

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "*FEDERICO II*"



FACOLTA' DI FARMACIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO
XXIV CICLO**

**SINTESI DI NUOVI LIGANDI DEI RECETTORI
SEROTONINERGICI E VALUTAZIONE
DELL'ATTIVITÀ ANTITUMORALE**

Coordinatore:

Prof. Maria Valeria D'Auria

Tutor:

Prof. Vincenzo Santagada

Candidata:

Dott.ssa Elisa Magli

INTRODUZIONE

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 che consente il passaggio anche di altri aminoacidi di grosse dimensioni, apolari 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 termina 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 delle membrane piastriniche (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 inoltre suggerita l'esistenza anche di altre vie metaboliche secondarie della 5-HT, come la solfatazione e la O- e N-metilazione [2].

Relativamente alla sua localizzazione, studi sperimentali hanno evidenziato, in particolare, 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 e da qui si dipartono sia vie ascendenti, che innervano le 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, in particolare di quelli ipofisari, come l'ormone somatotropo, la prolattina, la corticotropina e la tireotropina. Sono noti, inoltre, effetti inibitori sul comportamento sessuale probabilmente dovuti ad una 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 esplicata [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 e 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 comprendono: 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. Il ruolo della serotonina e dei suoi recettori nella crescita tumorale sarà più dettagliatamente discusso in uno dei successivi paragrafi di seguito riportati.

La serotonina ematica, ovvero 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 stesso.

Nell'uomo l'azione della serotonina sul circolo ematico 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, localizzate 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 quindi una triplice risposta sulla pressione arteriosa:

- iniziale transitoria ipotensione, sostenuta dalla stimolazione dei recettori 5-HT₃;
- 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;
- 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 inoltre 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. Esso, è, inoltre, 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 si è 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 valida, suggerisce la suddivisione in base alle caratteristiche farmacologiche, strutturali e trasduzionali 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].

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⁺.

1.3.1 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:

- inibizione nel sistema nervoso della liberazione di noradrenalina, serotonina e acetilcolina;
- influenza su alcune funzioni controllate dal SNC quali il comportamento, l'attività cardiovascolare e gastrointestinale;
- 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].

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 Cianopindololo 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, mesenterici	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 Risperidone Clozapina Metisergide 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 coroidi, Ponte, Striato, Ippocampo, Ipotalamo, endotelio, midollo spinale	α-metil-5-HT	Mesulergina	Emicrania
5-HT₃	Canale cationico	Striato, Ippocampo, S. nigra, gangli simpatici, neuroni sensitivi	2-metil-5-HT m-clorofenil- biguanide	Tropisetron Ondansetron Granisetron	Vomito
5-HT₄	G _s cAMP↑ Canali del Ca ⁺⁺ ↑ Canali K ⁺ ↓0	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-HT₆	G _s cAMP↑	Caudato, Putamen, Accumbens, Corteccia, Ippocampo, ganglio cervicale sup.	----	Ro046790	Psicosi ?
5-HT₇	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}.

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].

1.3.2 Recettori 5-HT₂

Riguardo ai recettori 5-HT₂, essi producono un aumento dell'idrolisi del fosfatidil-inositolo 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, associato al fatto che condividono il medesimo sistema di trasduzione (ciclo del fosfatidil-inositolo), ha indotto a considerare il recettore 5-HT_{1C} come un sottotipo recettoriale 5-HT₂. Infatti, secondo il più recente sistema di nomenclatura, i recettori 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 serotoninergici. 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:

- depolarizzazione di motoneuroni nel sistema nervoso;
- vasocostrizione;
- contrazione della muscolatura liscia gastrointestinale, bronchiale, urogenitale;
- 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 serotoninergici 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. Studi recenti, come di seguito riportato, hanno inoltre dimostrato il coinvolgimento dei recettori 5-HT_{2A} nelle linee cellulari

del carcinoma della mammella sottolineando la necessità di individuare antagonisti altamente selettivi per tale sottotipo recettoriale [22].

I recettori 5-HT_{2B} furono inizialmente identificati a livello gastrico; 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, inoltre, implicato nel controllo dei comportamenti alimentari e nella propensione a sviluppare convulsioni. Tuttavia, la mancanza di agonisti ed antagonisti selettivi per questi sottotipi recettoriali, 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 ansiolitici atipici.

1.3.3 Recettori 5-HT₃

Il recettore 5-HT₃ è assai particolare poiché è l'unico esempio di recettore per un trasmettitore monoaminico che funzioni 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.

1.3.4 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].

1.3.5 Altri recettori

Relativamente alle altre classi di recettori serotonergici, 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 serotonergici, 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 serotonergici 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 serotoninergico.

Sostanza farmaceutica	Principale indicazione clinica	Probabile meccanismo d'azione
Buspirone	Ansiolitico	Agonista parziale 5-HT _{1A} /antagonista D ₂
Cisapride Alizapride Bromapride	Disturbi motilità Gastrointestinale	5-HT ₄ /antagonista 5-HT ₃
Mianserina	Antidepressivo	Antagonista non selettivo
Almotriptan Naratripan Rizatriptan Sumatriptan Zolmitriptan	Anti emicrania	Agonisti 5-HT ₁
Metisergide	Anti emicrania	Antagonista 5-HT ₂ Agonista 5-HT _{1D} non selettivo
Ketanserina	Anti-ipertensivo	Antagonista 5-HT ₂ α_1 -adrenergico
Ondansetron Dolasetron Granisetron Tropisetron	Antiemetico	Antagonista 5-HT ₃
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

1.4 RUOLO DEI RECETTORI SEROTONINERGICI NELLA CRESCITA TUMORALE

La 5-HT, oltre ad essere coinvolta nella regolazione di molti processi fisiologici, ha diversi e opposti effetti sulla crescita tumorale. Gli effetti sia pro- che anti-tumorali indotti da tale neurotrasmettitore possono dipendere dalla presenza, sulle cellule, di recettori differenti, dal tipo di tumore [35] nonché dalla concentrazione di 5-HT. E' stato, infatti, dimostrato che la somministrazione esogena di alte dosi di 5-HT esercita un effetto mitogenico sulle cellule tumorali, mentre basse dosi sembrano ridurre la crescita dei tumori incidendo sull'apporto di sangue alla massa tumorale [36].

La 5-HT è, comunque, conosciuta come fattore di crescita per molti tipi di cellule, sia non tumorali (miociti della parete vasale, fibroblasti polmonari e renali mesangiali [37, 38]) che tumorali (carcinoidi pancreatiche, carcinomi polmonari a piccole cellule [39-42]).

E' stato, infatti, proposto che la 5-HT prenda parte a un loop autocrino di fattori di crescita che contribuisce alla proliferazione cellulare in tumori aggressivi come il carcinoma polmonare a piccole cellule. E' noto che le cellule di origine neuroendocrina secernono fattori di crescita, tra cui 5-HT e neuropeptidi, che possono agire sulle cellule adiacenti [36].

In molti tumori, tra cui quelli della prostata, del polmone, della vescica, ma anche nei carcinoidi e carcinoide-simili, si può osservare una differenziazione neuroendocrina delle cellule tumorali [43]. In particolare, è stato dimostrato, che molti tumori maligni della prostata sono caratterizzati da un'elevata sottopopolazione di cellule che esprimono un fenotipo neuroendocrino simile a quello del tumore primitivo. Esse, infatti, secernendo 5-HT e neuropeptidi, quali la somatostatina e la bombesina, stimolano: la crescita, la differenziazione, l'indipendenza dagli androgeni e l'angiogenesi delle cellule tumorali adiacenti. Ne consegue un aggravamento dello status tumorale e maggiore probabilità di morte del paziente [43].

Il carcinoma prostatico rappresenta, tutt'oggi, la seconda causa di morte per tumore più comune negli uomini dopo il carcinoma polmonare, sia negli Stati Uniti che in Europa. La deprivazione androgenica rappresenta l'unica terapia effettiva per il trattamento degli stadi avanzati del tumore, ossia nel momento in cui il tumore ha già metastatizzato [44]. La deprivazione androgenica può essere ottenuta con vari metodi riconducibili alla soppressione/inibizione della produzione di androgeni e inibizione dell'azione degli androgeni. Nei tempi passati, era frequente la castrazione chirurgica oggi, invece, si preferisce quella chimica. Purtroppo tale manovra terapeutica non è in grado di eliminare completamente e definitivamente tutta la popolazione tumorale; ciò è dovuto al fatto che le

cellule inizialmente dipendenti dagli androgeni per la loro crescita tendono a perdere tale dipendenza, fino ad arrivare a una completa androgeno-resistenza [45]. Diversi meccanismi, sia genetici che epigenetici, sono coinvolti nell'induzione di resistenza all'ormono-terapia dei tumori della prostata. Alcuni esempi dei principali meccanismi messi in campo dalle cellule tumorali per sviluppare una resistenza al trattamento sono:

- attivazione autocrina di recettori e del segnale a valle da essi mediato;
- induzione dell'espressione di oncoproteine anti-apoptotiche (come ad esempio bcl-2);
- differenziazione delle cellule staminali prostatiche verso un fenotipo neuroendocrino.

E' stato, infatti, riportato che lunghi periodi di terapia anti-androgenica dei tumori prostatici inducono un aumento di cellule con fenotipo neuroendocrino [46], guidando il tumore verso un fenotipo più aggressivo [47].

Come per il tumore prostatico, anche il tumore della vescica è spesso caratterizzato da un elevato numero di cellule con fenotipo neuroendocrino.

Studi preclinici hanno dimostrato che la linea cellulare derivante da tumore della prostata PC3 esprime sulla membrana i recettori della 5-HT del tipo 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}; anche la linea cellulare derivante da tumore della vescica HT1376 esprime recettori serotoninergici ed in particolare 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}. In queste linee cellulari è stato dimostrato che la 5-HT induce la proliferazione cellulare in maniera dose dipendente, ed il trattamento con antagonisti del recettore della serotonina 5-HT_{1A}, come il NAN-190, inibisce la crescita cellulare in maniera dose-dipendente [48].

Come è stato precedentemente evidenziato i recettori serotoninergici 5-HT_{1A} si differenziano strutturalmente dagli altri sottotipi recettoriali serotoninergici mostrando, invece, un alto grado di omologia con i recettori adrenergici. Ciò spiegherebbe perché numerosi agenti adrenergici si legano con elevata affinità ai recettori 5-HT_{1A} [49]. Non a caso la doxazosina, un farmaco anti-adrenergico, è in grado esso stesso di inibire la proliferazione delle cellule di tumore prostatico (PC3) e di tumore alla vescica (HT1376), agendo come antagonista dei recettori 5-HT_{1A} [50].

E' stato inoltre dimostrato che la 5-HT ha un effetto mitogenico sulle cellule derivanti da tumore della mammella (MCF-7), almeno in parte, attraverso l'espressione sulla membrana cellulare del recettore 5-HT_{2A} [51].

Il sottotipo recettoriale 5-HT_{1D}, espresso anche sulla membrana delle cellule PC3, sembra implicato in un effetto di migliore vascolarizzazione del tumore, essendo esso collocato in grande quantità sulle pareti delle cellule vasali dell'area tumorale [52], provocandone vasodilatazione.

Infatti, come precedentemente riportato, la 5-HT gioca un ruolo fondamentale nella regolazione del calibro vasale ed è in grado di sortire diversi effetti a seconda del recettore su cui agisce. Essa, infatti, induce vasocostrizione mediante l'attivazione dei recettori serotoninergici 5-HT_{1D} e 5-HT_{2A} sulle cellule muscolari della parete vasale [52] e vasodilatazione inducendo l'attivazione del recettore 5-HT_{2B} sulle cellule endoteliali; tale effetto è mediato dal rilascio di fattori rilassanti la muscolatura [53]. Inoltre, la 5-HT è in grado di stimolare l'ossido nitrico sintasi (eNOS) [54] che non solo partecipa normalmente al processo fisiologico di vasodilatazione attraverso la produzione di ossido nitrico (NO), uno dei maggiori fattori in grado di far rilasciare la muscolatura endoteliale [55], ma è in grado anche di stimolare l'angiogenesi tumorale [56].

E' stato recentemente dimostrato che un inibitore specifico del recettore 5-HT_{2B} (SB204741) non solo è in grado di inibire la capacità delle cellule tumorali polmonari di impiantarsi in topi deficitari del trasportatore della 5-HT, ma anche di inibire in cellule endoteliali derivanti da cordone ombelicale umano (HUVEC), l'induzione di eNOS e l'attivazione/fosforilazione delle proteine mitogeniche ERK1/2 (MAPK) mediato dalla 5-HT. Un inibitore specifico del recettore 5-HT_{2C} (RS102221), non è in grado di inibire l'induzione di eNOS e l'attivazione di ERK1/2 mediato dalla 5-HT a dimostrazione che tali effetti indotti dalla 5-HT sono mediati dal sottotipo recettoriale 5-HT_{2B} [57].

IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

2. IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

In considerazione delle innumerevoli potenzialità terapeutiche dei ligandi serotoninergici, nonché del recente coinvolgimento della serotonina e dei suoi recettori nella crescita tumorale, e in considerazione della scarsa disponibilità di farmaci attivi e selettivi sul sistema serotoninergico, la ricerca in tale settore appare ancora più che mai viva e attiva.

Il mio lavoro di dottorato è stato essenzialmente rivolto ai seguenti due indirizzi:

1. **Sintesi di nuovi ligandi dei recettori serotoninergici e valutazione dell'attività antitumorale** [58, 59, 60];
2. **Sintesi di nuovi ligandi dei recettori serotoninergici mediante nuove metodologie sintetiche** [61].

Il gruppo di ricerca con il quale ho svolto il mio progetto 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 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. Sono state, infatti, sintetizzate diverse serie di composti, a nucleo benzotriazolico [62], benzoiltriazolico [63], benzotriazinonico [64-65], idrossibenzotriazinonico, saccarinico [66-67] ed N-idrossinorbornenico [68].

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 dai dati presenti in letteratura [62-68], sembrano modulare in modo particolare l'affinità e la selettività nei confronti del sottotipo recettoriale 5HT_{1A} [69].

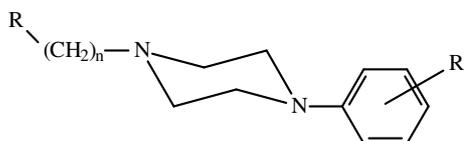


Figura 1. Struttura generale dei composti arilpiperazinici.

Nell'ambito dell'ultima serie di composti sintetizzati, a nucleo N-idrossinorbornenico [68], sono stati individuati 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.

La valutazione dei risultati ottenuti per questi composti, precedentemente sintetizzati, 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 polimetilenica che del sostituente 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, nonché al fine della valutazione dei ligandi serotoninergici di nostro interesse nella modulazione della crescita tumorale, il progetto di ricerca ha previsto in un primo momento la sintesi di nuove molecole che vanno ad ampliare le serie a nucleo benzotriazinonico, idrossibenzotriazinonico e N-idrossinorbornenico. Tali composti sono caratterizzati dalla presenza in posizione -4 dell'anello piperazinico di un residuo naftilico. In particolare il residuo naftilico è stato selezionato sulla base di studi precedenti [70], che hanno evidenziato come questo "scaffold", agendo da antagonista dei sottotipi recettoriali 5-HT_{2A}, sia risultato capace di inibire l'induzione di tumori cutanei, probabilmente attraverso un meccanismo apoptotico (**Figura 2**).

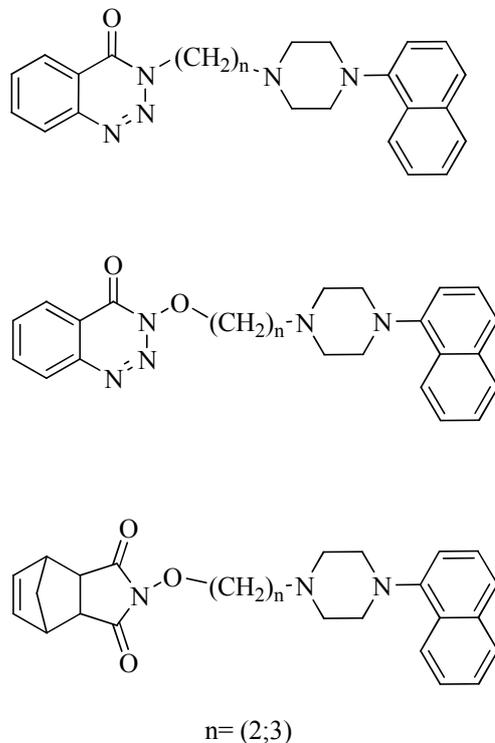


Figura 2. Derivati naftilpiperazinici a nucleo benzotriazinonico, idrossibenzotriazinonico e idrossinorbornenico.

Parallelamente al completamento delle serie a nucleo benzotriazinonico, idrossibenzotriazinonico e N-idrossinorbornenico, sono state progettate e sintetizzate due nuove serie di derivati caratterizzati dalla presenza di due diversi nuclei eterociclici: l'N'-cianoisonicotinamidinico e l'N'-cianopicolinamidinico. L'obiettivo di tale studio è quello di verificare se la diversa posizione dell'azoto eterociclico in tali nuclei possa 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 della catena carboniosa che nella serie a nucleo N-idrossinorbornenico aveva fornito i migliori risultati di affinità e selettività recettoriale), ad un anello piperazinico-4-X-sostituito. Nella scelta dei sostituenti sono stati considerati quelli utilizzati nelle serie precedentemente sintetizzate e che da una analisi retrospettiva dei dati presenti in letteratura, consentono una migliore interazione con i recettori serotoninergici (**Figura 3**). La scelta di tali sostituenti trova giustificazione non solo nella possibilità di valutarne l'influenza sull'affinità e sulla selettività nei confronti dei sottotipi recettoriali presi in esame (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}), ma anche nella valutazione della capacità di modulare l'attività antiproliferativa nei confronti delle linee cellulari di carcinoma prostatico PC3.

Idonee procedure di sintesi, purificazione e caratterizzazione hanno portato all'ottenimento di tutti i derivati oggetto del progetto di ricerca (Figure 2 e 3). Tutti i composti sintetizzati sono stati sottoposti a saggi di *binding* con radioligandi al fine di valutarne l'affinità e la selettività verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}. Inoltre, i composti di ogni serie risultati più attivi, sono stati selezionati e sottoposti a ulteriori saggi di binding sui recettori dopaminergici D₁ e D₂ ed i recettori adrenergici α_1 e α_2 . Infine, i composti di tutte le serie considerate, che hanno mostrato il miglior profilo affinità/selettività verso i sottotipi recettoriali presi in esame, sono stati successivamente sottoposti a saggi farmacologici, al fine di valutarne la capacità antiproliferativa e, per i composti più promettenti, è stato investigato il meccanismo molecolare responsabile dell'attività antiproliferativa.

