350,42	110-111	27
13o		C ₁₉ H ₂₃ N ₇	349,43	90-92	16
13p		C ₂₂ H ₂₆ N ₆ O ₂	406,48	104-105	63
13q		C ₁₉ H ₂₂ N ₆ O ₂	366,42	102-104	29

4. ANALISI STRUTTURALE DEI DERIVATI N'-CIANOISONICOTINAMIDINICI E N'-CIANOPICOLINAMIDINICO

Dall'analisi strutturale dei nuovi composti a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico e N'-cianopicolinamidinico emerge che, come già riportato in letteratura, a causa di un equilibrio tautomerico intorno al carbonio amidinico sp^2 , i derivati cianoamidinici possono presentare due tautomeri (I e II in Figura 3).

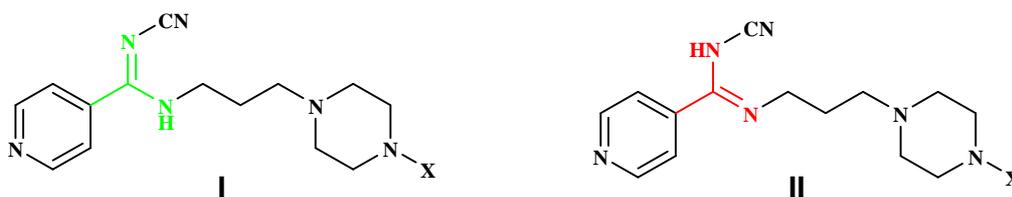


Figura 3. Tautomeri dei derivati cianoamidinici.

Gli spettri NMR ottenuti per i composti finali **8a-q** e **13a-q** hanno confermato che tutti i prodotti finali esistono, in maniera nettamente predominante, nella forma cianoiminica (I), che è risultata essere quella prevalente anche in ulteriori studi riportati [44].

Inoltre, per quanto riguarda la determinazione della configurazione degli isomeri geometrici (*E/Z*) sul doppio legame amidinico C=N, i derivati **8a-q** e **13a-q** esibiscono un solo set di segnali negli esperimenti di $^1\text{H-NMR}$, implicando l'esistenza o di un singolo isomero geometrico o, più probabilmente, di un veloce equilibrio tra le due forme, come già descritto in letteratura [45]. Sauv  et al. Hanno, infatti, indagato tale problematica per alcuni composti N'-cianoamidinici attraverso studi NMR. Tali autori hanno verificato che, mentre alcuni derivati mostravano un solo set di segnali, altri ne mostravano due. Tali segnali collassavano in un singolo set quando lo spettro veniva registrato ad una temperatura di 80°C . Tale risultato avvalorava la tesi di un veloce equilibrio tra i due isomeri geometrici; tale equilibrio si ha gi  a temperatura ambiente per alcuni composti, quali i derivati **8a-q** e **13a-q**,

mentre per altri l'equilibrio è più lento, determinando la possibilità di identificare la presenza di entrambi gli isomeri attraverso esperimenti di $^1\text{H-NMR}$.

5. MATERIALI

Tutti i reagenti e le piperazine sostituite utilizzate sono commercialmente disponibili da Aldrich.

Tutte le reazioni descritte sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) usando lastre di gel di silice del tipo preconfezionato della Merck Kieselgel 60 F-254 con indicatore di fluorescenza, di dimensioni 5x10 cm, come eluente miscele di opportuni solventi e come metodo di visualizzazione una lampada UV (254nm).

I prodotti finali e alcuni intermedi sono stati ottenuti in forma pura mediante cromatografia su colonna utilizzando come fase stazionaria gel di silice (0,05-0,20 mm/70-230 mesh ASTM, Carlo Erba) e come eluente miscele di diversi solventi.

6. CARATTERIZZAZIONE

Sia i prodotti finali che gli intermedi di reazione sono stati tutti caratterizzati mediante spettroscopia $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$. Gli spettri NMR sono stati registrati su uno apparecchio Varian Mercury Plus 400 MHz e utilizzando come solvente CDCl_3 . I dati ottenuti sono tutti consistenti con le strutture proposte.

Per i prodotti finali, inoltre, è stata effettuata l'analisi ESI-MS, mediante uno spettrometro di massa API2000, ESI-triplo quadrupolo.

I punti di fusione dei prodotti sintetizzati sono stati determinati mediante apparecchio elettrico Büchi 540.

7. SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA

7.1 GENERALITA'

I prodotti sintetizzati sono stati sottoposti a sperimentazione farmacologica presso il Dipartimento di Farmacologia "G. Segre" dell'Università degli Studi di Siena.

L'affinità *in vitro* dei composti finali verso i sottotipi recettoriali serotoninergici 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} e, per i composti selezionati, anche verso i recettori D₁, D₂, α_1 e α_2 , è stata valutata mediante saggi di binding con radioligandi.

Come ligandi specifici sono stati utilizzati [³H]-8-OH-DPAT per i recettori 5-HT_{1A}, [³H]-ketanserina per i recettori 5-HT_{2A}, [³H]-mesulergina per i recettori 5-HT_{2C}, [³H]SCH-23390 per i recettori D₁, [³H]spiperone per i recettori D₂, [³H]prazosina per i recettori α_1 e [³H]yohimbina per i recettori α_2 . Tutti i saggi di binding sono stati condotti su omogenati di cervello di ratto; in particolare, in tutti i saggi è stato utilizzato come tessuto corteccia cerebrale di ratto, eccetto che per i saggi sui recettori dopaminergici D₁ e D₂, in cui si è utilizzato striato di ratto.

Le concentrazioni richieste per inibire del 50% lo specifico binding dei radioligandi (IC₅₀) sono state determinate saggiando ciascun composto in triplo, usando da sei a nove differenti concentrazioni del composto in esame. I valori di IC₅₀ ottenuti sono stati usati per calcolare le costanti apparenti di inibizione (K_i) attraverso il metodo di Cheng e Prussoff [46] basato sulla seguente equazione: $K_i = IC_{50} / (1 + S / K_D)$, dove S rappresenta la concentrazione del radioligando utilizzata e K_D la sua costante di dissociazione recettoriale [47].

