

# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Manfredini Stefano

Primi studi SAR (structure activity relationship) del Neuropeptide S

Modifiche chimiche per migliorare la farmacocinetica della Nocicettina

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/08

**Dottorando**

**Tutore**

Dott. Fiorini Stella

Prof. Salvadori Severo

Anni 2006/2008

# INDICE

## *Primi studi SAR (structure activity relationship) del Neuropeptide S*

<b>Introduzione</b>	<b>pag 5</b>
<b>Scopo della Tesi</b>	<b>pag 12</b>
<i>Studio della posizione 2 (Phe)</i>	<i>pag 12</i>
<i>Studio della posizione 3 (Arg)</i>	<i>pag 14</i>
<i>Studio della posizione 5 (Gly)</i>	<i>pag 15</i>
<i>Studio della posizione 4 (Asn)</i>	<i>pag 21</i>
<b>Risultati e discussione</b>	<b>pag 22</b>
<i>Studio della posizione 2 (Phe)</i>	<i>pag 23</i>
<i>Studio della posizione 3 (Arg)</i>	<i>pag 27</i>
<i>Studio della posizione 5 (Gly)</i>	<i>pag 31</i>
<i>Studio della posizione 4 (Asn)</i>	<i>pag 36</i>
<b>Conclusioni</b>	<b>pag 39</b>
<b>Parte sperimentale</b>	<b>pag 41</b>
<i>Sintesi dei composti</i>	<i>pag 41</i>
<i>Purificazione e controllo analitico</i>	<i>pag 44</i>
<i>Procedure sintetiche</i>	<i>pag 52</i>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag 63</b>

## *Modifiche chimiche per migliorare la farmacocinetica della nocicettina*

<b>Introduzione</b>	<b>pag 66</b>
<i>La nocicettina ed il suo recettore</i>	<i>pag 66</i>
<i>Attività biologiche mediate dal sistema N/OFQ-Recettore NOP</i>	<i>pag 71</i>
<i>La barriera ematoencefalica</i>	<i>pag 73</i>

<b>Scopo della Tesi</b>	<b>pag 79</b>
<b>Risultati e discussione</b>	<b>pag 85</b>
<b>Conclusioni preliminari</b>	<b>pag 89</b>
<b>Parte sperimentale</b>	<b>pag 90</b>
<i>Sintesi dei composti</i>	<i>pag 90</i>
<i>Purificazione e controllo analitico</i>	<i>pag 95</i>
<i>Materiali e metodi</i>	<i>pag 96</i>
<i>Procedure sintetiche</i>	<i>pag 97</i>
<b>Bibliografia</b>	<b>pag 107</b>
<b>Abbreviazioni</b>	<b>pag 112</b>
<b>Elenco delle pubblicazioni</b>	<b>pag 114</b>

Primi studi SAR (structure activity relationship)  
del Neuropeptide S

## INTRODUZIONE

I recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) regolano diverse funzioni biologiche sia a livello centrale sia in periferia e rappresentano, attualmente, il target d'azione della maggior parte dei farmaci presenti sul mercato.

I GPCRs sono costituiti da una singola catena polipeptidica organizzata in 7  $\alpha$ -eliche transmembrana, con un dominio extracellulare N-terminale di lunghezza variabile, ed un dominio intracellulare C-terminale. I GPCRs condividono la stessa struttura a 7 domini di transmembrana, ma differiscono per vari aspetti: a) la lunghezza della sequenza N-terminale b) la localizzazione del sito di legame per l'agonista c) la presenza di aminoacidi comuni nella sequenza della proteina. Questi recettori sono inoltre correlati, all'interno della cellula, con altre proteine,  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$  che legano unità di guanosina difosfato. Durante l'attivazione del recettore la subunità  $\alpha$ , che possiede attività GTP-asi, scambia il GDP ad essa legato con GTP intracellulare, si dissocia dalle altre subunità ed è, quindi, in grado di attivare un effettore (enzima, un canale ionico, etc.).

Attualmente sono stati identificati nel genoma umano più di 800 geni codificanti per GPCRs, e solamente per circa 240 si conoscono i corrispondenti ligandi endogeni.

Quei recettori per cui non è ancora noto il ligando endogeno sono detti recettori orfani.

Durante gli ultimi dieci anni le tecniche di “*Reverse Pharmacology*”, cioè l'uso di recettori orfani ricombinanti per identificare i rispettivi ligandi endogeni, sono state validate quale approccio di successo per identificare i ligandi fisiologici [1].

Diversi sistemi peptidergici identificati con questo approccio si sono rivelati importanti nel regolare una serie di funzioni biologiche quali l'assunzione di cibo, la trasmissione del dolore, l'omeostasi cardiovascolare, il sonno, le risposte allo stress, l'abuso di farmaci e altre sostanze [2].

Una delle più recenti scoperte ottenute utilizzando tecniche di “*Reverse Pharmacology*” è quella del Neuropeptide S [3]. Dopo la sua scoperta, è stato osservato, tramite una analisi di tipo bioinformatico, che questo peptide, costituito da 20 aminoacidi,

possiede all'estremità N-terminale una sequenza di 6 aminoacidi altamente conservata in tutte le specie di vertebrati prese in esame, mentre le poche differenze sono state identificate a livello della regione C-terminale (**Figura 1**).

<b>SFRNGV</b> GTGMKKTSFQRAKS	uomo
<b>SFRNGV</b> GTGMKKTSFRAKS	scimpanzè
<b>SFRNGV</b> GSGAKKTSFRAKQ	topo
<b>SFRNGV</b> SGVKKTSFRAKQ	ratto
<b>SFRNGV</b> TGMKTSFRAKS	cane
<b>SFRNGV</b> SGIKKTSFRAKS	pollo

**Figura 1.** Struttura primaria del neuropeptide S nell'uomo, scimpanzè, topo, ratto, cane e pollo; i primi 6 residui aminoacidici (colorati di blu) sono conservati in tutte le specie indicate.

Il fatto che il residuo aminoacidico N-terminale sia una serina in tutte le specie analizzate ha indotto ad aggiungere la lettera S al nome di questo neuropeptide comunemente siglato come Neuropeptide S (NPS). Come molti altri neuropeptidi, anche NPS, deriva da una proteina precursore (ppNPS) che contiene un segnale idrofobico e siti basici di processazione (Lys-Arg) da parte di peptidasi (**Figura 2**).

MISSVKLNILVLSTMHVFWCYPVPSSKVSGKSDYFLILLNSCPTRLDRS  
 KELAFLKPILEKMFV**KR**SFRNGVGTGMKKTSFQRAKS

**Figura 2.** Struttura primaria di ppNPS. Il segnale idrofobico è la sequenza sottolineata e colorata in azzurro; le endoproteasi agiscono all'altezza dei due residui di Lys e Arg (KR) rilasciando il peptide maturo colorato in rosso.

NPS che viene liberato dal precursore, lega selettivamente e attiva il recettore GPCR 154 che è stato denominato recettore per NPS (NPSR) [3, 4].

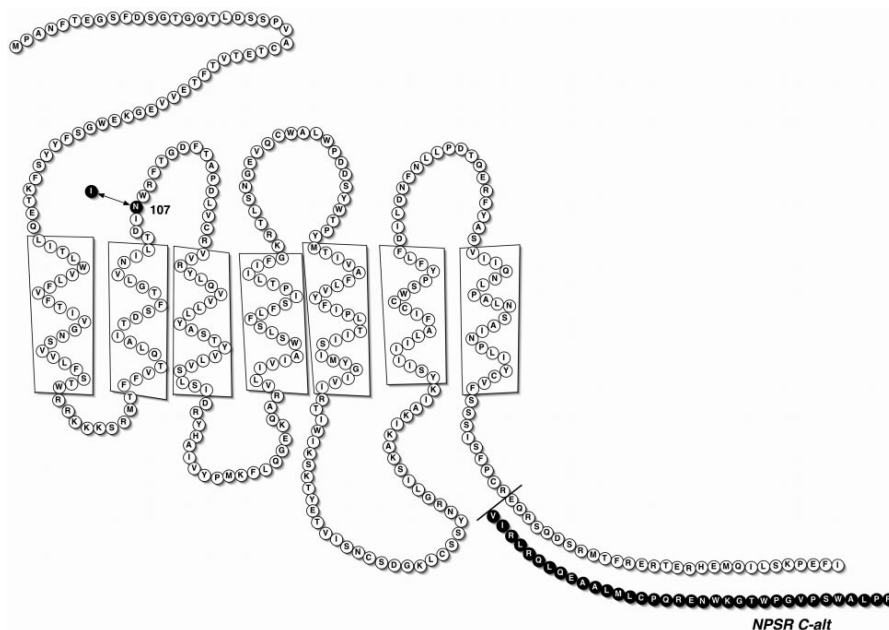
Nel presente lavoro di tesi si assumono le abbreviazioni di NPS per il neuropeptide S e di NPSR per il corrispettivo recettore.