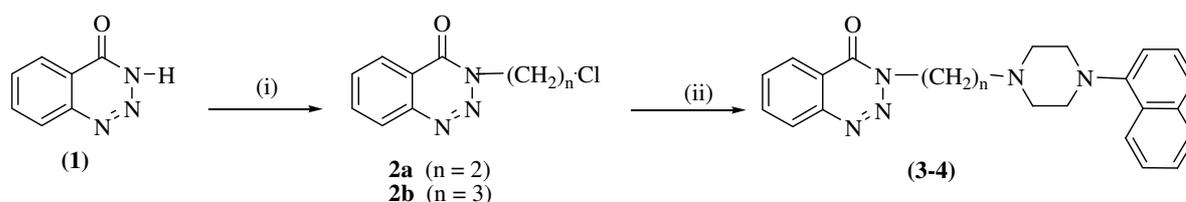
PARTE SPERIMENTALE

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. SOMMARIO DELLE OPERAZIONI

3.1.1 DERIVATI A NUCLEO BENZOTRIAZINONICO [58].

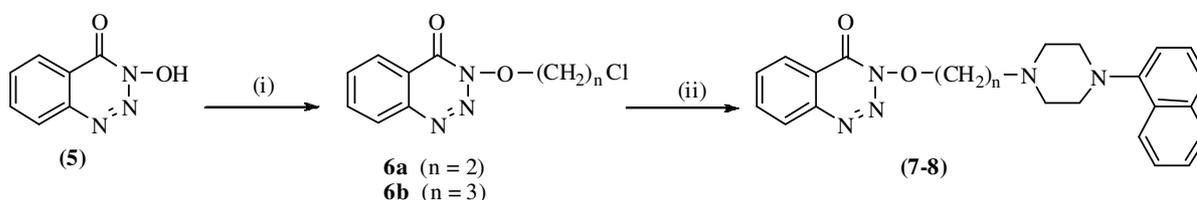
La strategia sintetica utilizzata per la preparazione dei derivati benzotriazinonici (**3-4**) è riportata nello **Schema 1**. L'alchilazione dell'anello eterociclico di partenza 1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (**1**) con 1-bromo-2-cloroetano o 1-bromo-3-cloropropano, in presenza di K_2CO_3 in DMF, fornisce i corrispondenti derivati cloroalchilbenzotriazinonici (**2a** e **2b**). Gli intermedi così ottenuti vengono condensati con la 1-naftil-piperazina in presenza di K_2CO_3 e NaI in DMF a refluxo per 24 ore fornendo i composti finali **3** e **4**. I prodotti vengono 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.



Schema 1. Reagenti e condizioni: (i) $Br(CH_2)_nCl$, K_2CO_3 , DMF, $70^\circ C$, 24h; (ii) 1-naftil-piperazina, K_2CO_3 , NaI, DMF, refluxo, 24h.

3.1.2 DERIVATI A NUCLEO IDROSSIBENZOTRIAZINONICO [58].

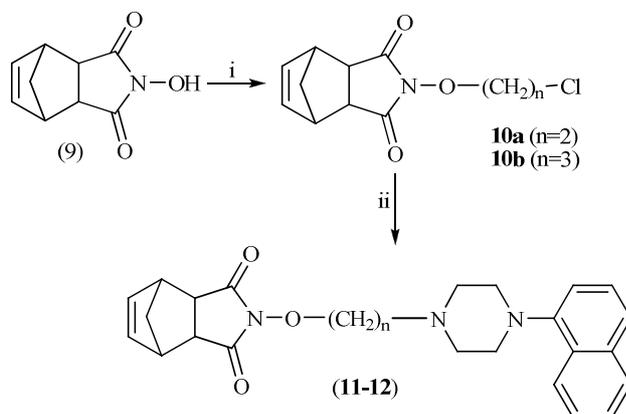
La strategia sintetica utilizzata per la preparazione dei composti **7** e **8**, riportata nello **Schema 2**, risulta analoga a quella dei composti **3** e **4** a partire dal 3-idrossi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (**5**).



Schema 2. Reagenti e condizioni: (i) $Br(CH_2)_nCl$, K_2CO_3 , DMF, $70^\circ C$, 24h; (ii) 1-naftil-piperazina, K_2CO_3 , NaI, DMF, refluxo, 24h.

3.1.3 DERIVATI A NUCLEO NORBORNENICO [58].

I composti **11** e **12** sono stati sintetizzati seguendo la procedura illustrata nello **Schema 3**. L'alchilazione dell'eterociclo di partenza l'endo-N-idrossi-5-norbornene-2,3-dicarbossimide (**9**) con l'1-bromo-2-cloroetano o con l'1-bromo-3-cloropropano, in presenza di NaOH in etanolo assoluto a 70°C per 24 ore, porta ai corrispondenti 2-cloro-etilossi (**10a**) e 3-cloro-propossi (**10b**) derivati. La successiva condensazione degli intermedi **10a** e **10b** con la 1-naftil-piperazina in presenza di K₂CO₃ e NaI in CH₃CN a riflusso per 24 ore, fornisce i composti **11** e **12**. I prodotti finali sono stati isolati mediante cromatografia su colonna di gel di silice, purificati mediante cristallizzazione da etere/etanolo e caratterizzati mediante ¹H-NMR, ¹³C-NMR e ESI-MS.



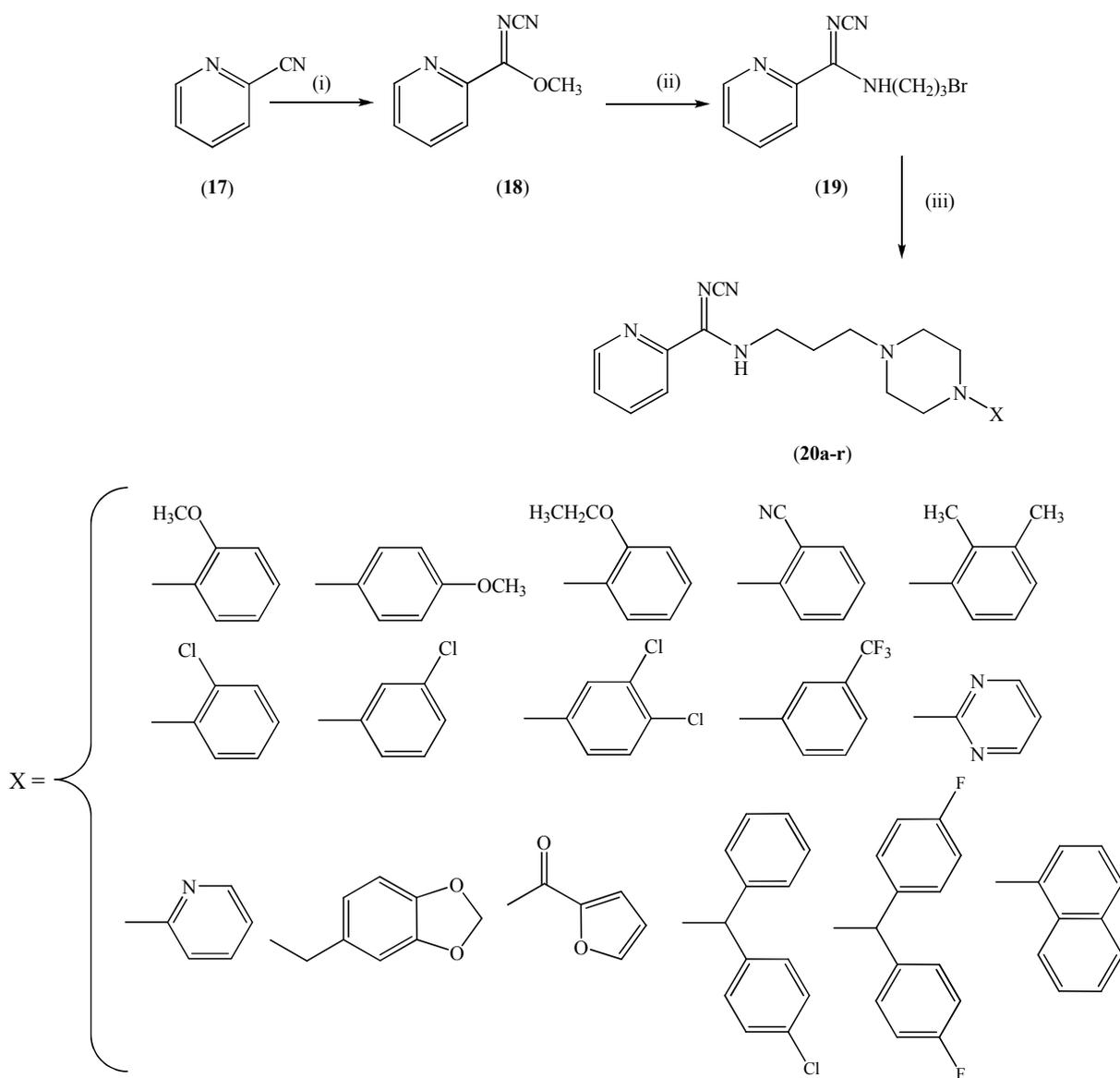
Schema 3. Reagenti e condizioni: (i) Br(CH₂)_nCl, NaOH, EtOH assoluto, 70 °C, 24 h; (ii) 1-naftil-piperazina, K₂CO₃, NaI, CH₃CN, riflusso, 24 h.

3.1.4 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOISONICOTINAMIDINICO [59].

La preparazione dei derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidico è stata, invece, effettuata seguendo le tappe illustrate nello **Schema 4**. Il composto di partenza, la 4-cianopiridina (**13**), viene trattato con isopropanolo in presenza di CH₃ONa e successivamente con NH₂CN in tampone fosfato per fornire il derivato (**14**) che viene fatto reagire con la 3-bromopropilammina bromidrato in presenza di metossido di sodio in metanolo anidro fornendo l'intermedio **15**. La successiva condensazione della N-(3-bromopropil)-N'-cianoisonicotinamidina (**15**) con le opportune piperazine N-sostituite in presenza di K₂CO₃, NaI in acetonitrile a 70°C per 4 ore fornisce i composti finali **16a-r**. I prodotti finali **16a-r**, così ottenuti, vengono isolati mediante cromatografia su colonna di gel di silice, purificati

piridincarbossimmidato grezzo, 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-piridincarbossimmidato (**18**).

La reazione del composto **18** con la 3-bromopropilammina bromidrato, in presenza di TEA e metanolo anidro, fornisce l'N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (**19**). 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 (**20a-r**), che vengono successivamente 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.



Schema 5. Reagenti e condizioni: (i) CH_3ONa , H_2NCN , CH_3OH anidro; (ii) $\text{Br}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2 \cdot \text{HBr}$, TEA, CH_3OH anidro; (iii) Piperazina-4-X-sostituita, K_2CO_3 , NaI, CH_3CN , 70°C .

3.2 PROCEDIMENTI SPERIMENTALI DELLE SINTESI [58].

3.2.1 DERIVATI A NUCLEO BENZOTRIAZINONICO

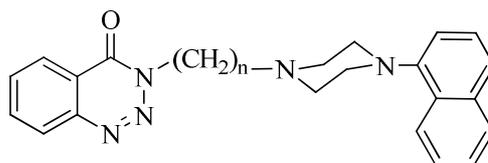
3.2.1.1 Sintesi dei derivati 2 o 3-cloroalchil-1,2,3-benzotriazinonici (Schema 1: composti 2a e 2b)

Una miscela di 1-bromo-2-cloroetano o 1-bromo-3-cloropropano (0.09 mol), 1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (**1**) (0.03 mol) e K_2CO_3 (0.05 mol) in DMF (70 ml) viene tenuta sotto agitazione e.m. a 70°C per 24 ore. Dopo raffreddamento, la miscela viene portata a secco ed il residuo viene disciolto in H_2O (50 ml); la soluzione viene, quindi, estratta tre volte con diclorometano. La fase organica viene anidrificata, concentrata e purificata mediante colonna di gel di silice (etere/metanolo, 9:1, v/v) per fornire i corrispondenti derivati cloroalchilbenzotriazinonici (**2a** e **2b**) con una resa compresa tra il 90 ed il 96%. Gli spettri 1H -NMR per tutti gli intermedi confermano le strutture proposte.

3.2.1.2 Procedura generale di sintesi per i prodotti finali (Schema 1: composti 3 e 4)

Viene riportata a titolo di esempio la sintesi del 3-{2-[4-(naftil)-1-piperazinil]etil}benzotriazinone (**3**). Una miscela di (**2a**) (0.03 mol), N-naftilpiperazina (0.03 mol), ioduro di sodio (0.05 mol) e K_2CO_3 (0.05 mol) in DMF (50 ml), viene tenuta sotto agitazione e.m. e a ricadere per 24 ore. Dopo il raffreddamento, la miscela è stata portata a secco ed il residuo sciolto in H_2O (50 ml). La soluzione viene estratta 3 volte con diclorometano. La fase organica viene anidrificata, concentrata e purificata su colonna di gel di silice (etere/etanolo, 9:1, v/v) per dare il composto finale **3** come solido bianco cristallino (resa 71%). I prodotti isolati sono stati trasformati nei corrispondenti sali cloridrati e successivamente cristallizzati. In **Tabella 3** sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 3. Proprietà chimico-fisiche dei derivati 1,2,3-benzotriazinonici (**3-4**)



Composto	n	Formula	p.f. (°C)	Resa %
3	2	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O·HCl	246-248	71
4	3	C ₂₄ H ₂₅ N ₅ O·HCl	251-253	82

I composti sono cristallizzati da etanolo e da etere dietilico.

3.2.2 DERIVATI A NUCLEO IDROSSIBENZOTRIAZINONICO [58].

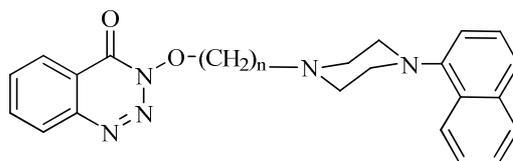
3.2.2.1 Sintesi dei derivati 2 o 3-cloroalchilossi-benzotriazinonici (Schema 2: composti **4a** e **4b**)

Una miscela di 1-bromo-2-cloroetano o 1-bromo-3-cloropropano (0.09 mol), 3-idrossi-1,2,3-benzotriazin-4(3H)-one (**5**) (0.03 mol) e K₂CO₃ (0.05 mol) in DMF (70 ml), viene tenuta sotto agitazione e.m. a 70°C per 24 ore. Dopo raffreddamento, la miscela viene portata a secco ed il residuo viene disciolto in H₂O (50 ml); la soluzione viene, quindi, estratta tre volte con diclorometano. La fase organica viene anidrificata, concentrata e purificata mediante colonna di gel di silice (etere/metanolo, 9:1, v/v) per fornire i corrispondenti derivati cloroalchilossibenzotriazinonici (**6a** e **6b**) con una resa compresa tra il 90 ed il 96%. Gli spettri ¹H-NMR per tutti gli intermedi confermano le strutture proposte.

3.2.2.2 Procedura generale di sintesi per i composti (Schema 2: composti **7** e **8**)

Viene riportata a titolo di esempio la sintesi del 3-{2-[4-(naftil)-1-piperazinil]etilossi}benzotriazinone (**7**). Una miscela di (**6a**) (0.03 mol), N-naftilpiperazina (0.03 mol), ioduro di sodio (0.05 mol) e K₂CO₃ (0.05 mol) in DMF (50 ml), viene tenuta sotto agitazione e.m. e a ricadere per 24 ore. Dopo il raffreddamento, la miscela è stata portata a secco ed il residuo sciolto in H₂O (50 ml). La soluzione viene estratta 3 volte con diclorometano. La fase organica viene anidrificata, concentrata e purificata su colonna di gel di silice (etere/etanolo, 9:1, v/v) per dare il composto finale **7** come solido bianco cristallino (resa 30%). In **Tabella 4** sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 4 – Proprietà chimico-fisiche dei derivati 3-idrossi-1,2,3-benzotriazinonici (**7-8**)



Composto	n	Formula	p.f.(°C)	Resa %
7	2	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O ₂	85-87	30
8	3	C ₂₄ H ₂₅ N ₅ O ₂	90-92	45

I composti sono cristallizzati da etanolo e da etere dietilico.

3.2.3 DERIVATI A NUCLEO N-IDROSSINORBORNENICO [58].

3.2.3.1 Procedura generale per la preparazione degli intermedi **2** e **3**-(cloroalchilossi)-**5**-norbornene-**2,3**-dicarbossimide (Schema 3: composti **10a** e **10b**)

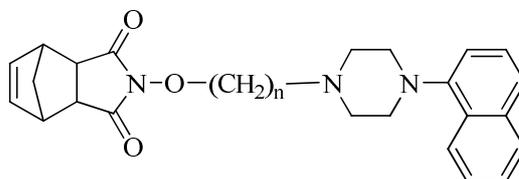
Una soluzione di etanolo assoluto (50 mL) e NaOH (0.018 mol) viene fatta reagire con 0.018 mol di (3aR,4S,7R,7aS)-endo,cis-N-idrossi-5-norbornene-2,3-dicarbossimide (**9**), commercialmente disponibile, e 0.018 mol di 1-bromo-2-cloroetano o 1-bromo-3-cloropropano. La miscela di reazione viene tenuta 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 (40 mL) ed estratto per tre volte, in imbuto separatore, con diclorometano. Le fasi organiche riunite vengono anidificate 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 **10a** (p.f.: 56-58°C) e **10b** (p.f.: 59-61°C), con una resa rispettivamente dell'80% e 94%.

3.2.3.2 Procedura generale per la preparazione dei prodotti finali (Schema 3: **11** e **12**)

Una miscela di 4-(2-cloroetossi)-4-aza-triciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione (**10a**) o di 4-(3-cloropropossi)-4-aza-triciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-8-ene-3,5-dione (**10b**) (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 1-naftilpiperazina (0.03 mol). La miscela di reazione così ottenuta viene tenuta sotto agitazione e.m. 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 v/v; 9:1 v/v). La successiva cristallizzazione da dietilere/etanolo fornisce i composti finali **11** e **12**. In **Tabella 5** sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 5. Proprietà chimico-fisiche dei derivati N-idrossinorbornenici (**11-12**).



Composto	n	Formula	p.f. (°C)	Resa (%)
11	2	$C_{25}H_{27}N_3O_3$	126-128	50
12	3	$C_{26}H_{29}N_3O_3$	125-127	55

I composti sono cristallizzati da etanolo e da etere dietilico.

3.2.4 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOISONICOTINAMIDINICO [59].

3.2.4.1 Sintesi dell'isopropil N'-ciano-4-piridincarbossimmidato (Schema 4: composto **14**)

Una miscela composta dalla 4-cianopiridina (**13**) (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 (18,6 g; 0.11 mol), il quale come composto grezzo (olio bruno) viene immediatamente aggiunto ad una miscela di NH_2CN (0,21 mol) in tampone fosfato (65,55 g di $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$; 14,9 g di Na_2HPO_4 ; 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 Na_2SO_4 anidro, viene filtrata ed evaporata sotto vuoto per fornire il corrispondente isopropil N'-ciano-4-piridincarbossimmidato grezzo (**14**, 21,9 g).

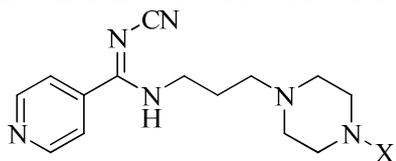
3.2.4.2 N-(3-bromopropil)-N'-cianoisonicotinamidina (Schema 4: composto 15)

Ad una soluzione di isopropil-N'-ciano-4-piridincarbossimmidato (**14**) (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 Na_2SO_4 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 (**15**) sottoforma di solido bianco: p.f. 115-117°C.