7.1.1 Saggi di binding: 5-HT_{1A}

Per la preparazione dei recettori 5-HT_{1A} è stato impiegato il metodo di Schlegel et al [48]. La corteccia cerebrale di ratti maschi Sprague-Dawley è stata omogenata in 20 volumi di tampone freddo Tris-HCl (50 mM, pH 7.7 a 22°C) con un Brinkmann Polytron PT10 (posizionato su 5 per 5 secondi); l'omogenato è stato centrifugato a 50000 giri per 10 minuti a 0°C. Il pellet risultante è stato risospeso nello stesso tampone, incubato per 10 minuti a 37 °C e centrifugato a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet finale contenente i recettori è stato risospeso in 80 volumi del tampone Tris-HCl contenente 10 µM di pargilina, 4 mM di CaCl₂ e acido ascorbico allo 0.1% . A ciascuna provetta sono stati aggiunti: 0.1 ml del farmaco diluito (0.1 ml di acqua distillata per la prova in bianco), 0.1 ml di [³H]-8-idrossi-2-(di-n-propilammino)-tetralina ([³H]-8-OH-DPAT) in tampone (contenente Tris-HCl, CaCl₂, pargilina e acido ascorbico) per ottenere nel saggio una concentrazione finale di 0.1 nM e 0.8 ml di membrana risospesa. Le provette sono state incubate per 30 minuti a 37°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati per due volte con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl. La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico del [³H]-8-OH-DPAT è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza della 5-HT (10 µM).

7.1.2 Saggi di binding: 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}

Per la preparazione dei recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} è stato impiegato il metodo riportato da Herndon et al [49]. Le regioni della corteccia frontale dei ratti maschi Sprague-Dawley (200-250 g; Charles River) sono stati sezionati in ghiaccio, omogenati (1:10 p/v) in una soluzione tampone a 0°C (50 mM Tris-HCl, 0.5 mM di EDTA e 10 mM di MgCl₂, pH 7.4) e centrifugati a 3000 giri per 15 minuti. Il pellet è stato risospeso in tampone (1:30 p/v),

incubato a 37°C per 15 minuti e poi ricentrifugato due volte a 3000 giri per 10 minuti. Il pellet finale è stato risospeso in tampone che conteneva anche acido ascorbico allo 0.1% e pargilina 10^{-5} M. I saggi sono stati eseguiti in triplo in un volume di 20 ml contenente 5 mg p/p di tessuto e 0.4 nM di [³H]-ketanserina (76 Ci/mmol; New England Nuclear) per i saggi sui recettori 5-HT_{2A}, e 10 mg p/p di tessuto ed 1 nM di [³H]-mesulergina (75.8 Ci; mmoli; Amersham) per i saggi sui recettori 5-HT_{2C}.

Per definire il legame aspecifico nel saggio di binding per i recettori 5-HT_{2A} è stata utilizzata la cinanserina (1.0 µM). Nel saggio di binding per i recettori 5-HT_{2C} è stata utilizzata la mianserina (1.0 µM) per definire il legame aspecifico aggiungendo a tutte le provette 100 nM di spiperone (Sigma) per ostacolare il legame ai recettori 5-HT_{2A}. Le provette, poi, sono state incubate per 15 minuti a 37 °C, filtrate su filtri Schliecher e Schuell (Keene, NH) in fibra di vetro sinterizzato, in polietilenimmina e lavati con 10 ml di una soluzione di tampone fredda. I filtri sono stati misurati con efficienza del 50%.

7.1.3 Saggi di binding: D₁

Per la preparazione dei recettori D₁ è stato impiegato il metodo descritto da Billard et al. [50]. I corpi striati sono stati omogenati in 30 vol (w/v) di tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.7 a 25 °C) con un Polytron PT10 (posizionato su 5 per 20 s). Gli omogenati sono stati centrifugati a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.7 a 37 °C) contenente 120 mM di NaCl, 5 mM KCl, 2 mM di CaCl₂, 1 mM di MgCl₂, 0.1 % di acido ascorbico e 10 µM di pargilina. Ciascuna provetta conteneva 50 µl di [³H]SCH-23390 (85,0 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 0.4 nM e 900 µl di membrane sospese (3 mg di tessuto fresco). Le provette sono state incubate per 15 minuti a 37°C ed infine filtrate sotto

vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati per due volte con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl (pH 7.7 a 25°C). La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico del [³H]SCH-23390 è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza del piflutixolo 0.1 μM.

7.1.4 Saggio di binding: D₂

Per la preparazione dei recettori D₂ è stato impiegato il metodo di Creese et al. [51]. I corpi striati sono stati omogenati in 30 vol (w/v) di tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.7 a 25°C) con un Polytron PT10 (posizionato su 5 per 20 s). Gli omogenati sono stati centrifugati in due volte a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.1 a 37°C) contenente 120 mM di NaCl, 5 mM KCl, 2 mM di CaCl₂, 1 mM di MgCl₂, 0.1 % di acido ascorbico e 10 μM di pargilina. Ciascuna provetta conteneva 50 μl di [³H]-spiperone (15.7 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 0.4 nM e 900 μl di membrane sospese (3 mg di tessuto fresco). Le provette sono state incubate per 15 minuti a 37°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati in tre tempi con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl (pH 7.7 a 25°C). La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico del [³H]spiperone è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza del (+)-butaclamolo 1.0 μM.

7.1.5 Saggio di binding: α_1

La procedura utilizzata in tali saggi sui recettori α_1 è stata riportata in dettaglio da Greengrass e Bremner [52]. La corteccia cerebrale è stata omogenata in 30 vol (w/v) di tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.2 a 25°C) con un Polytron PT10 (posizionato su 5 per 20 s). Gli omogenati sono stati centrifugati in due volte a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone freddo Tris-HCl 50 mM (pH 7.4 a 25°C). Ciascuna provetta conteneva 50 μ l di soluzione fisiologica, 50 μ l di [3 H]-prazosina (80.5 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 0.4 nM e 900 μ l di membrane sospese (10 mg di tessuto fresco). Le provette sono state incubate per 15 minuti a 25°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati in tre tempi con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl (pH 7.2 a 25°C). La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico del [3 H]prazosina è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza della fentolamina 10 μ M.

7.1.6 Saggio di binding: α_2

Per la preparazione dei recettori α_2 è stato impiegato il metodo di Perry e U'Prichard [53]. La corteccia cerebrale è stata omogenata in 30 vol (w/v) di tampone freddo Tris-HCl 5 mM e 5 mM di EDTA (pH 7.7 a 25°C) con un Polytron PT10 (posizionato su 5 per 20 s). Gli omogenati sono stati centrifugati in due volte a 50000 giri per 10 minuti. Il pellet risultante è stato risospeso in tampone freddo Tris-HCl 50 mM e 0.5 mM di EDTA (pH 7.5 a 25°C). Ciascuna provetta conteneva 50 μ l di soluzione fisiologica, 50 μ l di [3 H]-yohimbina (80.5 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 1.0 nM e 900 μ l di membrane sospese (10 mg di tessuto fresco). Le

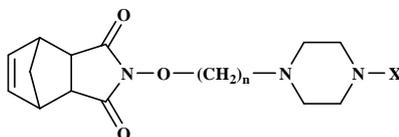
provette sono state incubate per 30 minuti a 25°C ed infine filtrate sotto vuoto utilizzando filtri Whatman GF/B. I filtri sono stati lavati in tre tempi con 5 ml di tampone freddo Tris-HCl 50 mM e 0.5 mM di EDTA (pH 7.5 a 25°C). La radioattività rimasta sul filtro è stata misurata mediante spettrometria a scintillazione liquida. Il legame specifico del [³H]-yohimbina è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza della fentolamina 10 µM.