Esperimenti di ibridazione in situ hanno mostrato che mRNA per NPSR sono diffusamente espressi a livello del SNC, mentre NPS è principalmente espresso a livello del Locus Coeruleus. Cellule che esprimono hNPSR rispondono a concentrazioni nanomolari di NPS provocando un aumento della concentrazione intracellulare di calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ), suggerendo un ruolo funzionale eccitatorio per questo sistema recettoriale. La somministrazione i.c.v. di NPS nel topo stimola l'attività locomotoria e produce inoltre, robusti effetti ansiolitici. Nel ratto, NPS sopprime tutti gli stadi del sonno, suggerendo un coinvolgimento di questo sistema nell' induzione e mantenimento dello stato di veglia. Il profilo comportamentale evocato dalla somministrazione sovraspinale di NPS (stimolazione dello stato di veglia associata ad effetti ansiolitici) appare quindi unico nel suo genere.

Sono tutt'ora in corso studi per aumentare le nostre conoscenze riguardo al ciclo sonno/veglia, all'ansia e per fornire informazioni dettagliate riguardo la neurochimica e la neurobiologia di queste funzioni cerebrali.

Lo sviluppo di ligandi selettivi per NPSR è quindi basilare per lo studio di questo nuovo sistema. Agonisti NPSR potrebbero trovare applicazioni nel trattamento della narcolessia e nell'ansia, mentre antagonisti per NPSR potrebbero trovare applicazione per i disturbi del sonno.

Dopo la deorfanzizzazione del recettore GPCR 154 è stato messo in evidenza, tramite studi successivi, l'esistenza di due varianti di tale recettore, denominate NPSR-A e NPSR-B. Le differenze in questione riguardano la regione C-terminale. E' stato inoltre evidenziato che una singola mutazione, Asn<sup>107</sup>/Ile<sup>107</sup>, a livello del ppNPSR, possa essere associata alla patologia asmatica, mentre non sono rilevate grosse variazioni di potenza di NPS nei confronti delle due varianti recettoriali NPSR-A e NPSR-B.



**Figura 3.** Rappresentazione schematica di hNPSR che mette in evidenza la localizzazione del polimorfismo N107I.

E' stato inoltre riportato che la mutazione Asn<sup>107</sup>/Ile<sup>107</sup> incrementa l'affinità del neuropeptide di circa 10 volte nel saggio di mobilizzazione del calcio intracellulare in cellule esprimenti le due isoforme recettoriali [5] (**Tabella 1**).

Varianti di NPSR	pEC <sub>50</sub> (nM)	
	Cellule CHO esprimenti NPSR	Cellule HEK NPSR
NPSR-A	8.3 ± 5.1	26.1 ± 17.3
NPSR-B	9.5 ± 7.6	48.3 ± 11.0
NPSRA-A-N107I	1.4 ± 1.0*	2.1 ± 1.3*
NPSRA-B-N107I	1.0 ± 0.5*	3.9 ± 1.0*

**Tabella 1.** Valori di pEC<sub>50</sub> di hNPS in cellule trasfettate con le diverse varianti di NPSR. I valori di pEC<sub>50</sub> (media ± SEM) sono stati ottenuti da curve concentrazione risposta relative alla mobilizzazione del Ca<sup>2+</sup> intracellulare da tre differenti linee cellulari clonali (CHO) o da popolazioni di cellule esprimenti il recettore trasfettato (HEK).



Dai risultati riportati in **Tabella 2**, si può notare come le isoforme human, mouse, e rat di NPS non sembrano presentare importanti variazioni di attività, mentre si nota un notevole aumento di potenza delle tre isoforme nei confronti del recettore mutato hNPSR-Ile<sup>107</sup> [4].

Peptide	Sequenza	hNPSR Asn <sup>107</sup>	hNPSR Ile <sup>107</sup>	mNPSR
hNPS 1-20	SFRNGVGTGMKTSFQRAKS	8.43 ± 1.47	1.78 ± 1.31	4.66 ± 1.13
hNPS 1-18	SFRNGVGTGMKTSFQRA	10.9 ± 1.2	2.59 ± 1.45	7.85 ± 1.2
rNPS 1-20	SFRNGVSGVKKTSFRRAKQ	3.1 ± 1.34	0.86 ± 0.13	1.11 ± 0.8
mNPS 1-20	SFRNGVSGAKKTSFRRAKQ	2.8 ± 1.37	0.77 ± 0.14	0.99 ± 0.24
hNPS 1-12	SFRNGVGTGMKK	> 10.000	2520 ± 118	32.5 ± 5.9
rNPS 1-10	SFRNGVSGVK	2090 ± 238	18.08 ± 13.6	98.4 ± 7.8

**Tabella 2.** Valori di pEC<sub>50</sub> (in nM ± SEM) di hNPS (1-20), (1-18) e (1-12), rNPS (1-20) e (1-10) e mNPS (1-20) in cellule trasfettate con hNPSR Ile<sup>107</sup>, hNPSR Asn<sup>107</sup>, mNPSR.

Tutti i peptidi sono stati testati per la mobilitazione intracellulare di Ca<sup>2+</sup> in cloni stabili ed indipendenti esprimenti le isoforme di NPSR. I valori di pEC<sub>50</sub> sono stati calcolati a partire da incubazioni triplicate. Sono mostrati i dati degli esperimenti; h = human, r = ratto, m = mouse.

Il primo studio struttura-attività (SAR) sulla sequenza umana di NPS è stato svolto dal gruppo di ricerca in cui ho svolto la Tesi di Dottorato [6]. In particolare, sono stati condotti studi preliminari di Ala-, D-scan (**Tabelle 3 e 4**) e di N- e C-terminal truncation (**Tabella 5**). La sistematica sostituzione nella sequenza primaria con un residuo di Alanina (Ala-scan), permette di avere informazioni riguardo l'importanza delle singole funzioni chimiche degli aminoacidi per l'interazione recettoriale, mentre studi di D-Xaa scan, forniscono indicazioni sull'importanza della chiralità e su eventuali induzioni conformazionali del peptide.

La N- e C-Terminal truncation permette di avere informazioni sulla minima sequenza di interazione recettoriale.

compound	Peptide sequence																				Agonist effect	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
hNPS	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S	7.94 ± 0.03	100
[Ala <sup>1</sup> ]hNPS	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.79 ± 0.09	85 ± 4
[Ala <sup>2</sup> ]hNPS	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	inactive	
[Ala <sup>3</sup> ]hNPS	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.86 ± 0.09*	49 ± 5*
[Ala <sup>4</sup> ]hNPS	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	crc incomplete: at 1 μM	25 ± 5
[Ala <sup>5</sup> ]hNPS	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.51 ± 0.13	89 ± 9
[Ala <sup>6</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.76 ± 0.15	98 ± 5
[Ala <sup>7</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	crc incomplete: at 1 μM	31 ± 7
[Ala <sup>8</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.02 ± 0.13	93 ± 11
[Ala <sup>9</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.11 ± 0.12	96 ± 7
[Ala <sup>10</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.09 ± 0.10	97 ± 5
[Ala <sup>11</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.78 ± 0.10	96 ± 5
[Ala <sup>12</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	7.95 ± 0.16	97 ± 5
[Ala <sup>13</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	-	8.01 ± 0.13	95 ± 9
[Ala <sup>14</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	-	7.92 ± 0.12	105 ± 12
[Ala <sup>15</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	-	7.97 ± 0.15	103 ± 18
[Ala <sup>16</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	-	7.99 ± 0.19	92 ± 4
[Ala <sup>17</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	-	-	7.90 ± 0.19	87 ± 4
[Ala <sup>19</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	-	8.03 ± 0.09	95 ± 5
[Ala <sup>20</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>A</b>	7.98 ± 0.07	94 ± 9