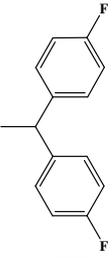
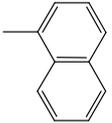
3.2.4.3 Procedura generale per la preparazione dei derivati N'-cianoisonicotinamidinici (Schema 4: 16a-r)

Una miscela costituita dall'N-(3-bromopropil)-N'-cianoisonicotinamidina (**15**) (0,006 mol) e NaI (0,009 mol) in acetonitrile è portata a riflusso, sotto agitazione e.m., per 30 minuti. Successivamente, viene aggiunta l'opportuna piperazina 4-X-sostituita (0,006 mol) e il K_2CO_3 anidro (0,009 mol). La miscela di reazione così ottenuta viene lasciata a ricadere sotto agitazione e.m. per 3-4 ore. Interrotta la reazione, si procede alla filtrazione per allontanare il K_2CO_3 ; successivamente 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 Na_2SO_4 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 dietil etere/metanolo in diversi rapporti). I composti così isolati, vengono cristallizzati da etere o da etere/etanolo ottenendo così i prodotti finali **16a-r**. In **Tabella 6** sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 6. Proprietà chimico-fisiche dei derivati N'-cianoisonicotinamidinici (**16a-r**).



Composto	X	Formula	p.f. (°C)	Resa (%)
16a		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	147-148	25
16b		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	132-133	40
16c		C ₂₂ H ₂₈ N ₆ O	117-119	25
16d		C ₂₁ H ₂₃ N ₇	169-171	20
16e		C ₂₂ H ₂₈ N ₆	156-158	34
16f		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	121-122	26
16g		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	125-126	26
16h		C ₂₀ H ₂₂ Cl ₂ N ₆	153-155	23
16i		C ₂₁ H ₂₃ F ₃ N ₆	135-137	21
16l		C ₁₈ H ₂₂ N ₈	105-107	20
16m		C ₁₉ H ₂₃ N ₇	93-97	15
16n		C ₂₂ H ₂₆ N ₆ O ₂	118-119	35
16o		C ₁₉ H ₂₂ N ₆ O ₂	119-121	22
16p		C ₂₇ H ₂₉ ClN ₆	209-211	27

16q		$C_{27}H_{28}F_2N_6$	117-118	25
16r		$C_{24}H_{26}N_6$	158-160	25

I composti sono cristallizzati da etere o da etanolo e da etere dietilico.

3.2.5 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO [60].

3.2.5.1 Sintesi del metil-N'-ciano-2-piridincarbossimmidato (Schema 5: composto 18)

Una miscela di 2-cianopiridina (**17**) (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), partendo 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-piridincarbossimmidato grezzo (26,3 g; 0.193 mol) come un olio bruno. L'intermedio, senza essere purificato viene immediatamente aggiunto ad una miscela di NH_2CN (0,384 mol) in tampone fosfato (68,60 g di $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 15,62 g Na_2HPO_4 , 140 mL di H_2O) 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 anidificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate ed evaporate sotto vuoto per fornire il corrispondente metil-N'-ciano-4-piridincarbossimmidato grezzo (**18**) (19 g), che viene utilizzato direttamente nella reazione successiva.

3.2.5.2 N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (Schema 5: composto 19)

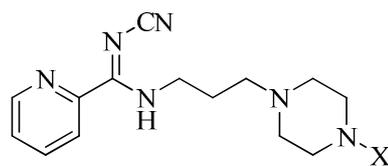
Ad una soluzione di metil-N'-ciano-2-piridincarbossimmidato (**18**) (0,118 mol) in metanolo anidro (50 mL) viene successivamente aggiunta la 3-bromopropilammina bromidrata (0,129 mol) e la trietilammina (0,129 mol). La miscela di reazione è lasciata sotto agitazione e.m. per 4 ore a temperatura ambiente. 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 utilizzando come eluente una miscela dietilere/etanolo (9,5:0,5 v/v). Il prodotto isolato è cristallizzato ottenendo il prodotto desiderato (**19**) sottoforma di solido bruno (resa del 63%; p.f. 73-74°C).

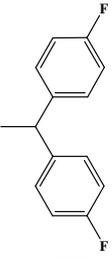
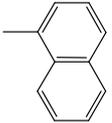
3.2.5.3 Procedura generale per la preparazione dei derivati N'-cianopicolinamidinici (Schema 5: 20a-r)

Una miscela di N-(3-bromopropil)-N'-cianopicolinamidina (**19**) (0,006 mol) e NaI (0,009 mol) in acetonitrile 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 e.m. 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 **20a-r**. In **Tabella 7** sono riportate le rese percentuali e i punti di fusione di ciascun prodotto sintetizzato.

Tabella 7. Proprietà chimico-fisiche dei derivati N'-cianopicolinamidinici (**20a-r**).



Composto	X	Formula	p.f. (°C)	Resa (%)
20a		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	113-116	20
20b		C ₂₁ H ₂₆ N ₆ O	106-108	15
20c		C ₂₂ H ₂₈ N ₆ O	122-125	14
20d		C ₂₁ H ₂₃ N ₇	118-120	20
20e		C ₂₂ H ₂₈ N ₆	119-120	15
20f		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	86-88	26
20g		C ₂₀ H ₂₃ ClN ₆	148-149	30
20h		C ₂₀ H ₂₂ Cl ₂ N ₆	127-128	28
20i		C ₂₁ H ₂₃ F ₃ N ₆	115-116	24
20l		C ₁₈ H ₂₂ N ₈	110-111	27
20m		C ₁₉ H ₂₃ N ₇	90-92	16
20n		C ₂₂ H ₂₆ N ₆ O ₂	104-105	63
20o		C ₁₉ H ₂₂ N ₆ O ₂	102-104	29
20p		C ₂₇ H ₂₉ ClN ₆	93-94	32

20q		$C_{27}H_{28}F_2N_6$	132-133	32
20r		$C_{24}H_{26}N_6$	148-150	45

I composti sono cristallizzati da etanolo e da etere dietilico o da etere dietilico ed esano.

3.3 ANALISI STRUTTURALE DEI DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOISONICOTINAMIDINICO E N'-CIANOPICOLINAMIDINICO [59 e 60].

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 4**).

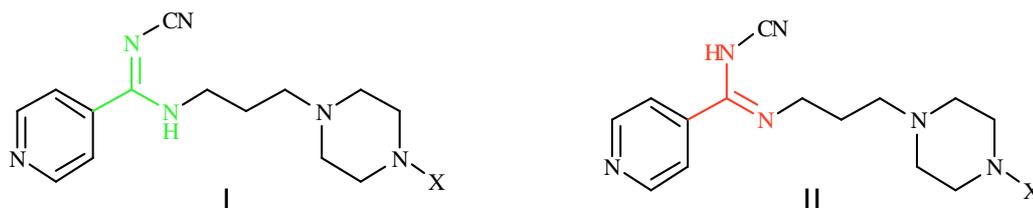


Figura 4. Tautomeri dei derivati cianoamidinici.

Gli spettri NMR ottenuti per i composti finali **16a-r** e **20a-r** hanno confermato che tutti i prodotti finali esistono nella forma predominante cianoiminica (I), che è risultata essere quella prevalente anche in ulteriori studi riportati in letteratura [71].

Inoltre, per quanto riguarda la determinazione della configurazione degli isomeri geometrici (*E/Z*) sul doppio legame amidinico C=N, i derivati **16a-r** e **20a-r** esibiscono un solo set di segnali negli esperimenti di $^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$, 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 [72]. 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 **16a-r** e **20a-r**, mentre per altri l'equilibrio   pi  lento, determinando la possibilit  di identificare la presenza di entrambi gli isomeri attraverso esperimenti di $^1\text{H-NMR}$.

3.4 MATERIALI

I reagenti e le piperazine opportunamente sostituite sono commercialmente disponibili da Sigma-Aldrich. Tutte le reazioni descritte sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile (TLC) usando lastre di gel di silice del tipo confezionato della Merck

Kieselgel 60 F-254 con indicatore di fluorescenza, di dimensioni 5x10 cm e come eluente miscele di opportuni solventi.

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.

3.5 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 Melting Point B-540.

SPERIMENTAZIONE

FARMACOLOGICA

4. SPERIMENTAZIONE FARMACOLOGICA

4.1 GENERALITA'

I prodotti sintetizzati sono stati sottoposti a sperimentazione farmacologica presso il Dipartimento di Farmacologia "G. Segre" dell'Università degli Studi di Siena e l'Unità di Farmacologia Sperimentale dell'Istituto Nazionale dei Tumori "G. Pascale" di Napoli.

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, α₁ e α₂, 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 α₁ e [³H]yohimbina per i recettori α₂. 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 la 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 [73] 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 [74].

4.2 SAGGI DI BINDING

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

Per la preparazione dei recettori 5-HT_{1A} è stato impiegato il metodo di Schlegel et al [75]. La corteccia cerebrale di ratti maschi Sprague-Dawley è stata omogenata in 20 volumi di tampone freddo Tris-HCl (50 nM, 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).

4.2.2 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 [76]. 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 Schleicher 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%.

4.2.3 Saggi di binding: D₁

Per la preparazione dei recettori D₁ è stato impiegato il metodo descritto da Billard et al. [77]. 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.

4.2.4 Saggio di binding: D₂

Per la preparazione dei recettori D₂ è stato impiegato il metodo di Creese et al. [78]. 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.

4.2.5 Saggio di binding: α₁

La procedura utilizzata in tali saggi sui recettori α₁ è stata riportata in dettaglio da Greengrass e Bremner [79]. 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.

4.2.6 Saggio di binding: α_2

Per la preparazione dei recettori α_2 è stato impiegato il metodo di Perry e U'Prichard [80]. 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 [3 H]-yohimbina è stato determinato come differenza tra il legame in assenza ed in presenza della fentolamina 10 μ M.

4.3 COLTURE CELLULARI

La linea cellulare PC3, derivante da carcinoma umano alla prostata, è stata mantenuta in coltura in RPMI 1640. Il mezzo è stato arricchito con 10% di siero bovino fetale inattivato al calore, 50 unità/mL di penicillina, 500 μ g/mL di streptomicina e 4 mmol/L di glutammina. L'RPMI 1640 Medium, l'FBS, la penicillina, la streptomicina e la glutammina sono tutti della Cabrex Bio Science, Verviers, Belgium. Le cellule sono state cresciute in un'atmosfera umidificata composta da 95% aria e 5% CO₂ a 37°C [58].

4.4 SAGGI DI PROLIFERAZIONE CELLULARE

La proliferazione cellulare è stata valutata in presenza e assenza di concentrazioni crescenti dei composti sintetizzati, NAN-190 bromidrato (NAN-190, Sigma-Aldrich Co , St. Louis, MO, USA), S(-)-8-Idrossi-DPAT bromidrato (8-OH, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) e Topotecan (Hycamtin®, GlaxoSmithKline S.p.A.- Brentford, UK), mediante saggio colorimetrico con Sulforodamina B (SRB, ICN Biomedicals, Irvine,CA,USA) realizzato in quadruplicato, piastrando 1×10^3 cellule PC3 per punto, in mezzo contenente il 10% di FBS, in piastre da 96 pozzetti (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes , NJ, USA). Dopo 24 ore il mezzo è stato sostituito con nuovo mezzo contenente il 10% di FBS o l'1% di FBS e le cellule sono state trattate con i farmaci. Dopo 96 ore dal trattamento le cellule sono state lavate una volta in PBS 1x (Buffer fosfato salino: 8 g di NaCl, 0.2 g di KCl, 1.8 g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.24 g di KH_2PO_4 , pH 7.4) e poi sono state fissate a 4°C con 50 µl di TCA (Acido Tricloroacetico) al 50%. Dopo 1 ora sono stati effettuati 5 lavaggi in acqua distillata e le piastre sono state colorate con 100 µl per pozzetto di Sulforodamina B allo 0.4% disciolta in acido acetico all'1%. Dopo 30 minuti, a temperatura ambiente, sono stati effettuati 4 lavaggi in acido acetico all'1%. Il colorante è stato estratto con Tris 10 mM pH 10.5 e valutato per la densità ottica a 540 nm mediante lettore ELISA. La crescita è stata valutata come percentuale rispetto alle cellule non trattate [58].

4.5 ANALISI CICLO CELLULARE

Le cellule PC3 sono state piastrate in mezzo contenente il 10% di FBS e dopo 24 ore questo è stato sostituito con del mezzo contenente l'1% di FBS e le cellule sono state quindi trattate con i composti **3**, **4**, NAN-190, 8-OH-DPAT e Topotecan alle concentrazioni indicate. Dopo 24 e 48 ore le cellule sono state raccolte. In particolare, è stato recuperato il surnatante; le cellule sono state poi lavate in PBS 1x e staccate con tripsina; la reazione è stata bloccata con l'aggiunta di PBS 1x freddo. Dopo due lavaggi in PBS 1x, le cellule sono state contate e fissate in etanolo al 70% ad una concentrazione di 1×10^6 cellule/ml e quindi conservate a -20 °C in modo da poter poi effettuare l'analisi al citofluorimetro di tutti i campioni contemporaneamente.

Prima di procedere alla colorazione del DNA, le cellule sono state lavate due volte in PBS 1x e quindi colorate con Ioduro di Propidio (PI) incubandole per circa due ore al buio con una soluzione di PI 50 µg/ml (1 ml di PI per milione di cellule), 12.5 µl di RNasi e 12.5 µl di NP-40 0.1%.

L'analisi è stata effettuata usando un citofluorimetro a flusso FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). La fluorescenza, letta al programma CellQuest-Pro (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), è stata indicata nel grafico come Channels. Essa è stata misurata come impulsi di ampiezza proporzionale al numero di molecole di PI presenti, ossia legate al DNA. Per ogni campione sono stati acquisiti 20000 eventi e l'analisi del ciclo cellulare è stata eseguita con il programma ModFit LT (verity Software House, Inc., Topsham, ME, USA). Sull'asse delle X è stata riportata l'intensità di fluorescenza e sull'asse delle Y è stato riportato il numero di cellule presenti nella fase del ciclo corrispondente. La percentuale di cellule apoptotiche è stata calcolata nella regione di contenuto di DNA sub-diploide [58].

4.6 SAGGIO DELL'APOPTOSI CON ANNESSINA V-FITC

Le cellule PC3 sono state piastrate in mezzo contenente il 10% di FBS e dopo 24 ore questo è stato sostituito con del mezzo contenente l'1% di FBS e le cellule sono state quindi trattate con i composti **3**, **4**, NAN-190, 8-OH-DPAT e Topotecan alle concentrazioni indicate. Dopo 24 e 48 ore le cellule sono state raccolte. In particolare, è stato recuperato il surnatante; le cellule sono state poi lavate in PBS 1x e staccate con tripsina. Dopo due lavaggi con PBS 1x, le cellule sono state risospese in 500 µl di PBS 1% freddo e ai campioni sono stati aggiunti 5 µl di Annessina V-FITC (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e incubati al buio, a temperatura ambiente (20-25 °C) per 15 minuti. L'analisi è stata effettuata mediante un citofluorimetro FACScan. Nella valutazione dell'apoptosi la fluorescenza, letta con il programma CellQuest-Pro (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), è indicata come FL1 [58].

4.7 PREPARAZIONE DEI LISATI CELLULARI E DOSAGGIO DELLE PROTEINE

Per l'analisi dell'espressione di pMAPK, MAPK, pAKT e AKT, le cellule PC3 sono state piastrate e dopo 24 ore trattate con i composti **3**, **4**, NAN-190, 8-OH-DPAT e Topotecan alle dosi indicate e raccolte dopo 48 ore. Le cellule sono state lavate e raccolte in PBS 1X in ghiaccio. I pellets, ottenuti dopo una centrifugazione a 1300 rpm a 4 °C, sono stati lisati per un'ora in ghiaccio in un buffer contenente NP40 (0,5%), HEPES 50 mM (pH 7), NaCl 250 mM, EDTA 5 mM (pH 8), Na pirofosfato 50 nM, Na ortovanadato 0,5 mM, NaF 50 mM, Aprotinina (5 µl/ml), PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoridrato) 0.5 mM, DTT 1 mM, Leupeptina (1-2 µg/mL), Benzamidina (5 µg/mL), Pepstatina (1 µg/mL). I campioni sono stati centrifugati a 4°C per 10 minuti e il surnatante è stato utilizzato per gli esperimenti. La concentrazione totale delle proteine è stata determinata mediante metodo Lowry. A 5 µl di

campione sono stati aggiunti 1.5 ml di una soluzione costituita da Lowry A (190 mM Na₂CO₃, 100 mM NaOH, 0.7 mM NaK tartato) e Lowry B (20 mM CuSO₄ H₂O) in rapporto 49:1. Successivamente sono stati aggiunti 150 µl di una soluzione costituita da acqua e dal reagente folinico (Folin & Ciocalteu's Phenol reagent, Sigma), in rapporto 7:5. La reazione avviene per venti minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza dei campioni è misurata mediante spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 660 nm. Concentrazioni crescenti di albumina bovina sierica sono state usate come standard. I lisati proteici, prima di essere caricati su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti, sono stati denaturati per 5 minuti a 100°C in Sample Buffer 1X (Sample Buffer 5X: Tris 10 mg/ml, SDS 30 mg/ml, β-mercaptoetanolo 0.15 ml, glicerolo 0.3 ml, blue di bromofenolo) [58].

4.8 IMMUNOBLOTTING

Per l'analisi dell'espressione delle proteine, i campioni di lisati cellulari sono stati separati su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti a differente percentuale in base al peso molecolare delle proteine da analizzare. Dopo trasferimento delle proteine dal gel su filtro di nitrocellulosa, i siti di interazione idrofobica presenti sul filtro sono stati bloccati, allo scopo di evitare interazioni aspecifiche, incubando i filtri per MAPK, pMAPK, pAKT, AKT, in latte all'1% in TBS 1X (Tris buffered saline, 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl)-triton 0,5%. A questo punto i filtri sono stati incubati per tutta la notte a 4 °C, in presenza dell'anticorpo primario specifico per la proteina di interesse in una soluzione di latte 0,5% in TBS 1X-triton 0,5% per MAPK, pMAPK, pAKT e AKT.

Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario i filtri, sono stati sottoposti a 3 lavaggi da 10 minuti in TBS triton 0,5%; altri 3 lavaggi successivi sempre da 10 minuti in TBS 1x e poi i filtri sono stati incubati nuovamente in latte al 1% in TBS triton 0,5 % per 1 ora in presenza di un anticorpo secondario specifico coniugato con HRP. Sono stati quindi eseguiti altri 3 lavaggi da 10 minuti in TBS triton 0,5% e 3 lavaggi successivi sempre da 10 minuti in TBS 1x. A questo punto le proteine di interesse sono state visualizzate mediante una reazione di chemiluminescenza ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Per l'analisi dell'espressione di pMAPK, MAPK, pAKT e AKT, le proteine totali sono state separate mediante SDS-PAGE al 10% di acrilamide. Gli anticorpi primari per pMAPK, MAPK, pAKT e AKT sono della Cell Signaling Technology, Inc.(Boston, MA, USA) e sono stati diluiti 1:1000. Gli anticorpi secondari, tutti coniugati con perossidasi, sono della Bio-Rad (Richmond, CA, USA) e sono stati diluiti 1:2000 [58].