8. RISULTATI E DISCUSSIONE

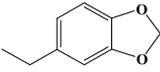
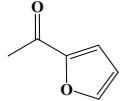
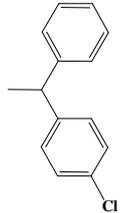
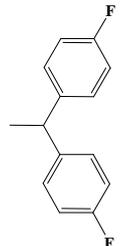
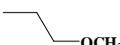
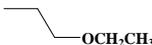
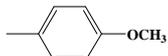
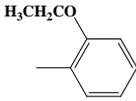
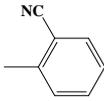
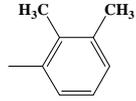
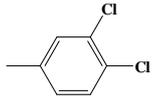
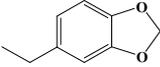
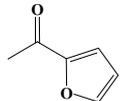
8.1 DERIVATI A NUCLEO N-IDROSSINORBORNENICO (2h-u e 3h-u)

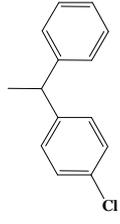
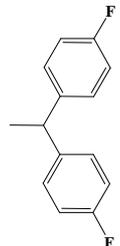
I valori di affinità dei composti sintetizzati (**2h-u** e **3h-u**) verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, valutati mediante saggi di binding con radioligandi ed espressi come valori di costanti di inibizione K_i (nM) sono riportati in Tabella 6.

Tabella 6. Valori di affinità K_i (nM) dei composti a nucleo N-idrossinorborenico **2h-u** e **3h-u** per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Composto	X	n	Affinità recettoriale ^a K _i ± SD (nM)		
			5-HT _{1A} [³ H]8OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H]Ketanserina	5-HT _{2C} [³ H]Mesulergina
2h		2	—	>10 ⁴	>10 ⁴
2i		2	—	>10 ⁴	1590 ± 524
2l		2	—	>10 ⁴	>10 ⁴
2m		2	—	25.3 ± 2.61	6.79 ± 0.076
2n		2	5.67 ± 0.300	381 ± 16.1	10.9 ± 4.88
2o		2	4.82 ± 0.046	83.7 ± 1.92	6.61 ± 0.265
2p		2	15.1 ± 0.79	14.8 ± 1.22	17.4 ± 0.98
2q		2	—	153 ± 70.4	1.13 ± 0.165

2r		2	—	—	—
2s		2	—	3880 ± 172	145 ± 48.5
2t		2	—	$>10^4$	—
2u		2	10.3 ± 0.57	344 ± 56.6	10.2 ± 1.17
3h		3	—	$>10^4$	19.4 ± 0.85
3i		3	—	—	—
3l		3	—	$>10^4$	11.0 ± 5.72
3m		3	—	71.4 ± 0.98	4.56 ± 0.373
3n		3	$>10^4$	397 ± 24.3	5.02 ± 0.221
3o		3	$>10^4$	18.8 ± 0.96	—
3p		3	—	7.48 ± 0.184	5.16 ± 0.124
3q		3	$>10^4$	13.4 ± 1.36	—
3r		3	—	28.8 ± 1.60	1720 ± 62
3s		3	3530 ± 231	2690 ± 204	794 ± 6.3

3t		3	433 ± 37.9	25.6 ± 1.31	—
3u		3	1070 ± 88	25.3 ± 3.55	2820 ± 154

^aValori di K_i (nM) seguiti da SD. Nelle stesse condizioni, la 8-OH-DPAT, la Ketanserina e la Mesulergina, presi come termine di confronto, si legano rispettivamente ai recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} con valori di K_i di 0.80, 0.85 e 1.90 nM.

Dall'analisi dei dati riportati in Tabella 6 è possibile osservare come la presenza di piperazine supportanti nuovi sostituenti sia di natura alifatica che aromatica nei derivati N-idrossinorbornenici (**2h-u** e **3h-u**) [43] abbia determinato in generale la riduzione dell'affinità verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A} rispetto alla prima serie di derivati N-idrossinorbornenici (**2b-g** e **3b-g**) [41]. Solo per i composti **2n**, **2o**, **2p** e **2u** è possibile notare ancora una buona affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} ($K_i = 5.67, 4.82, 15.1$ e 10.3 nM rispettivamente). Tali composti, però, sono caratterizzati da una scarsa selettività in quanto presentano bassi valori di K_i anche verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.

Il gruppo 3,4-diclorofenilico presente sull'azoto 4 dell'anello piperazinico legato al nucleo norbornenico per mezzo di una catena ossialchilica a due termini (**2q**) ha conferito un'altissima affinità e selettività per il recettore 5-HT_{2C} ($K_i=1.13$ nM). Questo risultato è particolarmente interessante anche perché, ad oggi, ci sono poche evidenze riguardanti l'interazione delle strutture dei derivati arilpiperazinici a lunga catena (LCAPs) sul recettore 5-HT_{2C}. Infatti, solo alcuni analoghi piperazinici si sono rivelati agonisti 5-HT_{2C} potenti e

selettivi, ma per questi non sono stati riportati incoraggianti dati farmacologici *in vivo* [54]. Un interessante profilo di affinità per il recettore 5-HT_{2C} è stato mostrato anche dai composti **3h** e **3l**, che risultano essere particolarmente interessanti sia per la loro affinità nanomolare e selettività verso i recettori 5-HT_{2C}, sia per il fatto di avere un sostituente non aromatico legato all'anello piperazinico. Al contrario, il derivato **3q** supportante lo stesso gruppo 3,4-diclorofenilico e una catena ossialchilica a tre termini non ha esibito alcuna affinità nei confronti del recettore 5-HT_{2C} ma ha mostrato un eccellente profilo di affinità e selettività verso il recettore 5-HT_{2A} (K_i=13.4 nM). Interessante è anche il derivato **3p**, supportante un gruppo 2,3-dimetilfenilpiperazinico, che è caratterizzato da un promettente profilo di affinità mista 5-HT_{2A}/5-HT_{2C} (con valori di K_i di 7.48/5.16 nM rispettivamente).