**Tabella 3.** Ala-scan di human NPS.

compound	Peptide sequence																				Agonist effect	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
hNPS	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S	8.10 ± 0.24	100
[DSer <sup>1</sup> ]hNPS	<b>s</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.81 ± 0.12	90 ± 17
[DPhe <sup>2</sup> ]hNPS	-	<b>f</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.51 ± 0.30*	109 ± 10
[DArg <sup>3</sup> ]hNPS	-	-	<b>r</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.03 ± 0.14*	106 ± 4
[DAsn <sup>4</sup> ]hNPS	-	-	-	<b>n</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.12 ± 0.26*	101 ± 5
[DVal <sup>6</sup> ]hNPS	-	-	-	-	<b>v</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	crc incomplete: at 1 μM	40 ± 3
[DThr <sup>8</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	<b>t</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.92 ± 0.07	112 ± 7
[DMet <sup>10</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>m</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.80 ± 0.09	100 ± 6
[DLys <sup>11</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>k</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.66 ± 0.14	105 ± 3
[DLys <sup>12</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>k</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.85 ± 0.12	97 ± 8
[DThr <sup>13</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>t</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	7.75 ± 0.17	105 ± 3
[DSer <sup>14</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>s</b>	-	-	-	-	-	-	-	7.90 ± 0.07	101 ± 6
[DPhe <sup>15</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>f</b>	-	-	-	-	-	-	7.87 ± 0.13	99 ± 8
[DGln <sup>16</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>q</b>	-	-	-	-	-	7.80 ± 0.20	102 ± 8
[DArg <sup>17</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>r</b>	-	-	-	-	7.79 ± 0.16	93 ± 4
[DAla <sup>18</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>a</b>	-	-	-	7.83 ± 0.28	105 ± 7
[DLys <sup>19</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>k</b>	-	-	7.78 ± 0.14	97 ± 6
[DSer <sup>20</sup> ]hNPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<b>s</b>	-	7.89 ± 0.15	104 ± 11

**Tabella 4.** D-scan di human NPS.

compound	Peptide sequence																				Agonist effect	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
hNPS	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S	8.54 ± 0.03	100
hNPS(2-20)		F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S	7.80 ± 0.11*	107 ± 4
hNPS(3-20)			R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(4-20)				N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(5-20)					G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(6-20)						V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(7-20)							G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(8-20)								T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(9-20)									G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(10-20)										M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(11-20)											K	K	T	S	F	Q	R	A	K	S		inactive
hNPS(1-19)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A	K		8.52 ± 0.06	102 ± 3
hNPS(1-18)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R	A			8.52 ± 0.34	103 ± 4
hNPS(1-17)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q	R				8.30 ± 0.31	105 ± 5
hNPS(1-16)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F	Q					8.64 ± 0.11	98 ± 2
hNPS(1-15)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S	F						8.29 ± 0.15	102 ± 2
hNPS(1-14)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T	S							8.59 ± 0.03	110 ± 5
hNPS(1-13)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K	T								8.45 ± 0.07	109 ± 5
hNPS(1-12)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K	K									8.39 ± 0.25	103 ± 7
hNPS(1-11)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M	K										8.31 ± 0.41	92 ± 3
hNPS(1-10)	S	F	R	N	G	V	G	T	G	M											8.32 ± 0.06	106 ± 2

**Tabella 5.** N- e C- terminal truncation di human NPS.

Da questi studi emerge che:

- 1- il frammento minimo in grado di attivare il recettore per NPS con la stessa potenza del peptide naturale è la sequenza [1-10]hNPS;
- 2- la sequenza Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Asn<sup>4</sup> è determinante per l'attività biologica del peptide;
- 3- la sequenza Gly<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Thr<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup>-Met<sup>10</sup> può avere un ruolo cruciale nell'indurre e/o stabilizzare la struttura bioattiva di NPS.

## SCOPO DELLA TESI

Il contributo di alcuni residui aminoacidici per l'attivazione del NPSR può essere molto importante per l'attività biologica del Neuropeptide S. Queste indagini possono essere utili per il design di un modello farmacoforico di interazione recettoriale.

### *Studio della posizione 2 (Phe)*

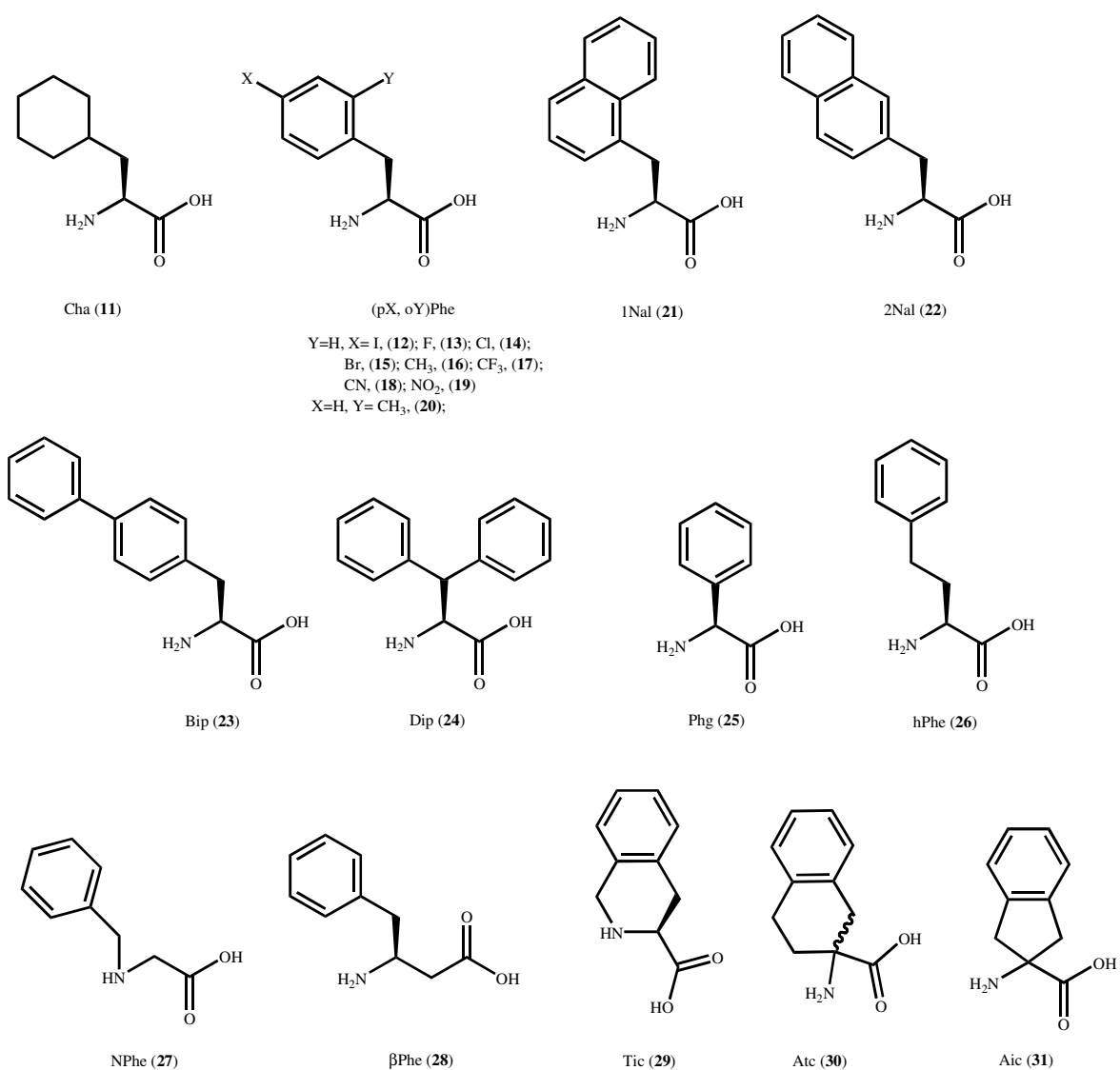
Dai primi studi SAR di hNPS è emerso che l'estremità N-terminale del peptide, Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Asn<sup>4</sup>, del peptide riveste una particolare importanza per l'attività biologica [6, 7]. Può essere quindi utile indagare in modo più dettagliato le caratteristiche chimico-fisiche necessarie per l'interazione ed attivazione del recettore dei residui presenti in queste posizioni. A questo scopo Phe<sup>2</sup> è stata sostituita con residui con caratteristiche chimico-fisiche diverse:

- i) aminoacidici con catena laterale aromatica (His, Tyr, Trp);
- ii) aminoacidi con catena laterale alifatica (Leu);
- iii) aminoacidi basici o acidi (Lys, Asp, Glu);
- iv) aminoacidi con catena laterale idrofila (Asn, Gln, Thr).