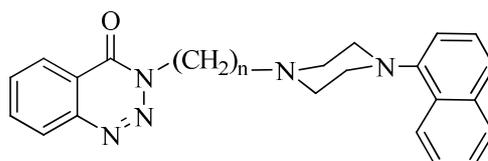
RISULTATI E DISCUSSIONE

5. RISULTATI E DISCUSSIONE [58-60].

5.1 DERIVATI NAFTILPIPERAZINICI (3, 4, 7, 8, 11 e 12)

I valori di affinità dei derivati naftilpiperazिनici a nucleo benzotriazinonico, Idrossibenzotriazinonico e Norbornenico (**3**, **4**, **7**, **8**, **11** e **12**) 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 nelle **Tabelle 8, 9 e 10**.

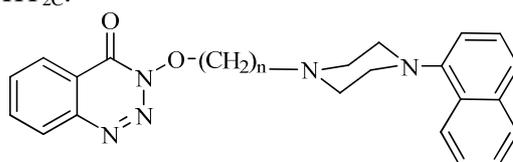
Tabella 8. Valori di affinità K_i (nM) dei composti a nucleo benzotriazinonico **3** e **4** per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Affinità recettoriale ^a K _i ± SD (nM)				
Composto	n	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{2C}
		[³ H]8OH-DPAT	[³ H]Ketanserina	[³ H]Mesulergina
3	2	0.000178 ± 0.00003	5.29 ± 0.3	>10 ⁴
4	3	7.79 ± 0.06	127 ± 17	>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.

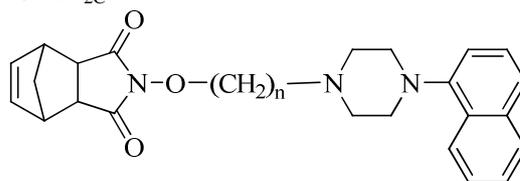
Tabella 9. Valori di affinità K_i (nM) dei composti a nucleo Idrossibenzotriazinonico **7** e **8** per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Affinità recettoriale ^a K _i ± SD (nM)				
Composto	n	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{2C}
		[³ H]8OH-DPAT	[³ H]Ketanserina	[³ H]Mesulergina
7	2	>10 ⁴	1320 ± 119	-
8	3	>10 ⁴	721 ± 33.7	-

^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.

Tabella 10. Valori di affinità K_i (nM) dei composti a nucleo N-idrossinorborenico **11** e **12** per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Affinità recettoriale ^a $K_i \pm SD$ (nM)				
Composto	n	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{2C}
		[³ H]8OH-DPAT	[³ H]Ketanserina	[³ H]Mesulergina
11	2	1.58 ± 0.134	113 ± 49.8	-
12	3	0.293 ± 0.025	91.8 ± 5.1	-

^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, si evince come tutti i derivati naftilpiperazinicici, ad eccezione di quelli a nucleo idrossibenzotriazinonico (**7** e **8**), hanno mostrato a concentrazioni nanomolari o subnanomolari, un'elevata affinità e selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}.

In particolare, il composto **3**, è quello che presenta una maggiore affinità di legame per il recettore 5-HT_{1A} con un valore di K_i pari a 0.000178 nM. I valori di K_i degli altri composti possono essere raggruppati in un intervallo ristretto che va da 0.293 nM (**12**) a 7.79 nM (**4**). Solo i composti **7** e **8**, come precedentemente anticipato, hanno esibito una scarsa affinità verso il recettore 5-HT_{1A}, con valori di K_i > di 10⁴ nM.

Le affinità di legame dei composti testati sui recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} sono risultate sempre più basse rispetto a quelle osservate verso i recettori 5-HT_{1A}. Infatti, si riscontrano valori di K_i per i recettori 5-HT_{2A} che vanno da un minimo di 5.29 nM per il composto **3** ad un massimo di 1320 nM per il composto **7**. Tali composti non hanno mostrato alcuna affinità di legame o bassissimi valori di affinità per il recettore 5-HT_{2C} (K_i > di 10⁴ nM).

Successivamente, i derivati naftilpiperazinicici di tutte le serie considerate, sono stati testati mediante saggi di binding sui recettori D₁, D₂, α_1 e α_2 (**Tabella 11**) confermando, anche in questo caso, un'elevata selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}. Infatti, ad eccezione del composto **8**, per il quale si è registrato un valore di affinità verso il recettore D₂ di 85.4 nM, i derivati naftilpiperazinicici non hanno mostrato una significativa affinità verso i recettori dopaminergici con valori di K_i sempre > di 10⁴ nM. I soli composti **3** e **12** hanno invece esibito una moderata affinità verso i recettori adrenergici α_1 e α_2 (K_i = 112 e 189 nM, rispettivamente). Infine si può quindi affermare che i derivati naftilpiperazinicici, considerati a completamento delle serie arilpiperaziniciche a nucleo benzotriazinonico,

idrossibenzotriazinonico e norbornenico precedentemente sintetizzate [60,62,64], hanno confermato un elevato profilo di affinità e selettività per i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A}; tale selettività è stata confermata anche nei confronti dei recettori adrenergici e dopaminergici. Quest'ultimo aspetto risulta particolarmente interessante alla luce dell'elevato grado di omologia mostrata dalla sequenza amminoacidica della porzione transmembranaria del recettore 5-HT_{1A} con quella del recettore adrenergico α_1 .

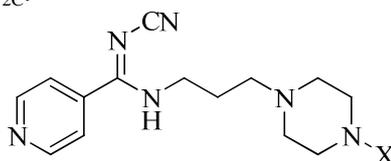
Tabella 11. Valori di affinità Ki (nM) dei composti **3**, **4**, **7**, **8**, **11** e **12** per i recettori D₁, D₂, α_1 e α_2 .

Composto	Affinità recettoriale Ki \pm SD (nM)			
	D ₁ [³ H]SCH-23390	D ₂ [³ H]Spiperone	α_1 [³ H]Prazosina	α_2 [³ H]Yohimbine
3	>10 ⁴	>10 ⁴	112 \pm 47	1880 \pm 107
4	>10 ⁴	>10 ⁴	562 \pm 170	3600 \pm 458
7	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
8	>10 ⁴	85.4 \pm 0.41	800 \pm 6.3	>10 ⁴
11	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	1200 \pm 175
12	>10 ⁴	263 \pm 5.8	>10 ⁴	189 \pm 21.8

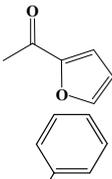
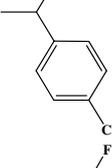
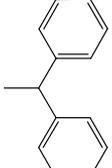
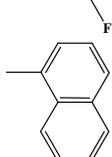
5.2 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOISONICOTINAMIDINICO (16a-r)

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 **16a-r** ed espressi come valori di costante di inibizione K_i (nM) sono riportati in **Tabella 12**.

Tabella 12. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati a nucleo N'-cianoisonicotinoamidinico (**16a-r**) per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Composto	X	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
16a		1.47 ± 0.05	>10 ⁴	—
16b		>10 ⁴	>10 ⁴	—
16c		21.3 ± 0.8	1900 ± 100	11.5 ± 3
16d		—	>10 ⁴	—
16e		101 ± 38	>10 ⁴	—
16f		166 ± 8	>10 ⁴	—
16g		6.17 ± 0.14	>10 ⁴	—
16h		23.2 ± 1.1	264 ± 37.5	6.48 ± 0.219
16i		141 ± 9	32.1 ± 0.5	—
16l		172 ± 24	—	—
16m		0.038 ± 0.001	—	—
16n		>10 ⁴	>10 ⁴	—

16o		$>10^4$	$>10^4$	—
16p		$>10^4$	918 ± 8.5	$>10^4$
16q		—	3010 ± 152	—
16r		$>10^4$	172 ± 11.5	—

^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 generato prodotti che hanno mostrato nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} un'affinità da media ad elevata; in particolare i composti **16a**, **16g** e **16m** 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 e selettività nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} è quello caratterizzato da un residuo piridinipiperazinico (**16m**), con un valore di K_i pari a 0,0379 nM; inoltre i derivati **16a** e **16g** supportanti in posizione -4 dell'anello piperazinico rispettivamente un residuo *o*-OCH₃-fenilico e *m*-Cl-fenilico, hanno 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.

Seppur con valori di affinità inferiori a quelli mostrati dai derivati **16a**, **16g** e **16m**, anche con i derivati **16c** e **16h**, supportanti rispettivamente un residuo *o*-OCH₂CH₃-fenilpiperazinico e 3,4 diclorofenilpiperazinico, si evidenzia una buona affinità nei confronti dei recettori 5-HT_{1A} (con K_i di 21.3 nM e 23.2 nM) accompagnata da una buona selettività verso il recettore 5-HT_{2A} e da una contemporanea discreta affinità verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2C} (K_i di 11.5 nM e 6.48 nM); tali risultati indicano, quindi, per questi composti (**16c** e **16h**), un'attività mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C}. Inoltre, alla luce di una potenziale attività antiproliferativa dei derivati

naftilpiperazinici, è interessante notare il profilo di affinità e selettività del derivato **16r** verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} (K_i di 172 nM).

I derivati che hanno mostrato il miglior profilo di affinità/selettività (**16a**, **16c**, **16g**, **16m** e **16r**), in relazione ai valori di binding verso i recettori serotoninergici, sono stati valutati mediante saggi di binding sui recettori D₁, D₂, α_1 e α_2 (**Tabella 13**) confermando per i derivati **16a**, **16g** e **16m**, un'elevata selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} ed evidenziando, invece, un profilo di attività mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C} per il composto **16c**, seppur accompagnata da una moderata affinità verso i recettori adrenergici α_1 e α_2 .

Confrontando i risultati ottenuti per i derivati a nucleo N'-Cianoisonicotiamidinico (**16a-r**) con quelli dei derivati a nucleo N-idrossinorbornenico precedentemente sintetizzati [64] è possibile elaborare alcune considerazioni. Ancora una volta un derivato *o*-OCH₃-fenilpiperazinico (**16a**) si è rivelato tra i composti maggiormente attivi; ciò sembrerebbe essere riconducibile alla capacità di formare un legame a idrogeno con l'Asn-386 presente nel sito di legame del recettore [64]. Inoltre è interessante notare come anche questo derivato (**16a**) presenti un ponte metilenico a tre atomi di carbonio tra il nucleo eterociclico e il residuo arilpiperazinico.

Alla luce dei risultati di binding del composto **16b** è possibile inoltre confermare quanto precedentemente riportato in letteratura [81], ovvero che la presenza di un sostituente in posizione *para* di un residuo fenilpiperazinico rende estremamente sfavorevole l'interazione con il recettore 5-HT_{1A}, a causa delle avverse interazioni steriche che intervengono tra il sostituente in posizione *para* e il residuo di 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 né l'affinità né la selettività; infatti, seppure i derivati **16c** e **16i** siano gli unici a presentare una moderata affinità rispettivamente per il recettore 5-HT_{2C} (K_i=11.5 nM) e per il recettore 5-HT_{2A} (K_i=32.1 nM), in entrambi i casi vi è una scarsa selettività dovuta alla 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 metilene ai residui arilpiperazinici variamente sostituiti, ha determinato l'ottenimento di una nuova serie di composti caratterizzati da un'elevata affinità e selettività verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{1A} [59], delineandone tra l'altro un potenziale utilizzo terapeutico come ansiolitici [25-26].

Tabella 13. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati a nucleo N'-cianoisonicotinoamidinici (**16a**, **16c**, **16g**, **16m** e **16r**) per i recettori D_1 , D_2 , α_1 e α_2 .

Composto	Affinità recettoriale $K_i \pm SD$ (nM)			
	D_1 [³ H]SCH-23390	D_2 [³ H]spiperone	α_1 [³ H]prazosina	α_2 [³ H]yohimbina
16a	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	2570 ± 258
16c	>10 ⁴	>10 ⁴	190 ± 57.9	516 ± 63.6
16g	1630 ± 60	>10 ⁴	912 ± 10.6	>10 ⁴
16m	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴	>10 ⁴
16r	>10 ⁴	1600 ± 137	>10 ⁴	878 ± 28.2

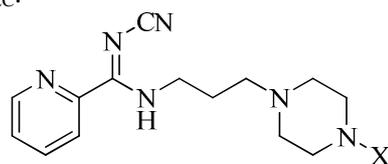
5.3 DERIVATI A NUCLEO N'-CIANOPICOLINAMIDINICO (**20a-r**)

Infine, i valori di affinità dei composti sintetizzati **20a-r** 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 14**.

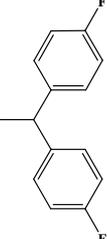
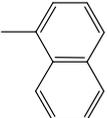
Dall'analisi dei risultati riportati in Tabella 14 emerge un dato molto interessante: l'introduzione del nucleo N'-cianopicolinamidinico, in sostituzione del nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, ha determinato, per la maggior parte dei nuovi composti, uno spostamento dell'affinità dai recettori 5-HT_{1A} verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{2A}.

In particolare, i derivati *o*-OCH₃-fenilpiperazinico (**20a**; $K_i=0.00157$ nM), *m*-Cl-fenilpiperazinico (**20g**; $K_i=0.000185$ nM), *m*-CF₃-fenilpiperazinico (**20i**; $K_i=0.000778$ nM) e pirimidinipiperazinico (**20l**; $K_i=0.0161$ nM) hanno rivelato non solo un ottimo profilo di affinità verso i sottotipi recettoriali 5-HT_{2A}, ma anche una considerevole selettività dal momento che i loro valori di K_i risultano 10000 (per **20g** e **20i**) o 1000 (per **20a** e **20l**) 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 dei sostituenti sul residuo fenilpiperazinico. Questo aspetto risulta palese con il composto **20b**, dove contrariamente a quanto precedentemente affermato per i derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico, la presenza di un sostituito -OCH₃ in posizione *para* del residuo fenilpiperazinico determina una significativa affinità di binding verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} e una contemporanea assenza di legame verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{2A} ($K_i > 10^4$ nM).

Tabella 14. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**20a-r**) per i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}.



Composto	X	Affinità recettoriale $^3K_i \pm SD$ (nM)		
		5-HT _{1A} [³ H]8OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H]Ketanserina	5-HT _{2C} [³ H]Mesulergina
20a		4.68 ± 0.389	0.00157 ± 0.000106	1.61 ± 0.458
20b		0.0842 ± 0.00088	>10 ⁴	—
20c		17.2 ± 1.36	2730 ± 143	—
20d		>10 ⁴	904 ± 10.2	28.8 ± 2.67
20e		30 ± 1.79	0.867 ± 0.0308	29.7 ± 2.14
20f		170 ± 11.7	27 ± 0.97	—
20g		6.67 ± 0.070	0.000185 ± 0.0000168	3.28 ± 0.223
20h		>10 ⁴	93.3 ± 2.87	45.1 ± 4.86
20i		1.31 ± 0.263	0.000778 ± 0.0000331	1.81 ± 0.178
20l		3080 ± 154	0.0161 ± 0.00120	22.5 ± 1.74
20m		30.6 ± 2.20	1.12 ± 0.178	>10 ⁴
20n		>10 ⁴	51.8 ± 0.27	—
20o		>10 ⁴	21.5 ± 0.21	—
20p		>10 ⁴	>10 ⁴	—

20q		—	504 ± 39.5	21.4 ± 1.22
20r		5.85 ± 0.187	224 ± 12.8	—

^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.

Questi risultati possono essere ascritti alla presenza dell'azoto in posizione -2 del nucleo piridinico che, creando interazioni addizionali con il recettore, favorirebbe una migliore accomodazione del ligando all'interno del sito di binding determinandone così una distanza utile alla formazione di un legame a idrogeno dell'Asn 386 con il residuo metossilico in posizione *para* [64, 66, 68].

Inoltre, altri derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico, pur mantenendo una discreta affinità verso il recettore 5-HT_{1A}, non risultano essere selettivi. Questo dato potrebbe render conto o di una maggiore adattabilità conformazionale dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinici (**20a-r**), o di particolari proprietà chimico-fisiche del nucleo stesso che lo rendono capace di interagire con i diversi sottotipi recettoriali considerati.

Sulla base dei risultati farmacologici ottenuti per i derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**20a-r**) e a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico (**16a-r**), è possibile elaborare alcune considerazioni riguardo la posizione, all'interno dei nuclei eterociclici, dell'atomo di azoto piridinico, che costituisce l'unica differenza strutturale tra le due serie di derivati arilpiperazinici. Tali risultati possono essere spiegati considerando la topografia del sito di legame del recettore 5-HT_{2A}. Infatti, studi di molecular modelling, insieme a dettagliati studi di mutagenesi sito-specifica, hanno suggerito la presenza di una tasca idrofobica, che circonda i ligandi, costituita da residui di aminoacidi aromatici come il Trp-151, Phe-243, Phe-244, Trp-336, Phe-339, Phe-340, Trp-367 e Tyr-370. Inoltre le porzioni polari dei ligandi possono interagire con i residui di Ser-159, Thr-160, Ser-239, Ser-242 e Asn-343, presenti nel sito di legame del recettore 5-HT_{2A}. Infine, le funzioni amminiche protonate, così come si presenta l'azoto dell'anello piperazinico, formano interazioni elettrostatiche con un residuo conservato di aspartato (Asp-159) presente nella terza elica transmembranaria.

Inoltre, il recettore 5-HT_{2A} umano e quello di ratto (oggetto del nostro studio) mostrano un alto grado di omologia nella loro sequenza amminoacidica, presentando entrambi nella quinta elica transmembranaria un residuo di Ser-239, mentre, laddove è presente un residuo di Ser-242, nel recettore murino è presente un residuo di alanina. I residui di Ser-239 e Ser-242 nel recettore umano sono inoltre coinvolti nella formazione di legami a idrogeno con il gruppo ossidrilico aromatico e l'NH indolico della serotonina. Tuttavia, sebbene nel recettore di ratto il residuo di Ser-242 risulta mutato con un residuo di alanina, l'NH indolico può comunque formare legami a idrogeno con le catene laterali di un residuo di Ser-159 o Thr-160. Sulla base di queste considerazioni è possibile ipotizzare che così come l'NH indolico della serotonina forma legami a idrogeno con le catene laterali dei residui di Ser-159 o Thr-160, il doppietto elettronico dell'atomo di azoto piridinico presente nel nucleo N'-cianopicolinamidinico può formare legami a idrogeno con gli stessi residui amminoacidici. Quindi la differente posizione dell'atomo di azoto nel sistema aromatico dei nuclei N'-cianopicolinamidinico e N'-cianoisonicotinamidinico, può spiegare la diversa tendenza a formare legami a idrogeno con i residui di Ser-159 o Thr-160 e il conseguente differente profilo di affinità e selettività dei derivati N'-cianopicolinamidinici verso il recettore 5-HT_{2A} e dei derivati N'-cianoisonicotinamidinici verso i recettori 5-HT_{1A}[60].