Successivamente è stata valutata la selettività dei composti più attivi (**2m**, **2n**, **2o**, **2p**, **2q**, **3m**, **3n** e **3p**) attraverso saggi di binding verso i recettori adrenergici (α_1 e α_2) e dopaminergici (D₁ e D₂). I risultati di tali saggi sono riportati in Tabella 7.

Tabella 7. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati a nucleo N-idrossinorbornenico (**2m**, **2n**, **2o**, **2p**, **2q**, **3m**, **3n** e **3p**) per i recettori D₁, D₂, α_1 e α_2 .

Composto	Affinità recettoriale K _i ± SD (nM)			
	D ₁ [³ H]SCH-23390	D ₂ [³ H]spiperone	α_1 [³ H]prazosina	α_2 [³ H]yohimbina
2m	>10 ⁴	>10 ⁴	no affinity	>10 ⁴
2n	>10 ⁴	7.92 ± 0.197	1290 ± 108	3100 ± 227
2o	350 ± 15.6	>10 ⁴	>10 ⁴	1110 ± 425
2p	>10 ⁴	646 ± 12.6	550 ± 32.3	1150 ± 106
2q	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	2730 ± 206
3m	—	—	—	>10 ⁴
3n	180 ± 4.8	>10 ⁴	723 ± 56.8	162 ± 11.3
3p	>10 ⁴	84.7 ± 0.62	249 ± 11.0	497 ± 17.6

Tutti i composti testati hanno confermato un'elevata selettività verso i recettori serotoninergici ad eccezione del composto **2n**, che ha esibito valori di K_i pari a 7.92 nM sul recettore D_2 , ed il composto **3p**, che ha evidenziato una moderata affinità verso lo stesso recettore. La discreta affinità verso il recettore D_2 , unitamente all'affinità mista per i recettori 5-HT_{2A}/5-HT_{2C} (valori di K_i = 7.48/5.16 nM, rispettivamente), mostrata dal composto **3p**, è di particolare interesse e sottolinea per questo derivato un potenziale profilo terapeutico come antipsicotico atipico [55].

Inoltre, prendendo in esame la serie completa dei derivati N-idrossinorbornenici (**2b-u** e **3b-u**) è stato possibile chiarire fondamentalmente il ruolo del sostituente sull'N-4 della porzione piperazinica nell'influenzare l'affinità e la selettività verso il recettore 5-HT_{1A}.

Zlatovic et al. [56] hanno recentemente riportato che alcune arilpiperazine possono interagire direttamente con la porzione idrofobica del sito di legame del recettore 5-HT_{1A} e i ligandi che presentano sostituenti ingombranti in posizione 4- sull'anello aromatico della porzione arilpiperazinica formano complessi deboli, a causa delle interazioni steriche tra il sostituente in posizione 4- e un residuo di Trp 358 e/o il backbone dell'elica TM6. Infatti, quando la posizione 4- sull'anello aromatico non è sostituita ma associata ad una catena ossialchilica più corta (n=2, **2n**, **2o** e **2p**) evidenziamo ancora una discreta affinità verso il recettore 5-HT_{1A} ma una scarsa selettività sugli altri recettori serotoninergici. Al contrario, quando la posizione 4- non è sostituita ma associata ad una catena ossialchilica più lunga (n=3, **3n**, **3o** e **3p**), che comunque rende la struttura più estesa, non riscontriamo alcuna significativa affinità. Questi aspetti, quindi, sono risultati utili per chiarire la scarsa affinità e selettività presentata da questi nuovi derivati piperazinici. In questi composti, infatti, una porzione non aromatica o un sostituente più ingombrante risultano meno vantaggiosi per l'interazione con il recettore. Sulla base di queste considerazioni possiamo, quindi, supporre

che anche l'assenza di affinità dei derivati 4-metossifenilpiperazinicici (**2m** e **3m**) per il recettore 5-HT_{1A}, apparentemente in disaccordo con le elevate affinità e selettività del derivato 2-metossifenilpiperazinicico riportato precedentemente (**3b**, n=3, K_i=0.021 nM) [41], può essere dovuta, come recentemente riportato in letteratura [56], alle svantaggiose interazioni steriche del gruppo metossilico in posizione 4- dell'anello aromatico con un residuo di Trp 358 ed in parte con il backbone dell'elica TM6.

Anche la natura del sostituente in posizione orto, che dovrebbe favorire l'affinità [41], è determinante. Infatti, con un gruppo -OCH₂CH₃ (**2n** e **3n**) invece di un -OCH₃ (**2b** e **3b**) [41] l'affinità verso il recettore 5-HT_{1A} è favorita con una catena alchilica più corta piuttosto che con una catena a tre termini.

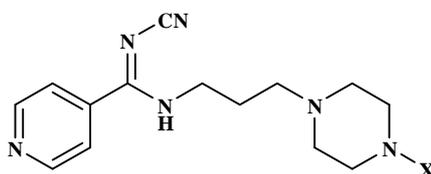
Infine, anche lo scarso profilo di affinità/selettività dei derivati caratterizzati dalla presenza di due anelli aromatici (**2t**, **2u**, **3t** e **3u**) sull'N-4 potrebbe essere dovuto, come riportato in letteratura [57], ad interazioni steriche che determinano la formazione di complessi deboli con il recettore.

Riassumendo, i dati di affinità presentati hanno dimostrato che sostituenti più ingombranti sulla posizione 4 delle arilpiperazine o sostituenti di natura alifatica sull'N-4 della porzione piperazinicica non sono tollerati al fine di ottenere derivati N-idrossinorbornenici con un elevato profilo di affinità/selettività per il recettore 5-HT_{1A}. Contemporaneamente, sono stati evidenziati due interessanti composti: **2q** come ligando 5-HT_{2C} e **3p** come ligando misto 5-HT_{2A}/5-HT_{2C}/D₂ che presentano un potenziale profilo terapeutico come antiepilettici [54], ansiolitici [25-26] o agenti antipsicotici atipici [55].

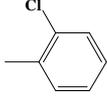
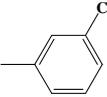
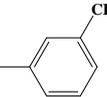
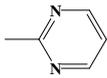
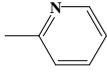
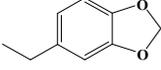
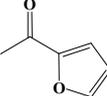
8.2 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOISONICOTINAMIDINICO (8a-q)

I risultati dei saggi di binding verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} ottenuti per i composti sintetizzati (8a-q) ed espressi come valori di costante di inibizione Ki (nM) sono riportati in Tabella 8.