Inoltre sono stati anche utilizzati nella posizione 2 analoghi della fenilalanina (le strutture chimiche degli aminoacidi utilizzati sono riportate in **Figura 4**) che sono stati progettati sulla base di:

- i) variazioni del nucleo aromatico (Cha, (pX) e (oY) Phe, 1Nal, 2Nal, Bip, Dip);
- ii) modifiche della distanza della catena benzilica dal backbone peptidico (Phg, hPhe) o shift del gruppo aromatico dal C $\alpha$  all'azoto (NPhe) o dal C $\alpha$  al C $\beta$  ( $\beta$ Phe);
- iii) restrizioni conformazionali (Tic, Atc, Aic).

.



**Figura 4.** Struttura chimica degli aminoacidi non naturali utilizzati in posizione 2.

### *Studio della posizione 3 (Arg)*

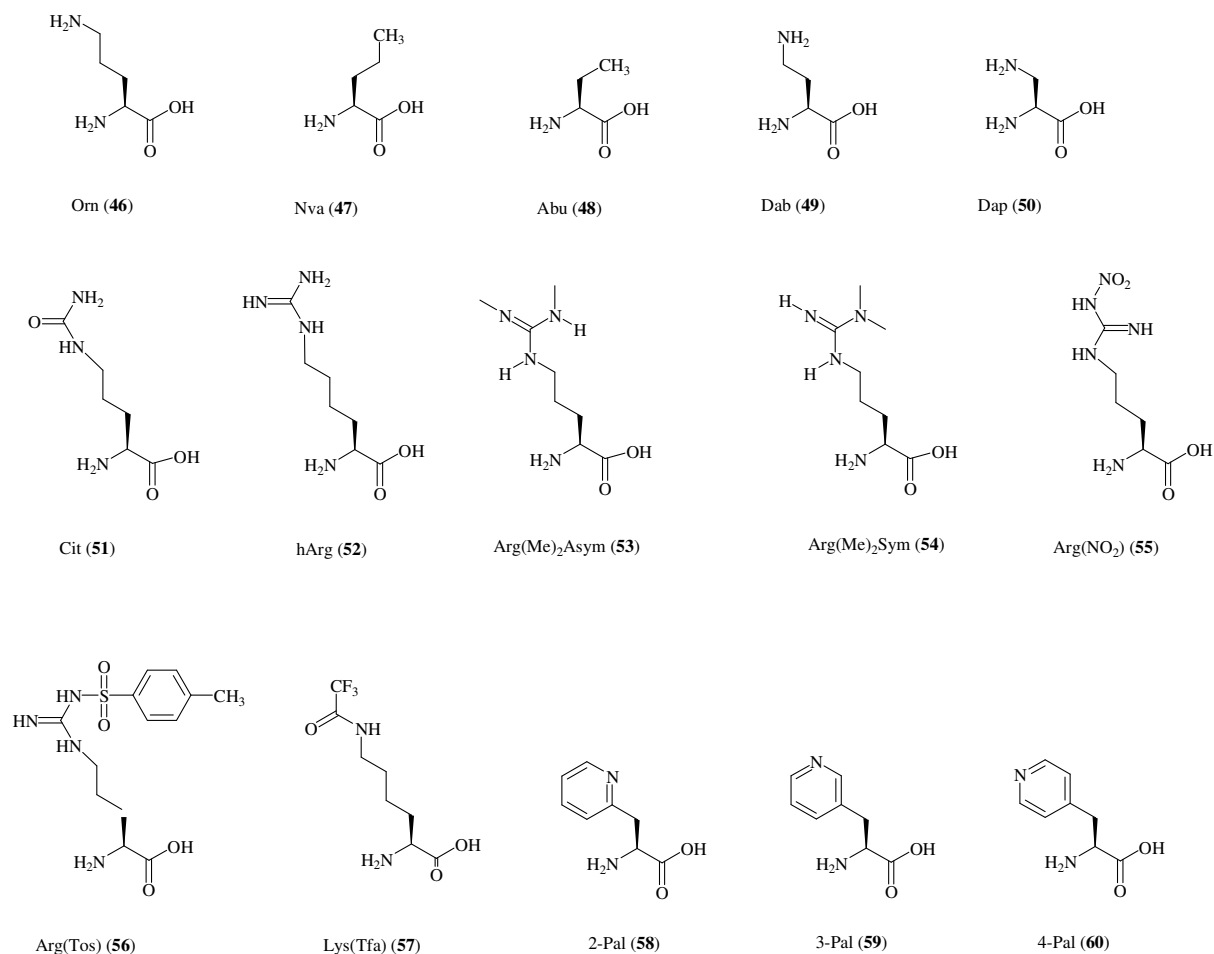
Come riportato precedentemente la sostituzione di Arg<sup>3</sup> con Ala, come nel composto [Ala<sup>3</sup>]hNPS, determina una riduzione di potenza di circa 10 volte rispetto al peptide naturale ed è accompagnata da una riduzione di efficacia del 50% (**Tabella 3**). Questo dato biologico ha fatto ipotizzare che il composto [Ala<sup>3</sup>]hNPS potesse comportarsi da agonista parziale del recettore NPSR. Testato in vivo nel topo, hNPS è in grado di stimolare l'attività locomotoria e di revertire l'immobilità indotta dalla somministrazione di diazepam. In animali trattati con diazepam, [Ala<sup>3</sup>]hNPS non modifica il comportamento dell'animale, tuttavia questa molecola è in grado di prevenire gli effetti stimolatori indotti dalla somministrazione di hNPS [6].

Il fatto che [Ala<sup>3</sup>]hNPS sia in grado di antagonizzare in vivo nel topo gli effetti indotti dalla somministrazione di hNPS ha accentuato l'importanza della posizione 3 di hNPS per l'interazione e l'attivazione di NPSR.

Con lo scopo di incrementare le informazioni sul meccanismo di interazione del residuo Arg<sup>3</sup> e NPSR, in questo studio abbiamo sostituito Arg<sup>3</sup> nella sequenza di hNPS, con una serie di aminoacidi. In particolare sono stati impiegati:

- i) aminoacidi con catena laterale basica (Lys, Orn, Dab, Dap);
- ii) aminoacidi, analoghi della arginina, che presentano modifiche chimiche della funzione guanidinica (Arg(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> sym, e asym, hArg, Arg(NO<sub>2</sub>), Arg(Tos));
- iii) aminoacidi con catena laterale alifatica ramificata o lineare (Leu, Val, Nva, Abu);
- iv) aminoacidi con catena laterale idrofila (Thr, Gln, Gly, Ser, Asn, Cys, Lys(Tfa), Cit) o acida (Asp, Glu);
- v) aminoacidi aromatici contenenti anche una funzione polare o debolmente basici (Phe, Tyr, His, Pal).

Le strutture chimiche degli aminoacidi non naturali utilizzati in posizione 3 sono riportati in **Figura 5**.



**Figura 5.** Struttura chimica degli aminoacidi non naturali utilizzati in posizione 3.

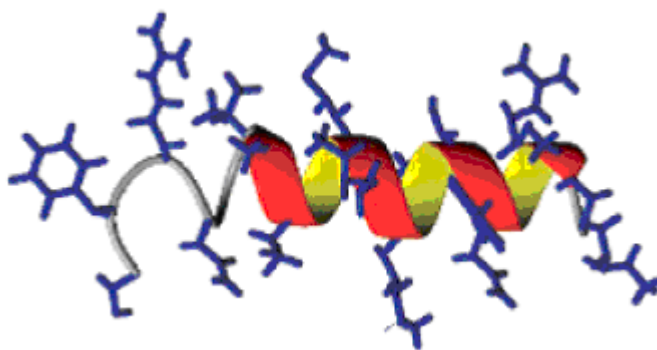
### **Studio della posizione 5 (Gly)**

Il Neuropeptide S è stato anche studiato mediante NMR e CD per evidenziare aspetti conformazionali specifici della molecola.