I dati riportati in **Tabella 15**, infine, mostrano come tutti i composti sottoposti ai saggi di *binding* nei confronti dei recettori dopaminergici D₁ e D₂ e adrenergici α_1 e α_2 mostrino scarsa o nulla affinità confermando, anche per questa serie, una buona selettività nei confronti dei recettori serotoninergici.

Tabella 15. Valori di affinità K_i (nM) dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinici (**20a**, **20b**, **20e**, **20g**, **20i**, **20l**, **20m** e **20r**) per i recettori D_1 , D_2 , α_1 e α_2 .

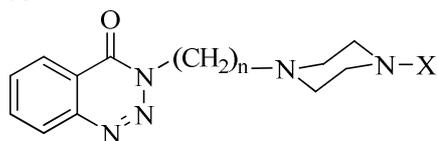
Composto	Affinità recettoriale $K_i \pm SD$ (nM)			
	D_1 [³ H]SCH-23390	D_2 [³ H]Spiperone	α_1 [³ H]Prazosina	α_2 [³ H]Yohimbine
20a	$>10^4$	$>10^4$	105 ± 28.1	245 ± 37.7
20b	$>10^4$	$>10^4$	$>10^4$	—
20c	52.4 ± 3.57	$>10^4$	152 ± 7.4	571 ± 38.4
20e	$>10^4$	$>10^4$	729 ± 9.3	318 ± 7.8
20g	381 ± 33	$>10^4$	174 ± 19.2	1360 ± 77
20i	$>10^4$	83.7 ± 3.23	770 ± 15.9	$>10^4$
20l	$>10^4$	$>10^4$	$>10^4$	—
20m	$>10^4$	$>10^4$	130 ± 11.9	$>10^4$
20n	—	—	—	964 ± 67.0
20o	—	—	—	$>10^4$
20r	$>10^4$	$>10^4$	$>10^4$	$>10^4$

5.4 EFFETTI ANTIPROLIFERATIVI DEI COMPOSTI A NUCLEO BENZOTRIAZINONICO, IDROSSIBENZOTRIAZINONICO, NORBORNENICO, N'-CIANOISONICOTINAMIDINICO E N'-CIANOPICOLINAMIDINICO

Come precedentemente anticipato, al fine di definirne il profilo biologico e il potenziale terapeutico nell'attività antitumorale che vede coinvolti i recettori serotoninergici, i composti sintetizzati e taluni derivati arilpiperazिनici appartenenti alle serie precedentemente sintetizzate a nucleo benzotriazinonico, idrossibenzotriazinonico, norbornenico, sono stati selezionati e sottoposti a saggi di attività antiproliferativa su linee cellulari PC3 derivanti da carcinoma prostatico umano e che esprimono sulla membrana i recettori della serotonina del tipo 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} [82]. I derivati arilpiperazिनici, sono stati selezionati sulla base del loro profilo di affinità e selettività che avevano mostrato nei confronti dei recettori serotoninergici nonché del sistema adrenergico e dopaminergico.

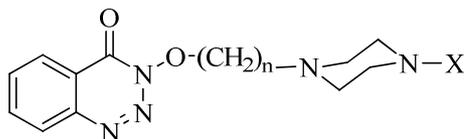
I risultati, riportati nelle **Tabelle 16-20**, dimostrano che numerosi derivati arilpiperazिनici inducono, dopo 96 ore dal trattamento, una inibizione della crescita dose-dipendente delle cellule PC3 con valori di IC₅₀ (concentrazione che inibisce il 50 % la proliferazione cellulare) compresi tra 10.5 e 96 μ M.

Tabella 16. Attività antiproliferativa dei derivati a nucleo benzotriazinonico (**3**, **4** e **5a-b**) su cellule di carcinoma prostatico PC3.



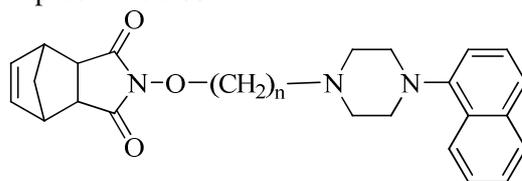
Composto	n	X	IC ₅₀ mM a 96h
3	2		10.6 ± 2.06
4	3		10.5 ± 1.66
5a	2		N.A
5b	3		N.A

Tabella 17. Attività antiproliferativa dei derivati a nucleo idrossibenzotriazinonico (**7**, **8** e **9a-h**) su cellule di carcinoma prostatico PC3.



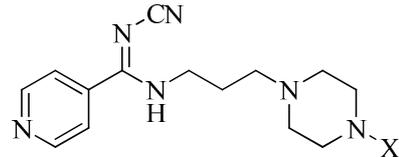
Composto	n	X	IC ₅₀ mM a 96h
7	2		10.6 ± 2.06
8	3		10.5 ± 1.66
9a	2		N.A
9b	3		N.A
9c	2		N.A
9d	3		N.A
9e	2		N.A
9f	3		21.3 ± 1.37
9g	2		N.A
9h	3		N.A

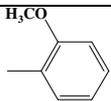
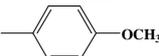
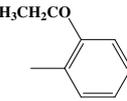
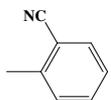
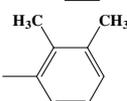
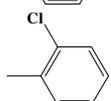
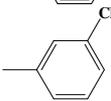
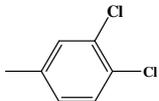
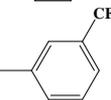
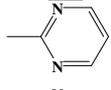
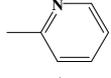
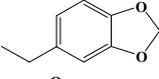
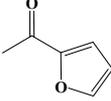
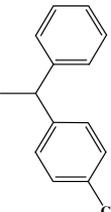
Tabella 18. Attività antiproliferativa dei derivati a nucleo Idrossibenzotriazinonico (**11**, **12** e **13a-h**) su cellule di carcinoma prostatico PC3.



Composto	n	X	IC ₅₀ mM a 96h
11	2		47.7 ± 5.9
12	3		13 ± 1.4
13a	2		N.A
13b	3		N.A
13c	2		N.A
13d	3		57.3 ± 2.64
13e	2		N.A
13f	3		51.2 ± 1.35
13g	2		N.A
13h	3		89.1 ± 4.3

Tabella 19. Attività antiproliferativa dei derivati a nucleo N'-cianoisonicotinoamidinico (**16a-r**) su cellule di carcinoma prostatico PC3.

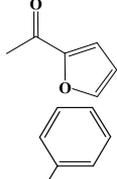
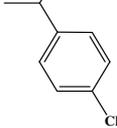
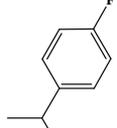
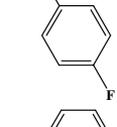


Composto	X	IC ₅₀ mM a 96h
16a		N.A
16b		N.A
16c		N.A
16d		N.A
16e		77.1 ± 3.34
16f		N.A
16g		66.5 ± 1.15
16h		18.2 ± 1.17
16i		56.5 ± 2.24
16l		N.A
16m		N.A
16n		N.A
16o		N.A
16p		59.5 ± 2.92

16q		57.7 ± 1.50
16r		N.A

Tabella 20. Attività antiproliferativa dei derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**20a-r**) su cellule di carcinoma prostatico PC3.

Composto	X	IC₅₀ mM a 96h
20a		N.A
20b		> 100
20c		72.5 ± 3.34
20d		96.3 ± 3.45
20e		32.5 ± 1.18
20f		46.3 ± 2.57
20g		N.A
20h		59.5 ± 3.19
20i		28.5 ± 1.12
20l		N.A
20m		N.A
20n		86.4 ± 3.13

20o		N.A
20p		53.2 ± 4.42
20q		54.5 ± 2.77
20r		23.8 ± 2.47

In particolare i composti **3**, **4**, **8**, **12** e **20r** inducono, dopo 96 ore dal trattamento, una inibizione della crescita dose-dipendente delle cellule PC3 con valori di IC_{50} compresi tra 10.5 e 23.75 μ M. Interessanti sono inoltre risultati i valori di IC_{50} esibiti dai composti **9f**, **16h** e **20i** rispettivamente di 21, 18 e 28.5 μ M, mentre i derivati **11**, **20e** e **20f** inducono una inibizione della crescita cellulare con più elevati valori di IC_{50} e compresi tra 32.5 e 47.7 μ M. I restanti composti hanno determinato un effetto antiproliferativo con valori di IC_{50} > di 50 μ M o non hanno esibito alcun effetto nelle condizioni sperimentali utilizzate.

Infine, nelle stesse condizioni sperimentali, sia il NAN-190 (antagonista dei recettori 5-HT_{1A}) che l'8-OH-DPAT (agonista dei recettori 5-HT_{1A}) non sembrano mostrare effetti sulla proliferazione della linea cellulare PC3, come mostrato in **Figura 5**.

Analizzando i dati dell'attività antiproliferativa, emerge come i derivati naftilpiperazinicici nell'ambito di tutte le serie considerate mostrino il miglior profilo d'attività, spingendoci ad approfondire il meccanismo molecolare alla base dell'attività antiproliferativa dei derivati risultati più attivi (**3** e **4**).

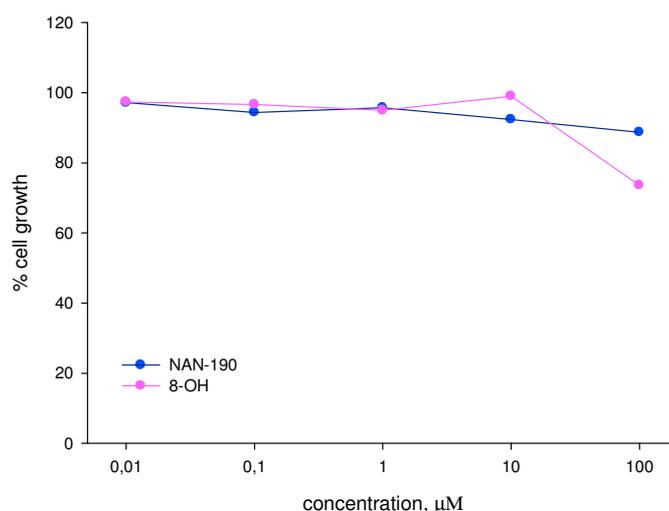


Figura 5. La linea cellulare PC3 è stata trattata per 96 ore con concentrazioni crescenti dei composti NAN-190 e 8-OH-DPAT, in mezzo contenente l'1% di FBS; la proliferazione cellulare è stata valutata in piastre da 96 pozzetti mediante saggio colorimetrico con Sulforodammina B. La crescita cellulare è espressa come percentuale rispetto al controllo rappresentate da cellule non trattate. Le concentrazioni dei composti NAN-190 e 8-OH-DPAT sono espresse in base logaritmica (asse delle x).

5.5 EFFETTI DEI COMPOSTI 3 E 4 SULL'INDUZIONE DELL'APOPTOSI

Al fine di definire il meccanismo molecolare alla base degli effetti antiproliferativi osservati, è stata analizzata la capacità dei composti (**3** e **4**) di indurre apoptosi e perturbazione del ciclo cellulare. In particolare l'apoptosi è stata valutata mediante l'analisi dell'esternalizzazione della fosfatidilcolina (PS) sul lato esterno della membrana plasmatica, uno dei primi effetti caratteristici della morte cellulare apoptotica, mediante il legame dell'Annexina V-FITC alla PS presente sulla membrana delle cellule apoptotiche. Come mostrato in **Figura 6**, il trattamento con i composti **3** e **4**, nonché NAN-190 e 8-OH-DPAT, alle concentrazioni 15 µM per 24 e 48 ore non induce effetti pro-apoptotici nelle cellule PC3. Il trattamento con un inibitore della topoisomerasi I, Topotecan, alla concentrazione di 2 µM, induce invece un incremento di cellule apoptotiche.

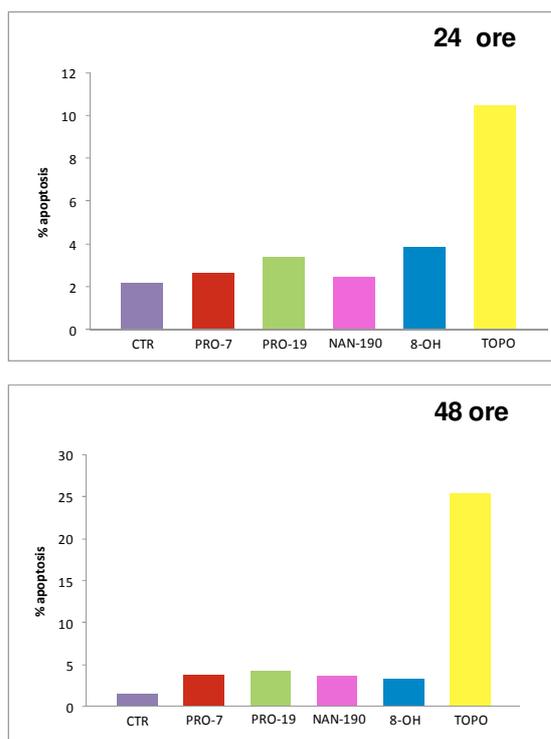


Figura 6. Le cellule PC3 sono state trattate con i composti 3, 4, NAN-190 e 8-OH-DPAT (15 μ M) e Topotecan (2 μ M) per 24, 48 ore. La percentuale di cellule apoptotiche è stata rilevata mediante l'utilizzo di Annessina V-FITC come indicato nelle "Procedure sperimentali".

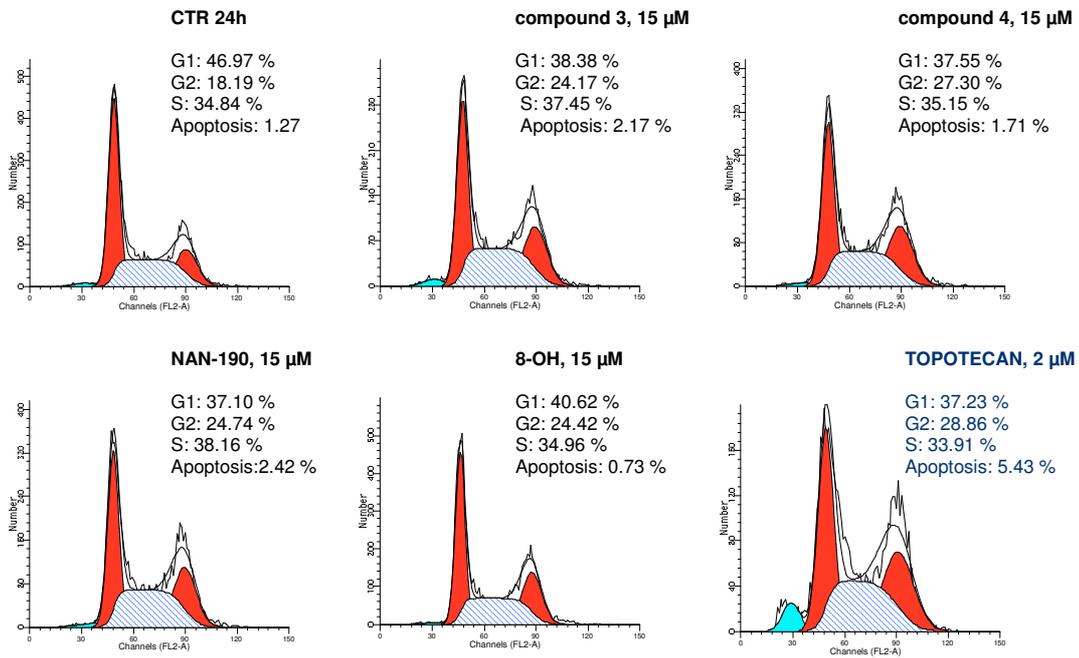
5.6 EFFETTI DEI COMPOSTI 3 E 4 SUL CICLO CELLULARE

L'evidente inibizione proliferativa indotta dai composti **3** e **4** nella linea cellulare PC3, associata all'assenza di una significativa morte cellulare apoptotica, ci ha spinto a studiare la cinetica del ciclo cellulare delle cellule trattate con questi due composti, mediante un'analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA, dopo specifica colorazione con ioduro di propidio.

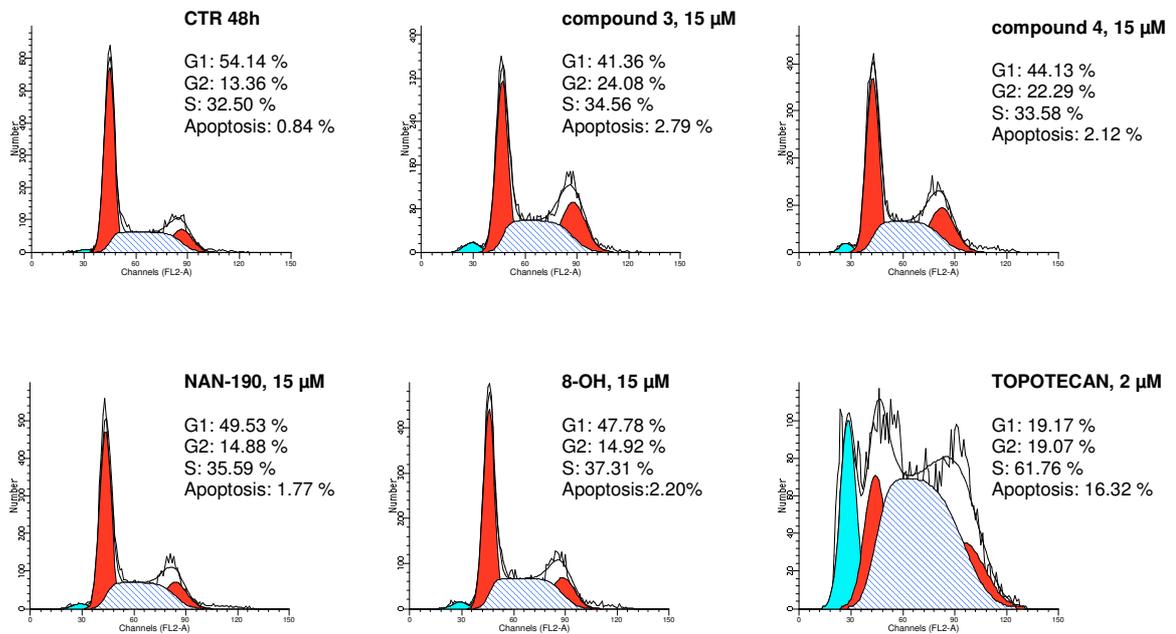
Gli effetti di questi due composti sono stati sempre confrontati con quelli indotti dal NAN-190, dall'8-OH-DPAT e dal Topotecan.

Non è stata dimostrata una consistente perturbazione del ciclo cellulare delle cellule trattate con i composti **3** e **4**, NAN-190 e 8-OH-DPAT. In particolare, è stato osservato solo un lieve aumento della percentuale di cellule nelle fasi S e G2-M dopo 24 (**Figura 7a**), 48 (**Figura 7b**) e 72 (**Figura 7c**) ore dal trattamento come mostrato in **Figura 7**. Al contrario, dopo 24 ore di trattamento il Topotecan ha indotto un aumento delle cellule in fase G2-M e la comparsa di un picco sub-G1, che indica una sottopopolazione di cellule apoptotiche ed un completo sconvolgimento della cinetica del ciclo cellulare e molte cellule presenti in sub-G1 dopo 48 e 72 ore dal trattamento.