Tabella 8. Valori di affinità Ki (nM) dei derivati a nucleo N'-cianoisonicotinoamidinico (8a-q) per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Composto	X	Affinità recettoriale ^a Ki ± SD (nM)		
		5-HT _{1A} [³ H]8OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H]Ketanserina	5-HT _{2C} [³ H]Mesulergina
8a		—	—	—
8b		—	>10 ⁴	—
8c		>10 ⁴	—	—
8d		1.47 ± 0.048	>10 ⁴	—
8e		>10 ⁴	—	—
8f		21.3 ± 0.75	1900 ± 100	11.5 ± 3
8g		—	>10 ⁴	—
8h		101 ± 37.5	>10 ⁴	—

8i		166 ± 7.9	$>10^4$	—
8l		6.17 ± 0.145	$>10^4$	—
8m		141 ± 9.4	32.1 ± 0.53	—
8n		172 ± 24	—	—
8o		0.0379 ± 0.00134	—	—
8p		$>10^4$	$>10^4$	—
8q		$>10^4$	$>10^4$	—

^aValori di K_i (nM) seguiti da SD. Nelle stesse condizioni, la 8-OH-DPAT, la Ketanserina e la Mesulergina, presi come termine di confronto, si legano rispettivamente ai recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} con valori di K_i di 0.80, 0.85 e 1.90 nM.

La presenza del nuovo nucleo N'-cianoisonicotinamidinico ha portato a prodotti che hanno mostrato nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} un'affinità da media ad elevata; in particolare i composti **8d**, **8l** e **8o** hanno mostrato un'affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} analoga, o di gran lunga superiore, a quella esibita dalla 8-OH-DPAT (0,80 nM).

Il composto che in assoluto ha mostrato la più alta affinità nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} è quello caratterizzato dall'introduzione in posizione 4- dell'anello piperazinicco di un anello piridinico (**8o**), con valore di K_i pari a 0,0379 nM. Inoltre, tale derivato presenta anche un'elevata selettività verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.

Questa elevata selettività è mantenuta anche dai derivati **8d** e **8l**, che mostrano anch'essi una buona affinità nei confronti dei recettori 5-HT_{1A} con valori di K_i

rispettivamente di 1,47 e 6,17 nM e supportanti in posizione 4- dell'anello piperazinico un *o*-OCH₃-fenile e un *m*-Cl-fenile.

Seppur con valori di affinità inferiori a quelli mostrati dai derivati **8d**, **8l** e **8o**, anche con il derivato **8f**, supportante un *o*-OCH₂CH₃-fenile, si evidenzia una buona affinità nei confronti dei recettori 5-HT_{1A} (con K_i di 21,3 nM) accompagnata da una buona selettività nei confronti del recettore 5-HT_{2A} e da una contemporanea discreta affinità di binding verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2C}, con valore di K_i di 11,5 nM. I valori di affinità ottenuti determinano, quindi, per questo composto (**8f**), un'attività mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C}.

E' possibile evidenziare, inoltre, nell'ambito di questa serie, come la presenza dei sostituenti alifatici (**8a-c**) in posizione N-4 dell'anello piperazinico determini una drastica caduta dell'affinità di binding verso tutti i sottotipi recettoriali studiati, in analogia con i derivati N-idrossinorbornenici.

I derivati che hanno mostrato il miglior profilo di affinità/selettività (**8d**, **8f**, **8l** e **8o**), in relazione ai valori di binding verso i recettori serotoninergici, sono stati ulteriormente testati mediante saggi di binding sui recettori D₁, D₂, α₁ e α₂ (Tabella 9) confermando, anche in questo caso, un'elevata selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} per i derivati **8d**, **8l** e **8o** ed evidenziando, invece, un profilo di attività mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C} per il composto **8f**, anche se accompagnata da una moderata affinità verso i recettori adrenergici α₁ e α₂.

Tabella 9. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati a nucleo N'-cianoisonicotinoamidinici (**8d**, **8f**, **8l** e **8o**) per i recettori D_1 , D_2 , α_1 e α_2 .

Composto	Affinità recettoriale $K_i \pm SD$ (nM)			
	D_1	D_2	α_1	α_2
	[³ H]SCH-23390	[³ H]spiperone	[³ H]prazosina	[³ H]yohimbina
8d	$>10^4$	$>10^4$	$>10^4$	2570 ± 258
8f	$>10^4$	$>10^4$	190 ± 57.9	516 ± 63.6
8l	1630 ± 60	$>10^4$	912 ± 10.6	$>10^4$
8o	$>10^4$	$>10^4$	$>10^4$	$>10^4$

Confrontando i risultati ottenuti per questa serie di composti **8a-q** con quelli dei derivati a nucleo N-idrossinorbornenico si potrebbero fare alcune interessanti considerazioni.

In particolare, riguardo ai recettori 5-HT_{1A}, si può sottolineare la totale mancanza di affinità per i composti che presentano un sostituente alifatico sull'N 4- dell'anello piperazinico per entrambe le serie di composti; inoltre, ancora una volta il derivato *o*-OCH₃-fenilico (**8d**) si è rivelato uno dei composti maggiormente attivi, molto probabilmente anche in questo caso grazie alla possibilità di formare un legame a idrogeno con l'Asn 386 presente nel sito di legame del recettore [41]. Si deve comunque sottolineare che, anche in questo caso, ci troviamo di fronte ad un composto con una catena alchilica spaziatrice a tre atomi di carbonio (come nel caso del composto **3b**).

Si deve ancora evidenziare, come già mostrato per i derivati N-idrossinorbornenici e come già ampiamente riportato in letteratura [56], come la presenza di un sostituente in posizione 4- dell'anello fenilico legato alla piperazina renda estremamente sfavorevole l'interazione con il recettore 5-HT_{1A}, come si evidenzia dalla totale assenza di affinità per il composto **8e** *p*-metossifenilico, molto probabilmente anche in questo caso a causa delle

interazioni steriche che intervengono tra il sostituente in posizione 4 e il Trp 358 e/o il backbone dell'elica TM6 del recettore.

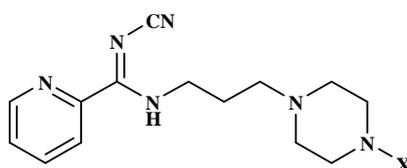
Relativamente ai sottotipi recettoriali 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, l'introduzione del nucleo N'-cianoisonicotinamidinico non favorisce affatto l'affinità e la selettività; infatti, gli unici composti che presentano moderata affinità sono il derivato **8f** per il recettore 5-HT_{2C} (K_i=11.5) e **8n** per il recettore 5-HT_{2A} (K_i=32.1), affinità che è accompagnata, in entrambi i casi, da una scarsa selettività a causa della concomitante affinità verso il recettore 5-HT_{1A}.