In un lavoro recente Tancredi et al. [7] hanno riportato che il peptide in soluzione non mostra aspetti conformazionali specifici e misurabili e questo risultato è supportato dalla presenza di molti residui flessibili nella sequenza del peptide come Gly, Ser, Thr.

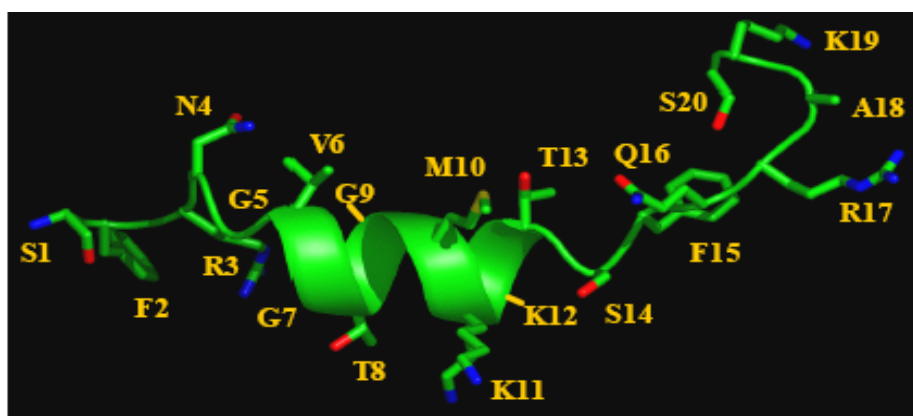
Gli stessi autori hanno inoltre riportato che la sostituzione di Gly<sup>7,9</sup> e Thr<sup>13</sup> con L-Ala, aminoacido noto in letteratura essere un induttore di  $\alpha$ -elica, lascia intravedere, in silico,

una struttura ordinata di tipo elicoidale. Abbiamo quindi sintetizzato il peptide [Ala<sup>7,9,13</sup>] la cui struttura (**Figura 6**), confermata con dati di NMR, è di un'alfa elica particolarmente stabile. L'analogo risulta però inattivo nei confronti di NPSR e ciò induce a ritenere che la conformazione ad alfa elica non sia compatibile con l'attività biologica del peptide.



**Figura 6.** Conformazione di [Ala<sup>7,9,13</sup>]hNPS [7].

Successivamente al nostro lavoro conformazionale i ricercatori dell'industria farmaceutica Merck hanno però formulato l'ipotesi di una probabile struttura elicoidale nella porzione 5-13 di hNPS [5] (**Figura 7**).



**Figura 7.** Ipotesi conformazionale di hNPS formulata dai ricercatori Merck.



La presenza di Asn<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup> all'estremità N-terminale del peptide induce a ritenere che in questa regione sia presente una conformazione bioattiva di tipo  $\beta$ -turn con i due residui aminoacidici menzionati al vertice del ripiegamento. Questa ipotesi di struttura è supportata dalla presenza di questi residui, con elevata frequenza, in posizione i+1 e i+2 di molti  $\beta$ -turns di proteine globulari [8]. Con questo assunto e se il ruolo di Asn<sup>4</sup> è prevalentemente strutturale, senza interazioni specifiche del gruppo amidico con il recettore, può essere possibile la sostituzione di Asn<sup>4</sup> con residui aminoacidici che inducono  $\beta$ -bend.

Abbiamo quindi sintetizzato tre peptidi nei quali Asn<sup>4</sup> è stata sostituita con gli aminoacidi His, L/D-Pro (i dati farmacologici ottenuti sono riportati in **Tabella 6**). I derivati sintetizzati e testati farmacologicamente non interagiscono con NPSR a concentrazioni nM (His e D-Pro) o risultano meno attivi rispetto al peptide di riferimento (Pro).

Composto	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± SEM
hNPS	8.04 (7.76-8.32)	175 ± 18%
[Ala <sup>5</sup> ]NPS	7.61 (7.31-7.91)	178 ± 16%
[D-Ala <sup>5</sup> ]NPS	7.55 (7.03-8.07)	90 ± 15%*
[His <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 147 ± 38%	
[Pro <sup>4</sup> ]NPS	6.80 (6.48-7.12)	167 ± 19%
[D-Pro <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 66 ± 48%	
[Aib <sup>5</sup> ]NPS	6.72 (6.43-7.00)	65 ± 9%*

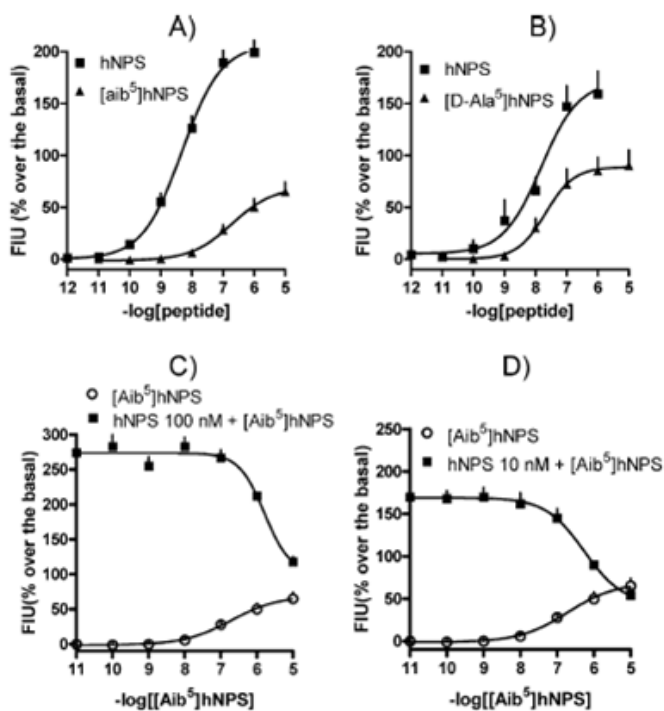
**Tabella 6.** Profilo farmacologico di hNPS e di analoghi di hNPS testati in cellule HEK 293 esprimenti il recettore mNPSR.

\*: significativamente diverso da E<sub>max</sub> di hNPS in accordo ad ANOVA seguita dal test di Dunnet . I dati sono media ± SEM di almeno 5 esperimenti separati.

Questi dati ci hanno suggerito di studiare in modo più mirato l'aminoacido glicina presente nelle posizioni 5, 7 e 9 sostituendolo con residui che potessero essere maggiormente compatibili di Gly con una struttura di tipo elicoidale (L/D-Ala, Aib).

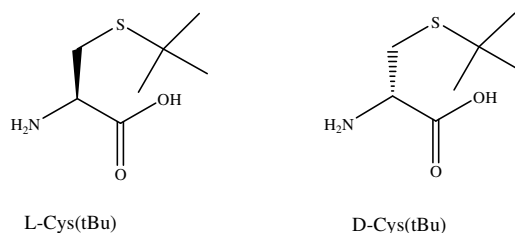
I risultati ottenuti da questo studio confermano che tra le posizioni 5 e 7, a ridosso del message domain del peptide, non si riscontra una struttura elicoidale [7].

Da questo studio è emerso inoltre un dato particolarmente interessante, in termini di attività farmacologica, in quanto i derivati [D-Ala<sup>5</sup>]NPS e [Aib<sup>5</sup>]hNPS riducono significativamente l'attivazione di NPSR (Tabella 6 e Figura 8), fornendo indicazioni di un plausibile drug design di tipo peptidico per molecole in grado solamente di occupare il recettore.



**Figura 8.** Profilo farmacologico di [Aib<sup>5</sup>]hNPS e [D-Ala<sup>5</sup>]hNPS. Per il saggio sono state utilizzate cellule HEK 293 di topo esprimenti stabilmente il recettore mNPSR ed i dati ottenuti sono espressi come variazione della fluorescenza in percentuale del basale. (A) hNPS vs [Aib<sup>5</sup>]hNPS; (B) hNPS vs [D-Ala<sup>5</sup>]hNPS; [Aib<sup>5</sup>]hNPS quando è testato contro una concentrazione di 100 (C) oppure 10 (D) nM per hNPS è in grado di inibire, all'aumentare della sua concentrazione, gli effetti stimolatori dati da hNPS.