A



B



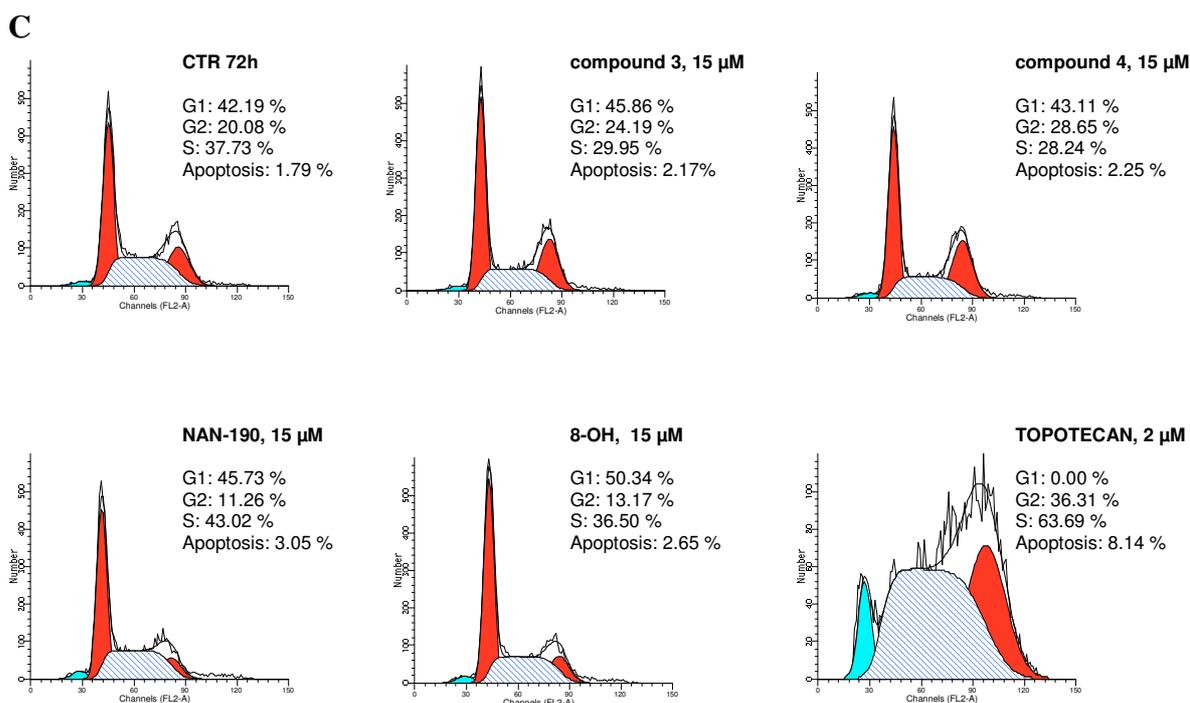


Figura 7a, 7b, 7c. L'analisi del contenuto di DNA dopo colorazione con ioduro di propidio è stata effettuata, mediante citofluorimetro, su cellule PC3 trattate e non con i composti 3, 4, NAN-190 e 8-OH-DPAT (15 μ M) e Topotecan (2 μ M) per 24, 48 e 72 ore. La fluorescenza è stata misurata con impulsi di ampiezza proporzionale al numero di molecole di ioduro di propidio presenti, ossia legate al DNA. Sull'asse delle X è riportata l'intensità di fluorescenza e sull'asse delle Y è riportato il numero di cellule presenti nella fase del ciclo corrispondente.

5.7 EFFETTI DEI COMPOSTI 3 E 4 SULL'ATTIVAZIONE DELLE PROTEINE MAPK E AKT

Il segnale intracellulare con cui la serotonina induce mitogenesi è complesso e coinvolge la stimolazione di diversi pathways che sono stati descritti solo parzialmente. Fra questi le vie di trasduzione del segnale che vedono coinvolte le proteine MAPK e AKT sono apparentemente le più rilevanti nel regolare la proliferazione. Su queste basi abbiamo valutato, nella linea cellulare PC3, gli effetti dei composti **3** e **4**, NAN-190, 8-OH-DPAT e Topotecan sull'attivazione di MAPK e AKT mediante western blotting.

Come mostrato in **Figura 8**, 48 ore di trattamento con **3**, **4** e Topotecan non riducono la fosforilazione basale, e quindi l'attivazione, di MAPK mentre si può osservare una completa inibizione della fosforilazione di AKT. Il mancato spegnimento del segnale mediato da MAPK può essere spiegato dalla presenza di un'attivazione costitutiva del segnale di MAPK dovuta alla mutazione di KRAS nelle cellule PC3. In contrasto con i dati riportati da Dizeyi N et al. [23], noi non abbiamo osservato alcun cambiamento nella fosforilazione di MAPK e AKT nelle cellule trattate con NAN-190 e 8-OH-DPAT. Comunque, l'inibizione dell'attività

di AKT, associata con un segnale di sopravvivenza nelle cellule tumorali, può spiegare, almeno in parte, l'inibizione proliferativa indotta dai composti **3** e **4**.

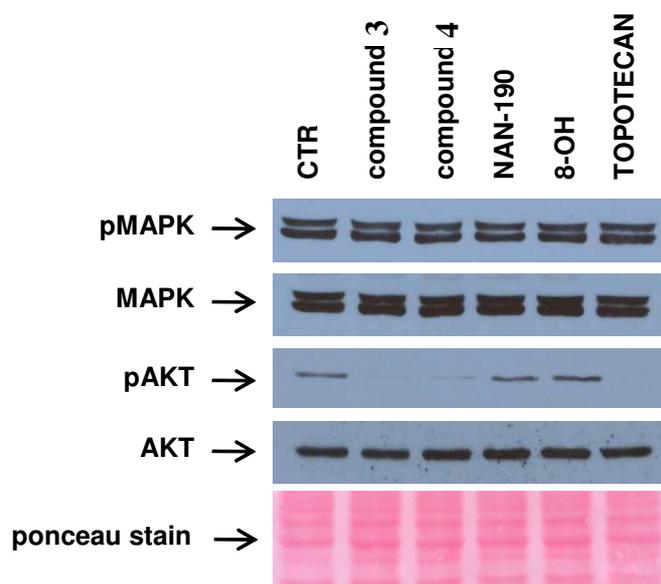


Figura 8. Le cellule PC3 sono state trattate con i composti **3** e **4**, NAN-190 e 8-OH-DPAT (15 μ M) e Topotecan (2 μ M) per 48 ore. L'analisi dell'espressione delle proteine pMAPK, MAPK, AKT, pAKT è stata effettuata mediante western blot come descritto nelle "Procedure sperimentali". Il rosso ponceau (ponceau stain) è usato come controllo di caricamento.

CONCLUSIONI

6. CONCLUSIONI

In conclusione, sono state sintetizzate due nuove serie di arilpiperazine legate a due diversi nuclei eterociclici: il nucleo N'-cianoisonicotinamidinico e il nucleo N'-cianopicolinamidinico. Inoltre, sulla base di alcune evidenze sperimentali [70], che hanno evidenziato come il residuo naftilpiperazinico sia risultato già capace di inibire l'induzione di tumori cutanei, sono state completate tre serie di derivati arilpiperazinicici precedentemente sintetizzate a nucleo: benzotriazinonico, idrossibenzotriazinonico e norbornenico [64, 66 e 68].

I saggi di binding sui recettori serotoninergici hanno quindi messo in evidenza che la natura del nucleo eterociclico unitamente al sostituente sull'anello piperazinico, risulta di fondamentale importanza nell'indirizzare l'affinità dei composti verso un particolare sottotipo recettoriale. Infatti, dall'analisi dei dati riportati, si evince come tutti i derivati naftilpiperazinicici testati, ad eccezione di quelli a nucleo idrossibenzotriazinonico (**7** e **8**), hanno mostrato, a concentrazioni nanomolari o subnanomolari, una elevata affinità e selettività verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A}.

In particolare, i derivati **3** e **4** mostrano una maggiore affinità di legame per il recettore 5-HT_{1A} con un valore di K_i pari a 0.000178 nM e 7.79 nM rispettivamente. Invece le affinità di legame di tali composti sui recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} risultano sempre più basse rispetto a quelle osservate verso i recettori 5-HT_{1A}, evidenziando una elevata selettività verso questo sottotipo recettoriale.

Tale selettività è stata ulteriormente confermata mediante saggi di binding sui recettori D₁, D₂, α_1 e α_2 . I derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico (**16a-r**) invece, hanno mostrato preferenzialmente affinità e selettività nei confronti dei sottotipi recettoriali 5-HT_{1A} (valori K_i subnanomolari) o attività mista 5-HT_{2A}/5-HT_{2C}, delineando per questi composti un potenziale impiego terapeutico come ansiolitici [25-26]. I derivati a nucleo N'-cianopicolinamidinico (**20a-r**), infine, hanno presentato tendenzialmente un'affinità nei confronti del recettore 5-HT_{2A}, in alcuni casi con valori di K_i picomolari, che li rende interessanti ai fini di una successiva valutazione su linee cellulari di carcinoma mammario [22].

I derivati arilpiperazinicici di tutte le serie considerate, sottoposti a saggi di attività antiproliferativa hanno evidenziato come numerosi composti presentino un'attività inibitoria con valori μ M di IC₅₀. I derivati naftilpiperazinicici **3** e **4** sono infine risultati quelli che, oltre ad aver mostrato un eccellente profilo di binding recettoriale nei confronti del sottotipo

recettoriale 5-HT_{1A}, possiedono un interessante profilo di attività antiproliferativa che ci ha spinto ad investigarne il meccanismo molecolare.

In questo studio è stato quindi dimostrato, che l'inibizione della proliferazione indotta nella linea cellulare PC3 dai composti **3** e **4** non può essere la conseguenza né di una perturbazione del ciclo cellulare (l'analisi citofluorimetrica dopo colorazione del DNA con ioduro di propidio non ha dimostrato effetti significativi), né dell'incremento dell'apoptosi.

È stato infine approfondito, il meccanismo d'azione dei composti attivi mediante lo studio dell'attivazione del segnale a valle del recettore 5-HT_{1A}, ed in particolare è stata analizzata l'attivazione di ERK1/2 (MAPK) e AKT, due proteine il cui segnale intracellulare sembra essere il principale regolatore della proliferazione cellulare mediato dalla serotonina (**Figura 9**).

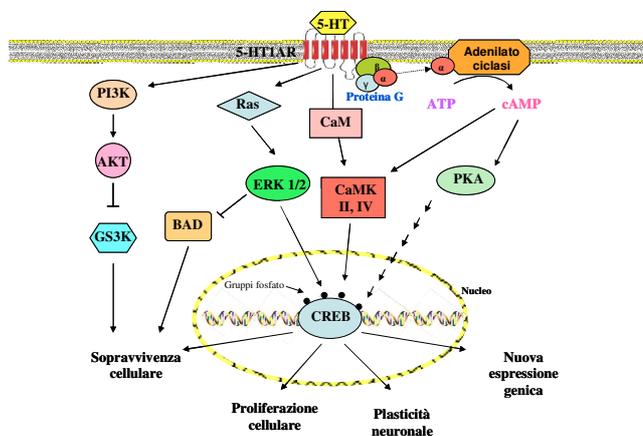


Figura 9. Possibili vie di trasduzione del segnale mediate dal recettore 5-HT_{1A}

È stato osservato che nessun composto analizzato, **3** e **4**, NAN-190 e 8-OH-DPAT è in grado di spegnere l'attivazione basale di MAPK (pMAPK).

Tale dato seppur in disaccordo con i dati presenti in letteratura che dimostrano come il trattamento con NAN-190 spegne il segnale mitogenico di MAPK in diverse linee cellulari di prostata tra cui anche le PC3 [23], potrebbe essere spiegato, almeno in parte, da differenti condizioni sperimentali. Infatti, un esempio, potrebbe essere la differente durata del trattamento; gli autori, infatti, hanno valutato l'effetto del segnale dopo poche ore dal trattamento, mentre nel nostro esperimento il trattamento è stato effettuato per 48 ore.

Infine, è stato dimostrato che sia **3** che **4**, ma anche il Topotecan, un chemioterapico ampiamente utilizzato per il trattamento dei tumori, inducono una completa inibizione della

fosforilazione e quindi attivazione di AKT, il cui segnale intracellulare sembra essere il principale regolatore della proliferazione cellulare mediata dalla serotonina.

Sulla base di tali considerazioni, anche se ulteriori studi sia farmacologici che di *molecular modelling* saranno necessari per approfondire le basi molecolari dell'attività e le relazioni struttura-attività di **3** e **4**, è possibile concludere affermando che questi composti costituiscono due nuovi *lead compounds*, per la progettazione di nuove molecole capaci di inibire il segnale mediato dalla serotonina come promettente strategia terapeutica per il trattamento del carcinoma prostatico avanzato e ormono refrattario.

7. SINTESI DI NUOVI LIGANDI DEI RECETTORI SEROTONINERGICI MEDIANTE NUOVE METODOLOGIE SINTETICHE [61].

Incoraggianti risultati sono stati inoltre raggiunti negli studi relativi al II indirizzo del lavoro di dottorato, tesi all'ottimizzazione della sintesi di molecole bioattive di natura eterociclica mediante il riscaldamento di solidi e liquidi per irraggiamento di potenza a microonde o riscaldamento dielettrico.

7.1 IMPOSTAZIONE DELLA RICERCA

Durante il mio dottorato mi sono quindi occupata della sintesi di una nuova libreria di composti caratterizzati da un nucleo indolico legato mediante una catena propilica all'azoto in posizione 4 di un anello arilpiperazinico variamente sostituito (R') (**Figura 10**).

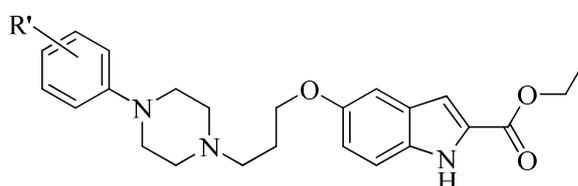


Figura 10. Struttura generale dei derivati serotoninergici a nucleo indolico

I prodotti progettati sono stati sintetizzati mediante riscaldamento a microonde, sviluppando una procedura di sintesi “one pot” di tipo combinatoriale parallelo e non parallelo [61]. Le reazioni sono state condotte utilizzando un forno a microonde (ETHOS 1600, Milestone ®) specificamente progettato per la sintesi organica. I reagenti ed il solvente sono stati posti in provette sigillate specifiche per l'esecuzione di reazioni ad elevate pressioni e sono stati riscaldati seguendo un programma di microonde composto da opportuni steps di innalzamento della temperatura seguiti da steps di riscaldamento a temperatura costante.

La *sintesi in parallelo* consiste nell'irraggiare mediante microonde le dieci provette con i diversi reagenti; le miscele grezze così ottenute sono state trattate singolarmente per ottenere i corrispondenti prodotti finali. I composti così ottenuti sono stati sottoposti a purificazione e caratterizzazione rispettivamente mediante RP-HPLC, ESI-MS, ¹H-NMR e ¹³C-NMR. I singoli prodotti sono stati successivamente analizzati attraverso RP-HPLC analitico in modo tale da determinare le migliori condizioni cromatografiche utili all'ottenimento di tempi di ritenzione diversi per i vari composti sintetizzati.

La *sintesi non parallela* consiste nel porre in un singolo reattore i diversi reagenti precedentemente utilizzati nella sintesi in parallelo, per ottenere in miscela tutti i prodotti

finali desiderati. La miscela grezza così ottenuta è stata sottoposta a purificazione mediante RP-HPLC preparativo utilizzando le condizioni cromatografiche precedentemente ottimizzate nella sintesi in parallelo.

Di seguito è riportata una dettagliata discussione delle caratteristiche e delle applicazioni della tecnica di riscaldamento impiegata, che è stata già ampiamente utilizzata dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro di dottorato nello sviluppo di composti biologicamente attivi.

7.2 RISCALDAMENTO MEDIANTE MICROONDE

Negli ultimi decenni, nel campo della chimica farmaceutica, sta emergendo sempre più il bisogno di sintetizzare nuove molecole organiche al fine di facilitare i processi di identificazione e di ottimizzazione di nuovi composti biologicamente attivi. Nell'ambito della chimica farmaceutica, la chimica combinatoriale si è sviluppata, infatti, per venire incontro alle crescenti richieste di molecole organiche per la scoperta di nuovi farmaci (drug discovery). In questo contesto la velocità di reazione si propone come requisito essenziale. I metodi tradizionali di sintesi organica si sono rivelati, col tempo, troppo lenti per soddisfare tali richieste.

Al fine di ridurre drasticamente i tempi di reazione, gli straordinari progressi della sintesi organica rendono disponibili, di giorno in giorno, sistemi reattivi completamente nuovi e, in qualche caso, addirittura rivoluzionari in relazione alle conoscenze della chimica classica. Ciò rende sempre più accessibile la progettazione e la realizzazione di architetture molecolari complesse, quali, ad esempio, quelle che caratterizzano le molecole d'interesse biologico.

Fra i vari settori sintetici, che negli anni più recenti hanno subito un forte impulso all'innovazione ed una conseguente crescita d'interesse e di attenzione da parte dei chimici, si colloca sicuramente il riscaldamento di solidi e liquidi mediante irraggiamento di potenza a *microonde o riscaldamento dielettrico o elettromagnetico a microonde*.

Sebbene i forni a microonde domestici siano stati largamente utilizzati sin dagli anni '70, la prima notizia che questa fonte di energia fosse adatta per accelerare le reazioni organiche è apparsa solo nel 1986 a causa dei rischi associati all'inflammabilità dei solventi organici e della mancanza di sistemi atti a controllare tali rischi.

Superata ormai da tempo la fase pionieristica, nella quale taluni laboratori tentavano di utilizzare forni a microonde da cucina per le mineralizzazioni (con i conseguenti problemi di riproducibilità e sicurezza), la strumentazione che impiega le microonde ha raggiunto un

elevatissimo livello tecnologico ed ha ampliato moltissimo i campi applicativi, dalla mineralizzazione dei campioni per le analisi elementari, alle misure di umidità, per arrivare poi al campo delle estrazioni di matrici complesse con solventi per le analisi organiche e, infine, alle reazioni di sintesi organica e metallorganica.

I risultati, sorprendenti per rapidità, resa e selettività, ottenuti mediante l'impiego delle microonde negli svariati processi precedentemente indicati, hanno fatto parlare in qualche caso di "magia molecolare", facendo annoverare il riscaldamento a microonde tra i processi utili ad una chimica innovativa (green chemistry).

Come evidenziato in **Tabella 21**, le microonde sono radiazioni elettromagnetiche non ionizzanti che coprono l'intervallo nominale di frequenza da 300 MHz a 300 GHz, immediatamente superiore a quella da 3 kHz a 300 MHz delle radioonde.