In conclusione, l'introduzione dello scaffold N'-cianoisonicotinamidinico, legato per mezzo di una catena alchilica a tre unità metileniche ai residui piperazinici variamente sostituiti, ha determinato l'ottenimento di nuovi composti caratterizzati da un'elevata affinità e selettività verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, delineandone un potenziale utilizzo terapeutico come ansiolitici [25-26].

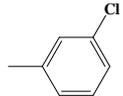
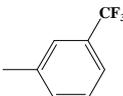
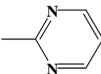
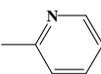
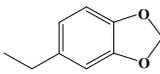
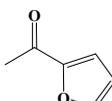
8.3 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO (13a-q)

I valori di affinità dei composti sintetizzati (**13a-q**) verso i vari sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, valutati mediante saggi di binding con radioligandi ed espressi come valori di costanti di inibizione K_i (nM), sono riportati in Tabella 10.

Tabella 10. Valori di affinità K_i (nM) dei composti a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**13a-q**) per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Composto	X	Affinità recettoriale ³ K _i ± SD (nM)		
		5-HT _{1A} [³ H]8OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H]Ketanserina	5-HT _{2C} [³ H]Mesulergina
13a		—	—	—
13b		—	—	389 ± 17.7
13c		—	—	597 ± 8.8
13d		4.68 ± 0.389	0.00157 ± 0.000106	1.61 ± 0.458
13e		0.0842 ± 0.00088	>10 ⁴	—
13f		17.2 ± 1.36	2730 ± 143	—
13g		>10 ⁴	904 ± 10.2	28.8 ± 2.67
13h		30 ± 1.79	0.867 ± 0.0308	29.7 ± 2.14
13i		170 ± 11.7	27 ± 0.97	—

13l		6.67 ± 0.070	0.000185 ± 0.0000168	3.28 ± 0.223
13m		1.31 ± 0.263	0.000778 ± 0.0000331	1.81 ± 0.178
13n		3080 ± 154	0.0161 ± 0.00120	22.5 ± 1.74
13o		30.6 ± 2.20	1.12 ± 0.178	$>10^4$
13p		$>10^4$	51.8 ± 0.27	—
13q		$>10^4$	21.5 ± 0.21	—

^aValori di K_i (nM) seguiti da SD. Nelle stesse condizioni, la 8-OH-DPAT, la Ketanserina e la Mesulergina, presi come termine di confronto, si legano rispettivamente ai recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} con valori di K_i di 0.80, 0.85 e 1.90 nM.

Dall'analisi dei risultati riportati in Tabella 10 emerge un dato molto interessante: l'introduzione del nucleo N'-cianopicolinamidinico, al posto dei nuclei N-idrossinorbornenico e N'-cianoisonicotinamidinico, ha determinato, per la maggior parte dei nuovi composti, uno spostamento dell'affinità dai recettori 5-HT_{1A} verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{2A}.

In particolare, i derivati *o*-OCH₃-fenilico (**13d**), *m*-Cl-fenilico (**13l**), *m*-CF₃-fenilico (**13m**) e pirimidinico (**13n**) mostrano non solo un'ottima affinità, con valori di K_i (nM) = 0.00157, 0.000185, 0.000778 e 0.0161 rispettivamente, ma anche selettività dal momento che i loro valori di K_i risultano 10000 (per **13l** e **13m**) o 1000 (per **13d** e **13n**) volte minori rispetto ai valori di K_i esibiti per i recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}. Anche per questa nuova serie di composti, inoltre, sembra giocare un ruolo fondamentale ai fini dell'affinità la posizione del sostituente dell'anello aromatico in posizione 4- della piperazina. Ciò risulta particolarmente evidente nel composto **13e**, dove la presenza del sostituente -OCH₃-fenile in posizione *para*

porta ad una totale assenza di affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} rispetto al suo congenero *o*-OCH₃-fenil-derivato **13d**, mentre l'affinità si sposta verso il recettore 5-HT_{1A}.

Questo dato sembrerebbe in contrasto con quelli ottenuti per le altre due serie piperazinicche sintetizzate; infatti, sia nella serie a nucleo N-idrossinorbornenico sia nella serie a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, il derivato *o*-CH₃-fenile risulta l'unico, tra i due congeneri, ad essere attivo sui recettori 5-HT_{1A}, mentre nella serie a nucleo N'-cianopicolinamidinico è favorita l'interazione del derivato *p*-OCH₃-fenilico. Molto probabilmente, questa variazione di affinità è dovuta alla presenza dell'N in posizione -2 del nucleo piridinico che, forse creando interazioni addizionali con il recettore, farebbe penetrare la molecola più internamente al sito di binding, in modo tale da creare la distanza utile alla formazione del legame idrogeno con l'Asn 386 da parte del gruppo metossilico, pur trovandosi in posizione differente. E' comunque da aggiungere che anche il composto **13d** mantiene una certa affinità verso il recettore 5-HT_{1A}, anche se inferiore al composto **13e**.

Inoltre, anche altri derivati appartenenti a questa nuova serie mantengono una certa affinità verso il recettore 5-HT_{1A}, ma non risultano essere selettivi. Questo dato potrebbe essere estremamente interessante in quanto potrebbe render conto o di una maggiore adattabilità conformazionale dei derivati **13a-q**, dovuta all'introduzione del nuovo nucleo eterociclico, o di particolari proprietà chimico-fisiche del nucleo stesso che lo rendono capace di interagire con i diversi sottotipi recettoriali considerati.

Il confronto dei dati farmacologici ottenuti per i derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**13a-q**) con quelli forniti dai composti N'-cianoisonicotinamidinici (**8a-q**) ci permette di fare alcune considerazioni. Mentre tra i composti **8a-q** pochissimi hanno affinità verso i recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, con un miglior profilo di interazione verso i recettori 5-HT_{1A}, con i composti **13a-q**, come già delineato in precedenza, la situazione è ben

diversa. Dato che l'unica differenza strutturale tra le due serie è la posizione dell'atomo di azoto della piridina che costituisce il nucleo eterociclico di base, è lecito supporre che la suddetta differenza nei dati farmacologici sia imputabile proprio a tale caratteristica strutturale che è alla base di differenti comportamenti chimico-fisici e, quindi, anche di diverse interazioni con i recettori.

Dall'analisi dei dati, inoltre, si può evidenziare come, anche per questa serie di derivati, i composti con un sostituito alifatico in posizione 4- della piperazina (**13a-c**) non esibiscono alcuna affinità nei confronti di tutti i sottotipi recettoriali serotoninergici considerati. Si conferma così la necessità della presenza di un sostituito aromatico sull'N-4 dell'anello piperazinico.