Un tentativo ulteriore per il disegno di antagonisti peptidici per NPSR è stato fatto utilizzando residui dotati di particolare ingombro sterico nelle configurazioni relative L e D. Abbiamo sostituito Gly<sup>5</sup> con il residuo voluminoso di L/D-Cys(tBu) (**Figura 11**) Questo particolare residuo aminoacidico è stato scelto come “induttore conformazionale” sulla base dei soli aspetti relativi alla facilità di sintesi.

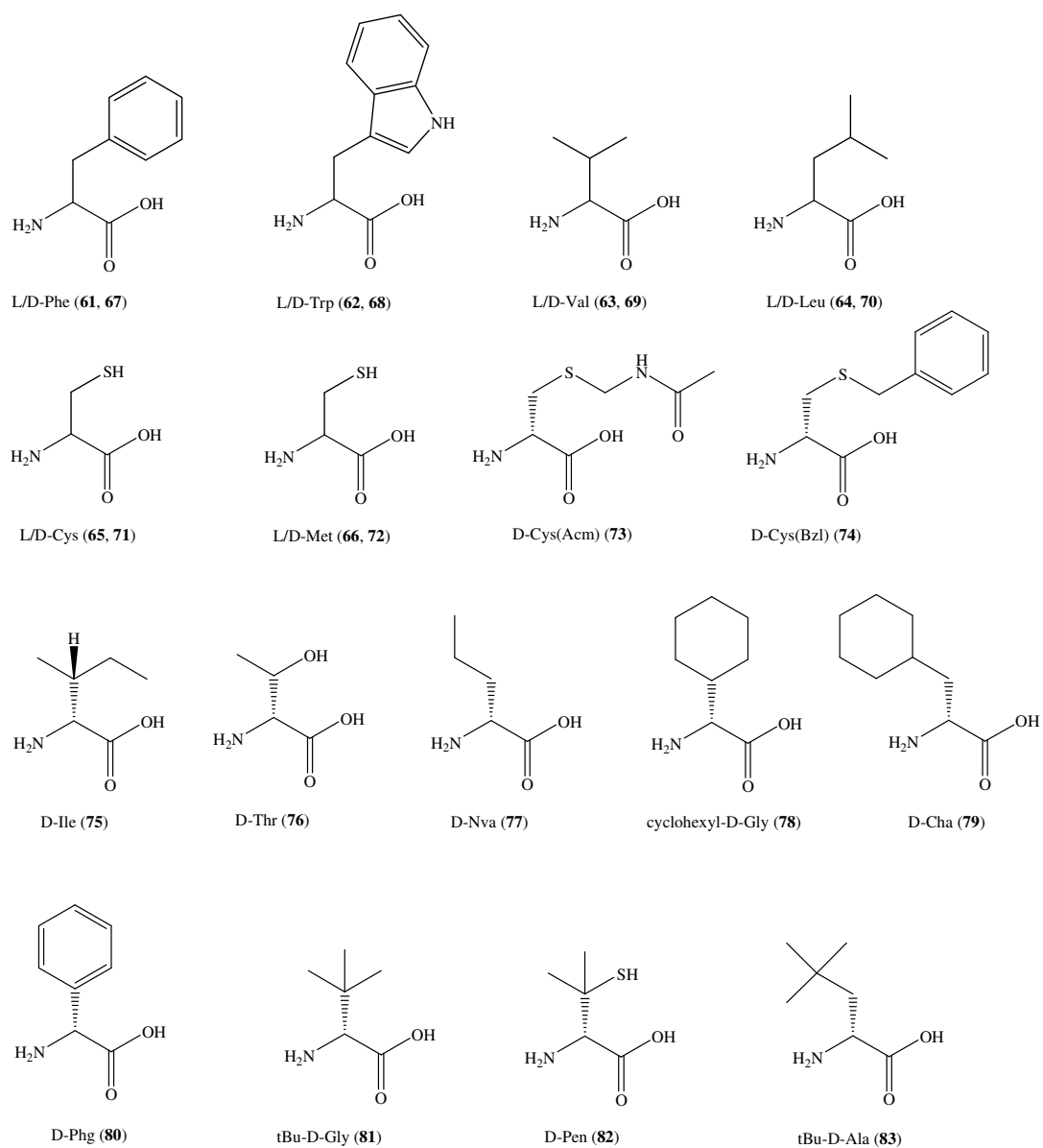


**Figura 9.** Struttura chimica dell'aminoacido L/ D-Cys(tBu).

I derivati ottenuti mostrano un comportamento interessante poiché il derivato di configurazione relativa L determina una significativa riduzione di attivazione recettoriale ( $pEC_{50} = 6.82$  ed  $E_{max} = 66\%$  con hNPS 8.02 e 248 %), mentre nella configurazione relativa D genera un composto con attività antagonista ( $pKb = 6.62$ ) [9]. Sulla base di queste indicazioni è stato logico esplorare in modo “random” la posizione 5 con residui con caratteristiche chimico fisiche e chiralità diverse.

In particolare per sintetizzare gli analoghi di hNPS modificati in posizione 5 sono stati impiegati:

- i) aminoacidi con catena laterale alifatica ramificata (D/L-Val; D/L-Leu, D-Ile);
- ii) aminoacidi naturali con catena laterale presentante gruppi aromatici (L/D-Phe; L/D-Trp);
- iii) aminoacidi con catene laterale presentante eteroatomi (L/D-Cys, L/D-Met, D-Thr);
- iv) aminoacidi analoghi della cisteina nella serie sterica D protetti sulla catena laterale [D-Cys(Acm); D-Cys(Bzl)];
- v) aminoacidi con catena laterale alifatica lineare (D-Nva);
- vi) aminoacidi con catena laterale più ingombrata (cyclohexyl-D-Gly, D-Cha, D-Phg, tBu-D-Ala);
- vi) aminoacidi che permettono l'introduzione di un altro sostituente sul C $\beta$  di D-Val (D-Gly(tBu) [R = CH<sub>3</sub>] e D-Pen [R = SH]).



**Figura 10.** Struttura chimica degli aminoacidi utilizzati in posizione 5.

### Studio della posizione 4 (Asn)

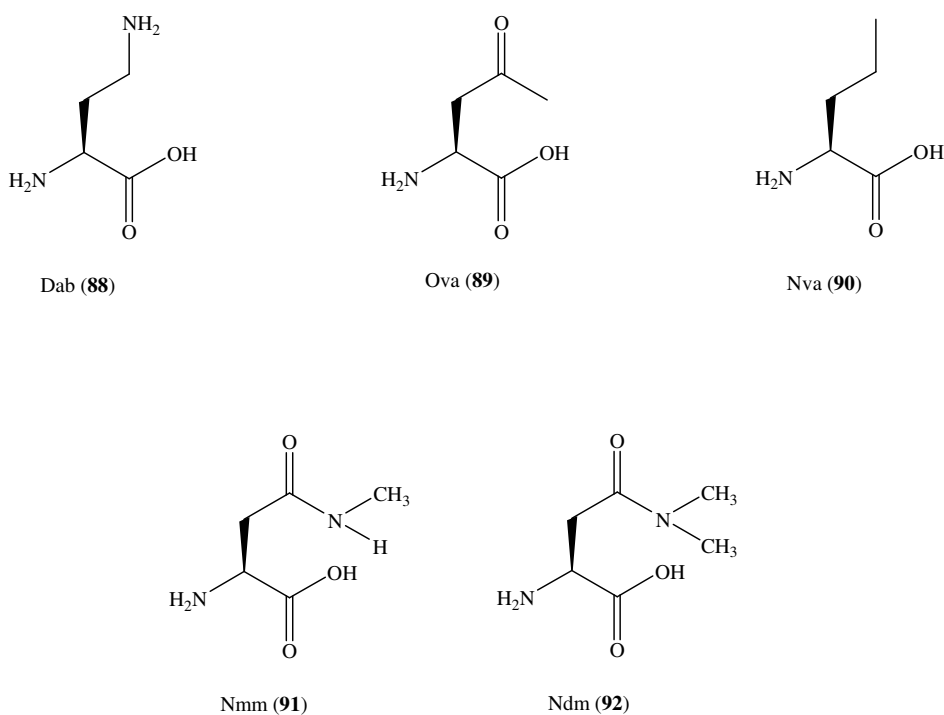
Dagli studi SAR del Neuropeptide è emerso che la catena laterale di Asn<sup>4</sup> riveste un ruolo importante per l'interazione con il recettore [6,7].