Queste radiazioni sono convenzionalmente classificate, nell'ambito dello spettro elettromagnetico, per decenni di frequenza: Very -Low, Low, Medium, High e Very-High Frequencies per le radioonde; Ultra-High, Super-High ed Extremely-High Frequencies per le microonde.

Tabella 21. Radioonde e microonde nell'ambito dello spettro delle radiazioni elettromagnetiche

Banda	Frequenza	Energia del fotone
Radioonde	3 kHz ÷ 300 MHz	$1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ eV
Microonde	300 MHz ÷ 300 GHz	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$ eV
Onde micrometriche	300 GHz ÷ 3×10^4 GHz	$1 \times 10^{-3} - 0.1$ eV
Lontano IR	3×10^4 ÷ 3×10^5 GHz	0.1 - 1 eV
Vicino IR-vicino UV	3×10^5 ÷ 3×10^6 GHz	1 - 10 eV
Lontano UV	3×10^6 ÷ 3×10^7 GHz	10 - 100 eV
Raggi X "morbidi"	3×10^7 ÷ 3×10^9 GHz	100 eV - 10 keV
Raggi X "duri" - γ "duri"	3×10^9 ÷ 3×10^{11} GHz	10 keV - 1 MeV
Raggi γ "duri" - γ "cosmici"	3×10^{11} ÷ 3×10^{13} GHz	1 - 100 MeV

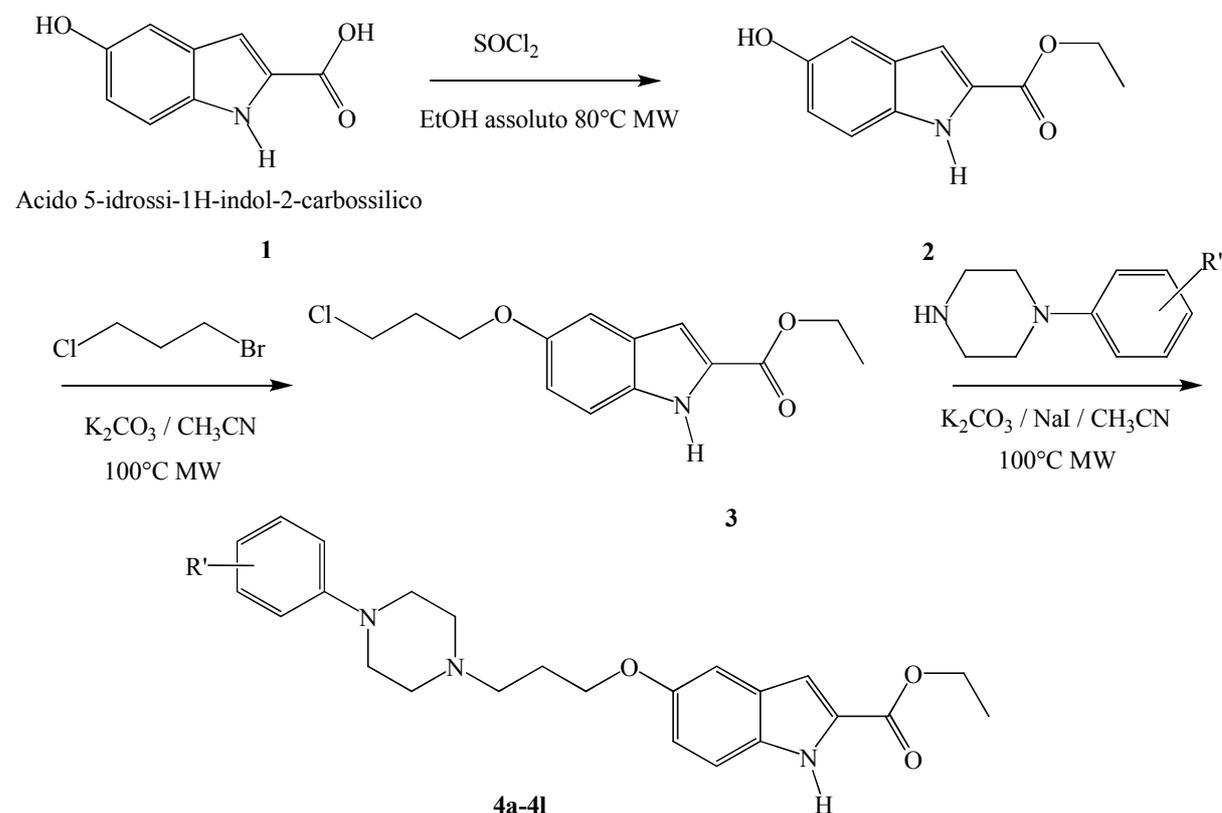
Le microonde utilizzate nelle strumentazioni di laboratorio appartengono alla zona UHF, da 300 a 3000 MHz, e sono in grado di attivare i livelli energetici rotazionali delle molecole. Esse sono assorbite dalle molecole aventi momenti di dipolo non nullo, che aumentano la loro energia e creano dei centri di propagazione del calore in tutte le direzioni del corpo irradiato,

con il risultato che il riscaldamento è molto più rapido di quello tradizionale. Delle quattro frequenze permesse per uso domestico o di laboratorio, è in genere utilizzata quella a 2450 MHz, pari ad una lunghezza d'onda di 12.25 cm, che viene assorbita da molecole molto polari, come H₂O, H₂SO₄, HCl, etc. Pertanto, le microonde presentano una possibilità d'impiego per effettuare processi di disidratazione o controllare reazioni chimiche che coinvolgono questi tipi di molecole.

7.3 PARTE SPERIMENTALE

7.3.1 SOMMARIO DELLE OPERAZIONI

La sintesi dei derivati indolici è stata condotta seguendo la procedura riportata nello **Schema 6**.



Schema 6. Sintesi dei derivati arilpiperazinici a nucleo indolico

L'acido 5-idrossi-1H-indol-2-carbossilico **1** è stato convertito nel corrispondente estere etilico mediante reazione con il cloruro di tionile in etanolo alla temperatura di 80°C; successivamente la reazione con l'1-bromo-3-cloropropano, in presenza di K₂CO₃ in acetonitrile, ha fornito l'intermedio cloroalchilossindolico **3**. Le reazioni sono state condotte utilizzando un forno a microonde (ETHOS 1600, Milestone ®) specificamente progettato per

la sintesi organica. Le miscele di reazione sono state poste in provette sigillate specifiche per l'esecuzione di reazioni ad elevate pressioni e sono state riscaldate seguendo un programma di microonde composto da opportuni steps di innalzamento della temperatura seguiti da steps di riscaldamento a temperatura costante. La successiva reazione del derivato **3** con le arilpiperazine, opportunamente sostituite, è stata condotta in acetonitrile in presenza di K_2CO_3 e NaI; la metodica in parallelo è stata condotta inserendo le provette sigillate in un carosello "multiPREP" a 36 posizioni (Milestone®), riempiendo le provette delle posizioni dove non è stata condotta la reazione con la stessa quantità di acetonitrile impiegato nelle reazioni. La temperatura delle miscele di reazione, tenute sotto agitazione elettromagnetica, è stata monitorata mediante una sonda IR, mentre la rotazione del carosello, il tempo di irraggiamento e la potenza delle microonde sono stati monitorati con il software "easyWAVE". La reazione ha fornito i composti finali **4a-4l** dopo riscaldamento alla temperatura di 100°C con una potenza di 300 W. Questa condizione di reazione è considerata ottimale, poiché temperature più elevate o tempi prolungati non hanno fornito un ulteriore incremento delle rese o hanno dato luogo alla decomposizione dei reagenti.

Le arilpiperazine selezionate per la sintesi dei composti **4a-4l** (**Figura 11**), sono state scelte in accordo con i dati presenti in letteratura, in modo da considerare solo i sostituenti che in passato avevano mostrato un migliore profilo affinità/selettività verso i sottotipi recettoriali serotoninergici. I prodotti finali sono stati caratterizzati mediante ESI-MS, 1H -NMR e ^{13}C -NMR ed i dati ottenuti erano consistenti con le strutture sintetizzate.

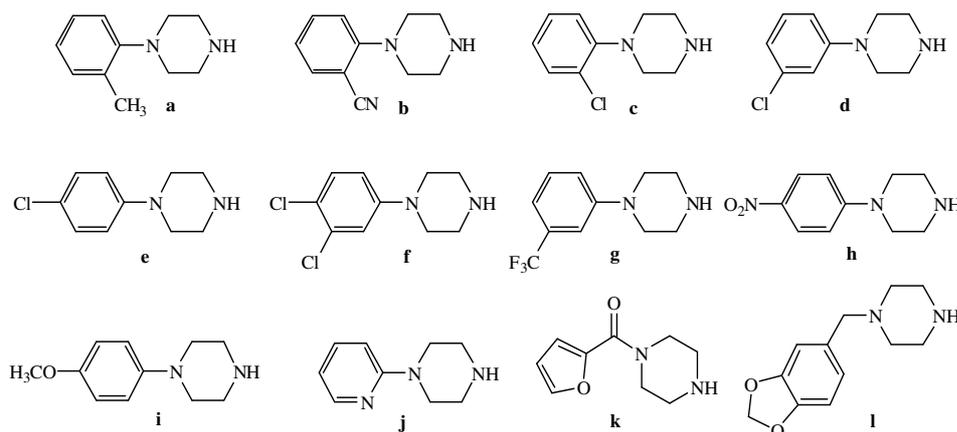


Figura 11. Arilpiperazine utilizzate per la creazione della libreria.

Per purificare la miscela grezza, comprensiva di tutti i prodotti finali e ottenuta applicando la sintesi **non-parallela**, sono state applicate le condizioni cromatografiche messe a punto per i

singoli prodotti finali, sintetizzati mediante la procedura parallela. Pertanto una quantità misurata dei singoli composti puri **4a-4l**, precedentemente sintetizzati, è stata mescolata e sono state valutate numerose condizioni di eluizione mediante RP-HPLC analitico (colonna Phenomenex C₁₈; 5 µm, 4.6 x 150 mm, particelle sferiche), al fine di ottenere una completa separazione dei picchi cromatografici.

La migliore condizione di eluizione per la determinazione analitica è quella eseguita con due sistemi di solventi:

- **A**: acetonitrile con 0.05% di TFA
- **B**: acqua con 0.05% di TFA

utilizzando un gradiente lineare dal 20 al 40% di A in 60 minuti, lampada UV a 254 nm e con un flusso di 1 ml/minuto. Il cromatogramma ottenuto in queste condizioni ha mostrato una sufficiente selettività tra i composti, tale da consentire la purificazione della miscela di prodotti mediante RP-HPLC preparativo (**Figura 12**).

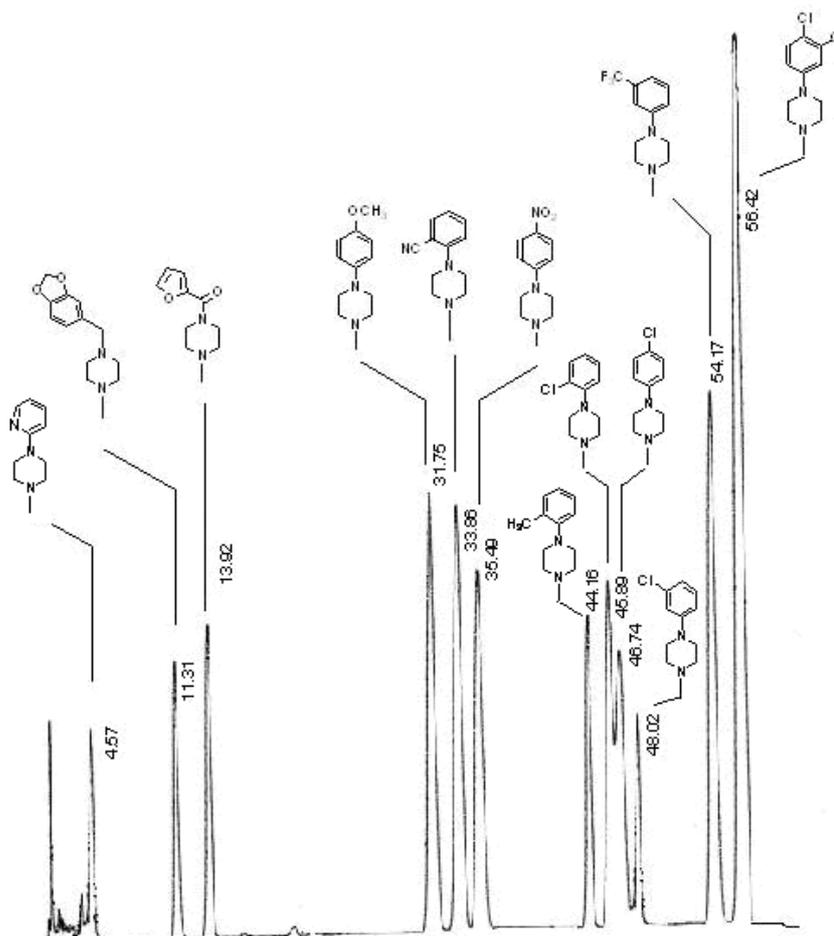


Figura 12. Cromatogramma della miscela dei composti ottenuti mediante sintesi parallela

Sulla base dei risultati ottenuti è stata sviluppata, pertanto, una procedura di sintesi **non-parallela**, realizzata ponendo i reattivi in un unico contenitore: il derivato cloroalchilossindolico **3** è stato fatto reagire con 10 diverse arilpiperazine in presenza di K_2CO_3 e NaI in acetonitrile riscaldando la miscela di reazione in un forno a microonde Milestone®.

In questa reazione è stato eseguito lo stesso programma di microonde della procedura di sintesi parallela, riscaldando la reazione a $100^\circ C$ applicando una potenza di 300 W per 90 minuti. La miscela di reazione è stata filtrata al fine di rimuovere il K_2CO_3 residuo; il filtrato è stato successivamente evaporato mediante distillazione a pressione ridotta ed il residuo, ripreso in diclorometano, è stato sottoposto ad un lavaggio con acqua satura di NaCl. Infine, la fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco. Il residuo grezzo è stato analizzato mediante RP-HPLC analitico impiegando lo stesso gradiente di solventi utilizzato durante la determinazione analitica precedente (**Figura 13**) ed, infine, è stato purificato mediante RP-HPLC preparativo per ottenere i singoli prodotti **4a-4l**.

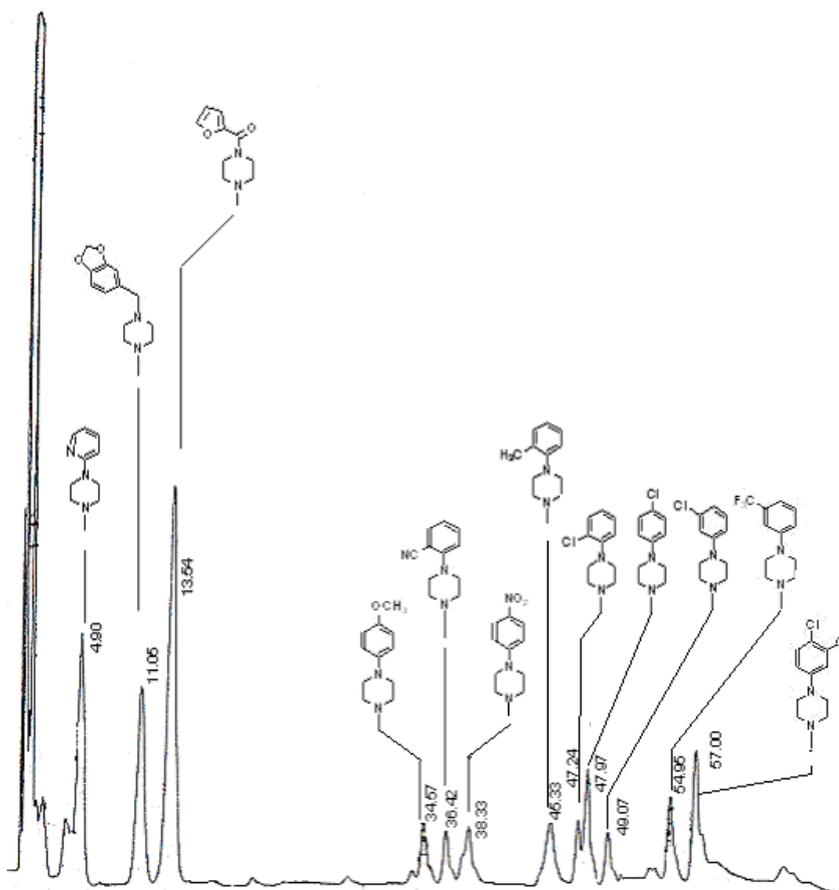


Figura 13. Cromatogramma della miscela dei composti ottenuti mediante sintesi non parallela

7.3.2 Sintesi dell'estere etilico dell'acido 5-idrossi-1H-indol-2-carbossilico (**2**; Schema 6)

Il cloruro di tionile (1.9 ml) è stato aggiunto, goccia a goccia, ad una soluzione di acido 5-idrossi-1H-indol-2-carbossilico **1** (3 g, 16.9 mmol) in 20 ml di etanolo assoluto. Successivamente, la miscela di reazione è stata trasferita in un forno a microonde Milestone e riscaldata alla temperatura di 80°C con una potenza di 150 W per 30 minuti. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente ed il solvente rimosso mediante distillazione a pressione ridotta. Il residuo grezzo è stato disciolto in acetato di etile e la soluzione ottenuta è stata lavata con una soluzione acquosa al 5% di NaHCO₃ e con una soluzione satura di NaCl. La fase organica, infine, è stata anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata e portata a secco per fornire 2.3 g del composto puro **2** come un solido bianco (resa 68%).

7.3.3 Sintesi del derivato etil-5-(3-cloropropossi)-1H-indol-2-carbossilato (**3**; Schema 6)

In un pallone a due colli, il carbonato di potassio (216 mg, 1.57 mmol) è stato sospeso in acetonitrile e riscaldato mediante microonde sotto agitazione elettromagnetica alla temperatura di 100°C per 10 minuti. Successivamente è stato aggiunto il composto **2** (323 mg, 1.57 mmol) e, dopo 10 minuti, l'1-bromo-3-cloropropano; la miscela di reazione è stata ulteriormente riscaldata sotto agitazione elettromagnetica alla temperatura di 100°C per 1 ora e successivamente raffreddata, portata a secco ed il residuo grezzo è stato diluito in 40 ml di acqua. La soluzione è stata estratta più volte con CH₂Cl₂ e le fasi organiche sono state anidificate con Na₂SO₄ anidro, filtrate e portate a secco. Il residuo è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (diclorometano/metanolo 95:5 v/v), fornendo 312 mg del composto puro **3** come un solido giallo (resa 71%) dopo cristallizzazione da etere etilico/esano.

7.3.4 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI PARALLELA DELLA LIBRERIA DI DERIVATI ARILPIPERAZINICI A NUCLEO INDOLICO

In ogni provetta di reazione di un carosello "multiPREP" a 36 posizioni (Milestone®), sono stati posti il derivato etil-5-(3-cloropropossi)-1H-indol-2-carbossilato **3** (0.5 g, 1.78 mmol) e l'opportuna arilpiperazina (1.78 mmol, ciascuna) disciolti in acetonitrile.