I dati riportati in Tabella 11, infine, mostrano come tutti i composti sottoposti ai saggi di *binding* nei confronti dei recettori dopaminergici D₁ e D₂ ed i recettori adrenergici α₁ e α₂ mostrino scarsa o nulla affinità confermando, anche per questa serie, una buona selettività nei confronti di questi recettori.

Tabella 11. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinici (**13d**, **13e**, **13h**, **13l**, **13m**, **13n** e **13o**) per i recettori D₁, D₂, α₁ e α₂.

Composto	Affinità recettoriale K _i ± SD (nM)			
	D ₁	D ₂	α ₁	α ₂
	[³ H]SCH-23390	[³ H]Spiperone	[³ H]Prazosina	[³ H]Yohimbine
13d	>10 ⁴	>10 ⁴	105 ± 28.1	245 ± 37.7
13e	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	—
13h	>10 ⁴	>10 ⁴	729 ± 9.3	318 ± 7.8
13l	381 ± 33	>10 ⁴	174 ± 19.2	1360 ± 77
13m	>10 ⁴	83.7 ± 3.23	770 ± 15.9	>10 ⁴
13n	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	—
13o	>10 ⁴	>10 ⁴	130 ± 11.9	>10 ⁴

E' possibile concludere affermando che l'introduzione del nucleo N'-cianopicolinamidinico, spostando la selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A}, potrebbe essere molto utile sia per le relazioni struttura-attività sia per un eventuale utilizzo terapeutico, soprattutto alla luce di recenti studi riguardanti il coinvolgimento dei recettori 5-HT_{2A} nelle linee cellulari del carcinoma della mammella che sottolineano la necessità di antagonisti altamente selettivi per tale sottotipo recettoriale [22].

9. CONCLUSIONI

In conclusione, sono state sintetizzate tre nuove serie di piperazine 4-sostituite legate a tre diversi nuclei eterociclici: N-idrossinorbornenico, N'-cianoisonicotinamidinico e N'-cianopicolinamidinico. I risultati farmacologici hanno messo in evidenza che la natura del nucleo eterociclico, unitamente al sostituito sull'anello piperazinico, risulta di fondamentale importanza nell'indirizzare l'affinità dei composti verso un particolare sottotipo recettoriale. Infatti, i composti a nucleo N-idrossinorbornenico, quando combinati con i sostituenti sull'azoto 4- dell'anello piperazinico considerati nella prima serie (**2b-g** e **3b-g**), esibiscono una affinità elevata verso i recettori 5-HT_{1A}. Tale nucleo, invece, abbinato ai sostituenti della seconda serie (**2h-u** e **3h-u**) determina una maggiore affinità verso i recettori 5-HT_{2C} o un'attività mista 5-HT_{2A}/5-HT_{2C} che favorirebbe un loro potenziale profilo terapeutico come antiepilettici [56] o antipsicotici atipici [58]. I derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico (**8a-q**), invece, hanno mostrato preferenzialmente affinità e selettività nei confronti dei sottotipi recettoriali 5-HT_{1A} (K_i subnanomolare) o attività mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C}, delineando per questi composti un potenziale impiego terapeutico come ansiolitici [25-26]. I derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**13a-q**), infine, hanno presentato tendenzialmente un'affinità nei confronti del recettore 5-HT_{2A}, in alcuni casi con valori di K_i picomolare, che li rende interessanti ai fini di un ulteriore eventuale studio su linee cellulari del cancro della mammella [22].

Nell'ambito di ciascuna serie, inoltre, i sostituenti alifatici hanno determinato una scarsa o nessuna affinità per i recettori serotoninergici considerati, sottolineando la necessità di un sostituito aromatico opportunamente sostituito in tale posizione.

In aggiunta, anche la lunghezza della catena alchilica risulta influenzare i valori di affinità e selettività. La catena alchilica che favorisce l'affinità è una catena alchilica a tre termini.

Concludendo, gli interessanti risultati ottenuti da tale ricerca, accompagnati da ulteriori studi sia farmacologici che di *Molecular Modeling*, consentiranno di definire approfondite relazioni struttura-attività sulla base delle quali selezionare composti a potenziale impiego terapeutico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Erspamer V. (1966) *Handbook Exp.Pharmacol.*, **19** 132-181.
- 2) Sanders-Bush E., Mayer S.E. 5-Idrossitriptamina (serotonina): agonisti e antagonisti dei recettori. In *Le basi farmacologiche della terapia*. Goodman and Gilman (2006).
- 3) Serotonin distribution in tissues and fluids. In: *Availability, Localization and Disposition*. Essman, W.B., (Ed.). Vol.1, pp 15-179. Spectrum Publication, Inc. New York.
- 4) Garattini S.,Valzelli L. (Eds.) (1965). *Serotonin*. Elsevier, Amsterdam.
- 5) Baumgarten H.G.,Lachenmayer L.,Schlossberger H.G. (1972) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **125**, 553-569.
- 6) Baumgarten H.G.,Lachenmayer L.,Schelossberger H.G. (1973) *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **129**, 256-271.
- 7) Dählstrom A., Fuxe K.(1964). *Acta Physiol. Scand.* **232** (suppl. 62), 1-55.
- 8) Fuxe K., Jonsson G. (1974). In: *Serotonin New Vistas*. Costa E., Gessa G.L, Sandler M. (Eds.). Vol.2, pp.1-22. Raven Press, New York.
- 9) Blundel J.E.(1986) *Appetite* **7**, 39-56.
- 10) Coppen A.G.,Doogan D.P.(1988) *J.Chem.Psychiatry* **49**, 4-11
- 11) Charney D.S.,Woods S.W.,Goodman W.K.,Heninger G.R. (1987) *Psychopharmacology* **92**, 14-24
- 12) Zohar J., Insel T.R., Zohar-Kadouch R.C., Hill J.L., Murphy D.L. (1988) *Arch.Gen.Psychiatry* **45**, 167-172.
- 13) De Clerk F., Van Neuten J.M., Reneman R.S. (1984) *Agents Actions.* **15**, 612-626
- 14) Peach M.J., Loeb A.L., Singer H.A., Saye J. (1985) *Hypertension.* **7** suppl. I, 194-1100.
- 15) The IUPHAR Compendium of Receptor characterization and Classification. IUPHAR Media, London, UK, 1998
- 16) Mylecharane E.J., (1990) In: *Cardiovascular Pharmacology of 5-idrossitriptamine* , Saxena P.R., Wallis D.I., Wonters W., Bevan P. (Eds.), pp. 81-100, Klawer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 17) Peroutka S.J., Snyder S.H. (1979) *Mol. Pharmacol.* **16**, 687-699.
- 18) Pedigo N.W., Yamamura H.I., Nelson D.L. (1981) *J. Neurochem.* **36**, 220-226.