E' razionale ritenere che la funzione amidica del residuo di asparagina possa determinare interazioni specifiche con residui aminoacidici del recettore.

Allo scopo di raccogliere informazioni sui requisiti chimici di interazione relativi al residuo Asn<sup>4</sup> abbiamo progettato una serie di analoghi di NPS dove la funzione amidica è stata modificata chimicamente. In **Figura 11** sono riportati gli aminoacidi non proteinogenici sostituiti all' asparagina in questo studio.

In particolare abbiamo:

- i) impiegato amminoacidi con farmacofori diversi da quello amidico (Phe,Thr);
- ii) ridotto la funzione amidica ad aminica (Dab);
- iii) trasformato la funzione amidica in chetonica (Ova);
- iv) monometilato e dimetilato la funzione amidica (Nmm, Ndm);
- v) trasformato la funzione amidica in una catena lineare idrofobica (Nva);
- vi) aumentato la distanza della funzione amidica dal backbone peptidico (Gln).



**Figura 11.** Struttura chimica degli aminoacidi non naturali utilizzati in posizione 4.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I test biologici sugli analoghi sintetizzati sono stati condotti nel Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Farmacologia dell' Università degli Studi di Ferrara.

hNPS e tutti i composti sintetizzati sono stati valutati nel saggio di mobilizzazione del calcio in cellule HEK-293 trasfettate stabilmente con il recettore NPSR di topo, utilizzando il sistema automatizzato multicanale FlexStation II.

Come controllo sono state utilizzate anche cellule wild-type, ovvero cellule che non esprimono il recettore del mNPS. Sulle stesse cellule e sulle cellule wild type è stato testato il carbacolo, sostanza in grado di attivare la stessa via di trasduzione del NPS/NPSR.

Lo strumento utilizzato FlexStation II è costituito da un fluorimetro, una lampada Xenon, un pipettatore integrato 8 canali, un sistema di misurazione della temperatura, un software per l'acquisizione ed elaborazione dei dati. Dal punto di vista ottico, una sorgente di luce emette un'onda elettromagnetica che, grazie ad una serie di specchi e collimatori, viene fatta convergere sui singoli pozzetti di cellule caricate con il fluoroforo "Fluo-4-acetoxymethyl estere" (Fluo 4-AM). La lunghezza d'onda di eccitazione è di 488 nm, mentre la radiazione emessa dal campione irradiato ha una diversa lunghezza d'onda (525 nm) che viene registrata e amplificata dallo strumento.

Il test prevede l'incubazione delle cellule esprimenti il recettore NPSR 30 minuti prima dell'esperimento con un fluoroforo calcio-dipendente, Fluo-4-AM.

Il fluoroforo una volta internalizzato nelle cellule viene processato da enzimi denominati esterasi che idrolizzano i legami esterei della molecola liberando così le funzionalità carbossiliche; il fluoroforo è così in grado di chelare il  $Ca^{2+}$ . Il complesso  $Ca^{2+}$ -Fluoroforo eccitato dalla radiazione elettromagnetica incidente è in grado di emettere una radiazione la cui intensità sarà proporzionale alla quantità del complesso formatosi.

Conoscendo la fluorescenza basale, che viene determinata dallo strumento prima dell'inizio dell'esperimento, è possibile valutare l'incremento della fluorescenza che

misura la quantità di  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulare. I dati farmacologici riportati nelle tabelle (**Tabelle 7-11**) rappresentano la media di almeno 5 esperimenti eseguiti in triplicato. La potenza agonista è espressa come  $\text{pEC}_{50}$  (logaritmo negativo in base 10 della concentrazione molare di agonista che produce il 50% dell'effetto massimo possibile). L'attività antagonista dei peptidi è stata valutata in esperimenti di inibizione e la potenza, espressa come  $\text{pK}_B$ , calcolata con la seguente equazione:  $\text{K}_B = \text{IC}_{50} / ((2 + ([A]/\text{EC}_{50})^n)^{1/n} - 1)$ , dove  $\text{IC}_{50}$  è la concentrazione di antagonista che produce il 50% di inibizione della risposta dell'agonista,  $[A]$  è la concentrazione di agonista,  $\text{EC}_{50}$  è la concentrazione di agonista che produce il 50% della risposta massima e  $n$  è il coefficiente di Hill della curva concentrazione-risposta di hNPS.

### *Studio della posizione 2 (Phe)*

I composti riportati in **Tabella 7 e 8** sono stati valutati biologicamente nella medesima preparazione, con il medesimo protocollo sperimentale ma in due diversi preparati di cellule trasfettate con mNPSR; questo ha comportato una variabilità minima di risultati stimabile con la diversa risposta del composto di riferimento che è risultato, nel primo protocollo di screening, più potente e con un effetto massimo leggermente superiore rispetto al secondo esperimento.

La sostituzione di  $\text{Phe}^2$  con altri farmacofori aromatici determina una diminuzione di potenza di circa 2 log con His (composto **1**), mentre con gli aminoacidi Tyr (composto **2**) e Trp (composto **3**) solo una debole diminuzione di attività agonista.

Un farmacoforo non aromatico come Leu (composto **4**) determina una diminuzione di potenza di circa 1 log. La serie di analoghi con aminoacidi idrofili (composti **8-10**), a carattere basico (composto **5**) e acido (composti **6, 7**) è caratterizzata da una considerevole perdita in termini di potenza (>3 log).

La lipofilia della catena laterale dell'aminoacido in posizione 2 è un requisito importante per l'interazione con NPSR, così come un certo ingombro sterico dato che la sostituzione Ala/ $\text{Phe}^2$ , come precedentemente riportato non è compatibile con l'attività biologica [6].

L'aromaticità della catena laterale non è un requisito fondamentale per l'attività biologica; poiché nessun composto testato si è rivelato più potente rispetto al peptide di

riferimento è possibile identificare nel benzile di Phe<sup>2</sup> la struttura chimica che meglio favorisce l'interazione con il recettore.

Sulla base di queste semplici considerazioni è stato programmato uno studio SAR più dettagliato per investigare le caratteristiche chimiche dell'anello aromatico di Phe<sup>2</sup> che possono migliorare l'attività del peptide.

La sostituzione di Phe con il corrispondente derivato aminoacidico non aromatico (composto **11**) è ben tollerata e l'analogo peptidico ha un'attività paragonabile a quella di hNPS. Questo dato conferma l'indicazione mostrata dal composto **4** che l'aromaticità in posizione 2 non sia fondamentale per l'interazione con NPSR. Un farmacoforo con caratteristiche lipofile e di natura ciclica è meglio tollerato di un residuo lipofilo non ciclico.

La sostituzione in posizione para di Phe con alogeni (composti **12-15**), con un debole gruppo elettron donatore (composto **16**) o gruppi elettron attrattori (composti **17-19**) non modifica sostanzialmente l'attività di hNPS. Anche la sostituzione in orto con lo stesso gruppo elettron donatore (composto **20**) non modifica l'attività rispetto alla posizione para. Si può concludere che l'assetto elettronico dell'anello aromatico di Phe<sup>2</sup> non sia importante per l'interazione con NPSR.

Un secondo anello aromatico è tollerato nei composti **21** e **22** (Nal isomeri) ma non nel caso di [Bip<sup>2</sup>]hNPS (composto **23**) e [Dip<sup>2</sup>]hNPS (composto **24**) che risultano 10 e 1000 volte meno potenti. Si può quindi evincere che la tasca recettoriale che ospita l'aminoacido in posizione 2 non richiede particolari requisiti di ingombro sterico, in quanto solo l'analogo [Dip<sup>2</sup>]hNPS risulta inattivo.

Da notare che il composto **23** mostra una riduzione di efficacia statisticamente significativa rispetto a hNPS, essendo il suo effetto massimo solo il 62% rispetto a quello evocato dal peptide naturale (**Figura 12**). Ciò suggerisce che la sostituzione in posizione para di Phe<sup>2</sup> con un altro farmacoforo di tipo aromatico possa modificare il legame e l'attivazione di NPSR.