Successivamente sono stati aggiunti K₂CO₃ (0.615 g, 2.67 mmol) e NaI (0.4 g, 2.67 mmol) e le provette sono state sigillate. Le miscele di reazione, tenute sotto agitazione elettromagnetica, sono state sottoposte a riscaldamento mediante microonde alla temperatura di 100°C utilizzando una potenza di 300 W per 60 minuti. Dopo 3 minuti di ventilazione, ogni

reazione è stata filtrata per rimuovere l'eccesso di K_2CO_3 , portata a secco, ripresa in diclorometano ed estratta con una soluzione di acqua satura di NaCl. Ogni singola fase organica è stata, infine, anidrificata con Na_2SO_4 anidro e portata a secco. La purificazione mediante cromatografia su gel di silice e la successiva cristallizzazione da opportuno solvente, hanno fornito i corrispondenti composti puri **4a-4l**.

7.3.5 PROCEDURA GENERALE PER LA SINTESI NON-PARALLELA DELLA LIBRERIA DI DERIVATI ARILPIPERAZINICI A NUCLEO INDOLICO

Il derivato etil-5-(3-cloropropossi)-1H-indol-2-carbossilato **3** (5 g, 17.8 mmol) e le 10 arilpiperazine commercialmente disponibili (1.78 mmol, ciascuna) sono stati disciolti con acetonitrile in un pallone a due colli. Successivamente sono stati aggiunti K_2CO_3 (6.15 g, 26.7 mmol) e NaI (4 g, 26.7 mmol) e la reazione è stata, quindi, trasferita in un reattore dove, sotto agitazione elettromagnetica, è stata riscaldata per 90 minuti alla temperatura di 100°C utilizzando una potenza di 300 W. Dopo 3 minuti di ventilazione, la reazione è stata filtrata per rimuovere l'eccesso di K_2CO_3 , lavata con una soluzione di acqua satura di NaCl ed estratta con diclorometano. La miscela grezza di reazione è stata, infine, anidrificata con Na_2SO_4 anidro e portata a secco. La purificazione mediante RP-HPLC preparativo ha fornito i corrispondenti composti puri **4a-4l**.

7.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Il vantaggio principale delle strategie sintetiche precedentemente riportate è rappresentato dal breve tempo di irraggiamento delle miscele di reazione che fornisce i composti **4a-4l** in tempi estremamente ridotti. I risultati ottenuti sono riassunti in **Tabella 22** e le rese riportate sono risultate generalmente soddisfacenti, specialmente se confrontate con tempi e rese delle stesse reazioni condotte con riscaldamento convenzionale. In termini di tempo, le microonde hanno consentito un miglioramento notevole della sintesi. Infatti, i metodi descritti in letteratura prevedono 24 ore per la sostituzione nucleofila tra gli alogenuri alchilici e le arilpiperazine. Nella procedura sviluppata, invece, sono necessari 60 minuti di irraggiamento nel caso della sintesi combinatoriale di tipo parallelo e 90 minuti per la procedura di sintesi non parallela.

Tabella 22. Derivati arilpiperazinicici a nucleo indolico ottenuti mediante irraggiamento a microonde di tipo combinatoriale.

Composto	Sintesi parallela	Sintesi non-parallela
	Resa ^a (%)	Resa ^a (%)
4a	51	48
4b	49	47
4c	59	55
4d	62	58
4e	56	56
4f	48	45
4g	53	49
4h	51	50
4i	51	50
4j	78	73
4k	71	69
4l	83	79

^aTutte le reazioni sono state eseguite 3 volte ed i valori riportati sono i valori medi.

I risultati mostrano, inoltre, che non c'è una differenza significativa tra le rese ottenute con la procedura sintetica parallela ed il metodo di sintesi non parallelo; sebbene una piccola riduzione delle rese sia evidenziabile nella sintesi non parallela, essa può essere associata alla maggior complessità della miscela grezza, nella quale la reattività delle piperazine gioca un ruolo dominante. Inoltre, le condizioni di reazione, ottenute mediante l'irraggiamento con le microonde, rappresentano un esempio di come tale tecnologia possa consentire lo sviluppo simultaneo di piccole librerie di derivati; tale approccio potrebbe essere condotto su un numero significativamente maggiore di composti, al fine di accelerare la selezione di nuovi "lead-compounds".

I derivati sintetizzati, sottoposti a sperimentazione farmacologica presso il Dipartimento di Farmacologia "G. Segre" dell'Università degli Studi di Siena al fine di valutarne l'affinità e la selettività recettoriale verso i recettori 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, hanno mostrato nei confronti dei sottotipi recettoriali serotoninergici un'affinità da media ad elevata (**Tabella 23**).

Tabella 23. Valori di K_i (nM) dei derivati indolici **4a-4l**.

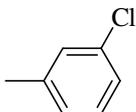
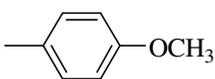
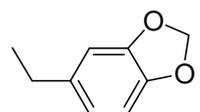
Composto	X	Affinità recettoriale K_i (nM) ^a		
		5-HT _{1A} [³ H]-8OH-DPAT	5-HT _{2A} [³ H]-ketanserina	5-HT _{2C} [³ H]-mesulergina
4a		>10 ⁴	N.A.	N.A.
4b		>10 ⁴	N.A.	N.A.
4c		>10 ⁴	537± 11	39.7± 5.2
4d		39.0± 0.8	>10 ⁴	1.28± 0.1
4e		14.0± 0.9	>10 ⁴	45.1± 1.7
4f		>10 ⁴	N.A.	>10 ⁴
4g		35.8± 1.2	3610± 192	N.A.
4h		N.A.	>10 ⁴	247± 47
4i		>10 ⁴	>10 ⁴	50.4± 2.4
4j		N.A.	344± 51	104± 19
4k		N.A.	452± 27	309± 16
4l		>10 ⁴	26.1± 3.3	43.6± 55

^a Valore di K_i seguito da SEM. In queste stesse condizioni la 8-OH-DPAT, la ketanserina e la mesulergina 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.

In particolare, i composti **4d** e **4g**, dotati di un sostituito elettron-attrattore in posizione meta (Cl e CF₃, rispettivamente) ed il composto **4e** dotato di un sostituito elettron-attrattore in posizione para (Cl), hanno mostrato un'affinità submicromolare verso il sottotipo recettoriale 5-HT_{1A} (valori di K_i rispettivamente di 39.0, 35.8 e 14.0 nM). Al contrario, i composti **4j**, **4k** e **4l** sono dotati di un profilo di affinità e selettività misto nei confronti dei recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C}, con valori di K_i compresi tra 26.1-452 e 43.6-309 nM, rispettivamente. Nell'ambito dei composti dotati di affinità nei confronti del recettore 5-HT_{2C}, emerge l'ottima affinità mostrata da parte del composto **4d** (K_i = 1.28 nM) che è, inoltre, affiancata da una buona affinità anche nei confronti del recettore 5-HT_{1A} (K_i = 39.0 nM), determinando in tal modo un profilo di attività mista 5-HT_{1A}/5-HT_{2C}. Tale profilo di affinità mista nei confronti dei recettori 5-HT_{1A}/5-HT_{2C} è posseduto anche dal composto **4e** (K_i = 14.0 nM e 45.1 nM, rispettivamente) Infine è da sottolineare l'elevata selettività dei composti **4h** e **4i** nei confronti del sottotipo recettoriale 5-HT_{2C}.

Successivamente i derivati che hanno mostrato il miglior profilo di affinità/selettività (**4d**, **4i** e **4l**) 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 24**) confermando anche in questo caso un'elevata selettività verso i sottotipi recettoriali serotoninergici ad eccezione del composto **4d** che mostra una moderata affinità verso i recettori α₁ (K_i = 32.9 nM).

Tabella 24. Valori di K_i (nM) dei derivati **4d**, **4i** e **4l** per i recettori D₁, D₂, α₁ e α₂.

Composto	X	Affinità recettoriale K _i (nM) ^a			
		D ₁ [³ H]-SCH-23390	D ₂ [³ H]-spiperone	α ₁ [³ H]-prazosina	α ₂ [³ H]-yohimbina
4d		1070 ± 122	N.A.	32.9 ± 1.69	1350 ± 169
4i		N.A.	N.A.	514 ± 9.2	6480 ± 533
4l		>10 ⁴	N.A.	338 ± 14.6	231 ± 14.8

In conclusione, abbiamo dimostrato che l'applicazione dell'irraggiamento mediante microonde e la presenza simultanea di K₂CO₃ e NaI, sia durante la sintesi parallela che nello

sviluppo di una procedura di sintesi combinatoriale non parallela, migliorano le rese ottenute e riducono significativamente i tempi di reazione nella sintesi di una libreria di derivati arilpiperazinicici a nucleo indolico dotati di attività serotoninergica.

Tra i composti sintetizzati quello che ha determinato la più alta affinità nei confronti dei recettori serotoninergici è stato il composto **4d**, che è dotato di un profilo di affinità e selettività misto nei confronti dei recettori 5-HT_{1A}/5-HT_{2C}/α₁ (K_i = 39.0 nM, 1.28 nM e 32.9 nM rispettivamente). Tale profilo di affinità ha destato notevole interesse e costituirà un punto di sviluppo per ulteriori ricerche sia nell'intento di sviluppare nuovi neurolettici atipici, categoria terapeutica ampiamente utilizzata nel trattamento di psicosi e disturbi bipolari, sia nell'opportunità di valutare anche quest'ultima serie di derivati arilpiperazinicici a nucleo indolico come inibitori della proliferazione di linee cellulari di carcinoma prostatico PC3.

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) Vicaut E., Laemmel E., Stücker O., Impact of serotonin on tumour growth. *Ann Med*, 32, 187-194, 2000.
- 36) Siddiqui E.J., Thompson C.S., Mikhailidis D.P., Mumtaz F.H., The role of serotonin in tumor growth, review. *Oncol Rep*, 14, 1593-1597, 2005.
- 37) Nemecek GM., Coughlin S.R, Handley D.A., Moskowitz M.A., Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Sci USA*, 83, 674-678, 1986.

- 38) Takuwa N., Ganz M., Takuwa Y., Sterzel R.B., Rasmussen H., Studies of the mitogenic effect of serotonin in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol*, 257, 431-439, 1989.
- 39) Dolezel S., Filkuka J., Tomasek V., Vlasin Z., Histochemical demonstration of 5-hydroxytryptamin in a malignant carcinoid of the small intestine. *Neoplasma*, 16, 209-214, 1969.
- 40) Tutton P.J., Barkla D.H., The influence of serotonin on the mitotic rate in colonic crypt epithelium and in colonic adenocarcinoma in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 5, 91-94, 1978.
- 41) Tutton P.J., Steel G.G., Influence of biogenic amines on the growth of xenografted human colorectal carcinomas. *Br J Cancer*, 40, 743-749, 1979.
- 42) Tutton P.J., Barkla D.H., Influence of inhibitors of serotonin uptake on intestinal epithelium and colorectal carcinomas. *Br J Cancer*, 46, 260-265, 1982.
- 43) Sant'Agnes P.A., Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects. *Urology*, 51, 121-124, 1998.
- 44) Sadar M. D., Hussein M., Bruchovsky N., Prostate cancer: molecular biology of early progression to androgen independence. *Endocrine-Related Cancer*, 6, 487-502, 1999.
- 45) Denis L., Murphy GP., Overview of phase III trials on combined androgen treatment in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer*, 72, 3888-3895, 1993.
- 46) Jiborn T., Bjartell A., Abrahamsson P.A., Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma during hormonal treatment. *Urology*, 51, 585-589, 1998.
- 47) Silvestris N., Leone B., Numico G., Present status and perspectives in the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Oncology*, 69, 273-282, 2005.
- 48) Siddiqui E.J., Shabbir M., Thompson C.S., Mumtaz F.H., Mikhailidis D.P., The role of serotonin (5-HT_{1A} and 5-HT_{1B}) receptors in prostate cancer cell proliferation. *The journal of urology*, 176, 1648-1653, 2006.
- 49) *Foye's Principi di Chimica Farmaceutica*, quarta ed. italiana; 318-319, 2004.
- 50) Siddiqui E.J., Shabbir M., Thompson C.S., Mumtaz F.H., Mikhailidis D.P., Growth inhibitory effect of doxazosin on prostate and bladder cancer cell. Is the serotonin receptor pathway involved?. *Anticancer research*, 25, 4281-4286, 2005.
- 51) Sonier B., Arseneault M., Lavigne C., Ouellette R.J., Vaillancourt C., The 5-HT_{2A} serotoninergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343, 1053-1059, 2006.
- 52) Ullmer C., Schmuck K., Kalkman HO, Lübbert H., Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett*, 370, 215-221, 1995.

- 53) Glusa E., Roos A., Endothelial 5HT receptors mediate relaxation of porcine pulmonary arteries in response to ergotamine and dihydroergotamine. *Br J Pharmacol*, 119, 330-334, 1996.
- 54) McDuffie J.E., Coaxum S.D., Maleque M.A., 5-hydroxytryptamine evokes endothelial nitric oxide synthase activation in bovine aortic endothelial cell culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 221, 386-390, 1999.
- 55) Palmer RMJ, Ferrige A.G., Moncada S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526, 1987.
- 56) Lala PK., Orucevic A., Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer and Metastasis Rev*, 17, 91-106, 1998.
- 57) Asada M., Ebihara S., Yamada S., Niu K., Okasaki T., Sora I., Arai H., Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated Kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia*, 11, 408-417, 2009.
- 58) Fiorino F., Magli E., Perissutti E., Severino B., Frecentese F., Esposito A., De Angelis F., Incisivo G.M., Massarelli P., Nencini C., Di Gennaro E., Budillon A., Di Cintio A., Santagada V., Caliendo G. (2011) *European Journal of Medicinal Chemistry* 46(6), 2206-2216.
- 59) Fiorino F., Severino B., De Angelis F., Perissutti E., Magli E., Frecentese F., Esposito A., Massarelli P., Nencini C., Santagada V., Caliendo G. (2010) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20(9), 2978-2982.
- 60) Fiorino F., Severino B., Magli E., Perissutti E., Frecentese F., Esposito A., Incisivo G.M., Ciano A., Massarelli P., Nencini C., Santagada V., Caliendo G. New Potent 5-HT_{2A} Receptor Ligands Containing a N'-Cyanopicolinamidine Nucleus: Synthesis and In Vitro Pharmacological Evaluation (2011) *European Journal of Medicinal Chemistry* (*accettato per la pubblicazione*).
- 61) Frecentese F., Fiorino F., Perissutti E., Severino B., Magli E., Esposito A., De Angelis F., Massarelli P., Nencini C., Viti B., Santagada V., Caliendo G. *European Journal of Medicinal Chemistry* (2010), 45(2), 752-759
- 62) 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.
- 63) 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.
- 64) Caliendo G., Fiorino F., Grieco P., Perissutti E., Santagada V., Severino B., Bruni G., Romeo M.R. (2000) *Bioorg. Med. Chem.* 8, 533-538.
- 65) 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.

- 66) 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.
- 67) 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.
- 68) 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.
- 69) Van Steen B.J., van Wijngaarden I., Tulp M.T.M., Soudijn W., (1993) *J. Med. Chem.* 36, 2751-2760.
- 70) C.S. Sreevidya, N.M. Khaskhely, A. Fukunaga, P.Khaskina, S.E.Ullrich. Inhibition of Photocarcinogenesis by Platelet-Activating Factor or Serotonin receptor antagonists, *Cancer Res.* 68 (10) 2008 3978-3984.
- 71) Nakajima T., Izawa T., Kashiwabara T., Nakajima S., Munezuka Y. (1994) *Chem. Pharm. Bull.* 42, 2475-2482.
- 72) Sauvé G., Rao V.S., Lajoie G., Belleau B. (1985) *Can. J. Chem.* 63, 3089-3101.
- 73) Cheng Y.C., Prusoff W.H. (1973) *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
- 74) Scatchard G. (1949) *Ann. NY Acad. Sci.* 51, 660-672.
- 75) Schlegel J.R., Periutka S.J. (1986) *Biochem. Pharmacol.* 35, 1943-1949.
- 76) Herndon J.L., Ismaniel A., Ingher S.P., Teitler M., Glennon R.A. (1992) *J. Med. Chem.* 35, 4903-4910.
- 77) Billard W., Ruperto V., Crosby G., Iorio L.C., Barnett A. (1984) *Life Sci.* 35, 1885-1893.
- 78) Creese I., Schneider R., Snyder S.H. (1977) *Eur.J.Pharmacol.* 46, 377-381.
- 79) Greengrass P., Bremner R. (1979), *Eur.J.Pharmacol.* 55, 323-326.
- 80) Perry B.D., U'Prichar D.C. (1981), *Eur.J.Pharmacol.* 76, 461-464.
- 81) Zlatović M.V., Šukalović V.V, Schneider C., Roglić G.M. (2006) *Bioorg. Med. Chem.* 14, 2994-3001.
- 82) Quaglia W., Santoni G., Pignini M., Piergentili A., Gentili F., Buccioni M., Mosca M., Lucciarini R., Amantini C., Nabissi M.I., Ballarini P., Poggesi E., Leonardi A., Giannella M. (2005) *J. Med. Chem.* 48, 7750-7763.

INDICE

1. Introduzione	pag.	2
1.1 Serotonina	“	3
1.2 Azioni centrali e periferiche della serotonina	“	4
1.3 Recettori serotoninergici	“	6
1.4 Ruolo dei recettori serotoninergici nella crescita tumorale	“	13
2. Impostazione della ricerca	“	16
3. Parte sperimentale	“	21
3.1 Sommario delle operazioni	“	22
3.2 Procedimenti sperimentali delle sintesi	“	26
3.2.1 Derivati a nucleo benzotriazinonico	“	26
3.2.2 Derivati a nucleo idrossibenzotriazinonico	“	27
3.2.3 Derivati a nucleo n-idrossinorbornenico	“	28
3.2.4 Derivati a nucleo n'-cianoisonicotinamidinico	“	29
3.2.5 Derivati a nucleo n'-cianopicolinamidinico	“	32
3.3 Analisi strutturale dei derivati a nucleo N'-cianoisonicotinamidinico e N'-cianopicolinamidinico	“	36
3.4 Materiali	“	36
3.5 Caratterizzazione	“	37
4. Sperimentazione farmacologia	“	38
4.1 Generalita'	“	39
4.2 Saggi di binding	“	39
4.3 Colture cellulari	“	42
4.4 Saggi di proliferazione cellulare	“	43
4.5 Analisi ciclo cellulare	“	43
4.6 Saggio dell'apoptosi con annessina v-fitc	“	44
4.7 Preparazione dei lisati cellulari e dosaggio delle proteine	“	44
4.8 Immunoblotting	“	45
5. Risultati e discussione	“	46
6. Conclusioni	“	68
7. Sintesi di nuovi ligandi dei recettori serotoninergici mediante nuove metodologie sintetiche	“	72
Bibliografia	“	85