- 19) Pazos A., Hoyer D., Palacios J.M. (1984) *Eur. J. Pharmacol.* **106**, 539-546.
- 20) Heuring R.E., Peroutka S.J. (1987) *J. Neurosci.* **7**, 894-903.
- 21) Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylecharane E.J., Saxena P.R., Humphrey P.P.A. (1994) *Pharmacol. Rev.* **46**, 157-203.
- 22) Sonier B., Arsenault M., Lavigne C., Ouellette R.J., Vaillancourt C. (2006) *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **343**, 1053-1059.
- 23) Dizeyi N., Bjartell A., Nilsson E., Hansson J., Gadaleanu V., Cross N., Abrahamsson P.A.. (2004) *Prostate* **59**, 328-336.
- 24) Dizeyi N., Bjartell A., Hedlund P., Taskén K.A., Gadaleanu V., Abrahamsson P.A.. (2005) *Eur. Urol.* **47**, 895-900.
- 25) Lader M. (1982) *J. Clin. Psychiatr.* **43**, 62-68.
- 26) Peroutka S.J. (1985) *Biol. Psychiatry* **20**, 971-979.
- 27) Delgado P.L. (1990) *Arch. Gen. Psychiatry* **47**, 411-418.
- 28) Leysen J.E., Van Gompel P., Verwimp M., Niemegeers C.J.E., (1983). In: *C.N.S. receptors from molecular pharmacology to behaviour*, Mandell P., Defendis F.W. (Eds.), pp. 373-383, Raven Press, New York.
- 29) Stables R., Andrews P.L., Bailey H.E., Costall B., Gunning S.J., Hawthorn J., Naylor R.J., Tyers M.B. (1987) *Cancer Treat. Rev.* **14**, 333-336.
- 30) Bermudez J., Boyle E.A., Miner W.D., Sanger G.J. (1988) *Br. J. Cancer* **58**, 644-650.
- 31) Mann D.M., Yates P.O. (1983) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **46**, 96.
- 32) Bradley P.B., Humphrey P.P.A., Williams R.H. (1986) *Br. J.Pharmacol.* **87**, 3-4.
- 33) Connor H.E., Humphrey P.P.A., Feniuk W (1991). *Trends Cardiovasc. Med.* **1**, 205-210.
- 34) Schreiber R., Opitz K., Glaser T., De Vry J. (1993) *Psychopharmacology (Berl.)* **112**, 100-110.
- 35) Caliendo G., Greco G., Grieco P., Novellino E., Perissutti E., Santagada V., Barbarulo D., De Blasi A. (1996), *Eur. J. Med. Chem.* **31**, 207-213.
- 36) Caliendo G., Fiorino F., Grieco P., Perissutti E., Santagada V., Albrizio S., Spadola L., Bruni G., Romeo M.R. (1999) *Eur.J.Med.Chem.* **34**, 719-727.

- 37) Caliendo G., Fiorino F., Grieco P., Perissutti E., Santagada V., Severino B., Bruni G., Romeo M.R. (2000) *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 533-538.
- 38) Fiorino F., Severino B., De Angelis F., Perissutti E., Frecentese F., Massarelli P., Bruni G., Collavoli E., Santagada V., Calendo G., (2008) *Arc. Pharm. (Weinheim)* **341**, 20-27.
- 39) Caliendo G., Fiorino F., Perissutti E., Severino B., Gessi S., Cattabriga E., Borea P.A., Santagada V. (2001) *Eur.J.Med.Chem.* **36**, 873-886.
- 40) Caliendo G., Fiorino F., Perissutti E., Severino B., Sedan R., Gessi S., Cattabriga E., Borea P.A., Santagada V. (2002) *Eur.J.Pharm.Sciences* **16**, 15-28.
- 41) Fiorino F., Perissutti E., Severino B., Santagada V., Cirillo D., Terracciano S., Massarelli P., Bruni G., Collavoli E., Renner C., Caliendo G. (2005) *J. Med. Chem.* **48**(17), 5495-5503.
- 42) Van Steen B.J., van Wijngaarden I., Tulp M.T.M., Soudijn W., (1993) *J. Med. Chem.* **36**, 2751-2760.
- 43) Fiorino F., Severino B., De Angelis F., Perissutti E., Magli E., Frecentese F., Esposito A., Massarelli P., Nencini C., Viti B., Santagada V., Caliendo G. (2009) *Pharmazie* **64**, 555-564.
- 44) Nakajima T., Izawa T., Kashiwabara T., Nakajima S., Munezuka Y. (1994) *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 2475-2482.
- 45) Sauv e G., Rao V.S., Lajoie G., Belleau B. (1985) *Can. J. Chem.* **63**, 3089-3101.
- 46) Cheng Y.C., Prusoff W.H. (1973) *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108.
- 47) Scatchard G. (1949) *Ann. NY Acad. Sci.* **51**, 660-672.
- 48) Schlegel J.R., Periutka S.J. (1986) *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1943-1949.
- 49) Herndon J.L., Ismaniel A., Ingher S.P., Teitler M., Glennon R.A. (1992) *J. Med. Chem.* **35**, 4903-4910.
- 50) Billard W., Ruperto V., Crosby G., Iorio L.C., Barnett A. (1984) *Life Sci.* **35**, 1885-1893.
- 51) Creese I., Schneider R., Snyder S.H. (1977) *Eur.J.Pharmacol.* **46**, 377-381.
- 52) Greengrass P., Bremner R. (1979), *Eur.J.Pharmacol.* **55**, 323-326.
- 53) Perry B.D., U'Prichar D.C. (1981), *Eur.J.Pharmacol.* **76**, 461-464.

- 54) Isaac M. (2005) *Curr. Top. Med. Chem.* **5**, 59-67.
- 55) Sánchez C., Arnt J. (2000) *Behav. Pharmacol.* **11**, 291-298.
- 56) Zlatović M.V., Šukalović V.V, Schneider C., Roglić G.M. (2006) *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 2994-3001.
- 57) Abou-Gharbia M.A., Childers W.E., Fletcher Jr H., McGaughey G., Patel U., Webb M.B., Yardley J., Andree T., Boast C., Kucharik R.J., Marquis Jr K., Morris H., Scerni R., Moyer J.A. (1999) *J.Med.Chem.* **42**, 5077-5094.