La distanza dell'anello aromatico dal backbone peptidico è importante, la sua riduzione (composto **25**) determina inattività biologica mentre incrementandola (composto **26**) si ottiene un composto solo 3 volte meno potente di hNPS.

Anche lo shift della catena benzilica di Phe influenza l'attività dei composti: con N-shift (composto **27**) si ottiene un peptide 10 volte meno attivo, mentre un  $\beta$ -shift (composto



**28)** determina inattività. I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che la disposizione spaziale dell'anello aromatico di Phe<sup>2</sup> e il relativo contributo del backbone peptidico sono importanti per l'attività biologica. Queste ipotesi sono in sostanziale accordo con i dati relativi all'utilizzo in posizione 2 di analoghi "constrained" della fenilalanina; la ciclizzazione della catena aromatica sull' N $\alpha$  (composto **29**) o sul carbonio chirale (composti **30**, **31**) riduce di 1 log l'attività dei composti.

L'aminoacido 2-aminotetralino-2-carbossilico acido (Atc) è stato utilizzato come miscela racemica ma non è stato possibile separare, tramite HPLC preparativo, i diastereoisomeri ottenuti; l'attività del composto **30** è quindi relativa alla miscela dei diastereoisomeri.

No	Composto	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> $\pm$ SEM
	hNPS	8.96 (8.81-9.11)	270 $\pm$ 12%
<b>1</b>	[His <sup>2</sup> ]NPS	6.88 (6.79-6.97)	288 $\pm$ 5%
<b>2</b>	[Tyr <sup>2</sup> ]NPS	8.63 (8.38-8.88)	312 $\pm$ 5%
<b>3</b>	[Trp <sup>2</sup> ]NPS	8.65 (8.45-8.85)	323 $\pm$ 4%
<b>4</b>	[Leu <sup>2</sup> ]NPS	8.08 (7.92-8.24)	282 $\pm$ 15%
<b>5</b>	[Lys <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 103 $\pm$ 15%	
<b>6</b>	[Asp <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 39 $\pm$ 3%	
<b>7</b>	[Glu <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 170 $\pm$ 20%	
<b>8</b>	[Asn <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 49 $\pm$ 2%	
<b>9</b>	[Gln <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 54 $\pm$ 6%	
<b>10</b>	[Thr <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 $\mu$ M 114 $\pm$ 5%	

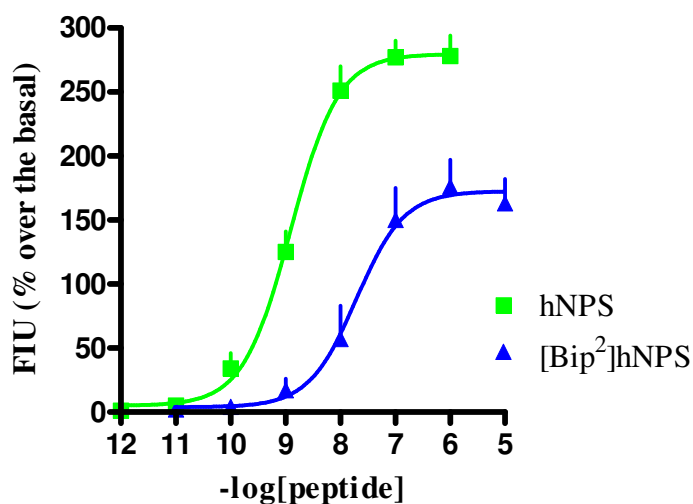
**Tabella 7.** Profilo farmacologico di hNPS e di analoghi di [Xaa<sup>2</sup>]hNPS sostituiti con aminoacidi naturali testati in cellule HEK 293 esprimenti il recettore mNPSR.

No	Composto	pEC <sub>50</sub> (CI <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± SEM
	hNPS	8.93 (8.86-9.00)	260 ± 12%
11	[Cha <sup>2</sup> ]NPS	8.87 (8.29-9.45)	221 ± 16%
12	[(pI)Phe <sup>2</sup> ]NPS	8.75 (8.54-8.96)	243 ± 25%
13	[(pF)Phe <sup>2</sup> ]NPS	8.96 (8.72-9.20)	291 ± 21%
14	[(pCl)Phe <sup>2</sup> ]NPS	9.15 (8.81-9.49)	298 ± 27%
15	[(pBr)Phe <sup>2</sup> ]NPS	9.19 (8.93-9.45)	309 ± 26%
16	[(pCH <sub>3</sub> )Phe <sup>2</sup> ]NPS	9.17 (8.77-9.57)	317 ± 18%
17	[(pCF <sub>3</sub> )Phe <sup>2</sup> ]NPS	8.59 (8.34-8.84)	286 ± 12%
18	[(pCN)Phe <sup>2</sup> ]NPS	8.48 (8.19-8.77)	296 ± 14%
19	[(pNO <sub>2</sub> )Phe <sup>2</sup> ]NPS	8.44 (8.24-8.64)	290 ± 10%
20	[(oCH <sub>3</sub> )Phe <sup>2</sup> ]NPS	8.73 (7.89-9.57)	222 ± 40%
21	[1NaI <sup>2</sup> ]NPS	8.71 (7.43-9.33)	232 ± 6%
22	[2NaI <sup>2</sup> ]NPS	8.66 (8.44-8.88)	213 ± 14%
23	<b>[Bip<sup>2</sup>]NPS</b>	<b>7.70 (6.98-8.42)</b>	<b>170 ± 19%*</b>
24	[Dip <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete. at 10 μM	130 ± 31%
25	[Phg <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete. at 10 μM	141 ± 24%
26	[hPhe <sup>2</sup> ]NPS	8.38 (7.43-9.33)	216 ± 23%
27	[NPhe <sup>2</sup> ]NPS	7.81 (7.25-8.37)	246 ± 13%
28	[βPhe <sup>2</sup> ]NPS	crc incomplete. at 10 μM	177 ± 24%
29	[Tic <sup>2</sup> ]NPS	8.09 (8.01-8.17)	244 ± 19%

30	[Atc <sup>2</sup> ]NPS	7.95 (7.30-8.60)	257 ± 27%
31	[Aic <sup>2</sup> ]NPS	7.47 (6.84-8.10)	211 ± 34%

**Tabella 8.** Profilo farmacologico di hNPS e di analoghi di [Xaa<sup>2</sup>]hNPS sostituiti con aminoacidi non naturali testati in cellule HEK 293 esprimenti il recettore mNPSR.

\*: significativamente diverso da E<sub>max</sub> di hNPS in accordo ad ANOVA seguita dal test di Dunnett . I dati sono media ± SEM di almeno 5 esperimenti separati.



**Figura 12.** Curve concentrazione-risposta di hNPS e [Bip<sup>2</sup>]hNPS.

### Studio della posizione 3 (Arg)

Gli analoghi dell'arginina utilizzati in questo studio (composti **52-56**) risultano in genere tollerati ad esclusione del composto **56** che non è attivo a livello nM.

La funzione guanidinica in posizione 3 non è requisito essenziale per l'interazione con il recettore. La drastica riduzione della basicità come nel derivato Arg(NO<sub>2</sub>) (composto **55**) non compromette l'interazione con NPSR. Questo dato è confermato, come verrà descritto successivamente, con l'acetilazione di una funzione aminica (composto **57**).

La tasca recettoriale in grado di accogliere la catena laterale di Arg<sup>3</sup> sembra possedere dimensioni limitate: l'allungamento della catena laterale di un'unità metilenica (hArg) (composto **52**), la metilazione della funzione guanidinica in modo simmetrico (composto **54**) o asimmetrico (composto **53**) e la nitratura Arg(NO<sub>2</sub>) (composto **55**) non influenzano in modo drastico la potenza mentre l'introduzione sulla funzione guanidinica di un gruppo ingombrante come il tosile Arg(Tos) (composto **56**), molto probabilmente per la presenza del farmacoforo aromatico, impedisce l'interazione con NPSR.

La sostituzione di Arg<sup>3</sup> con aminoacidi aromatici naturali e non naturali (composti **32-34, 58-60**) compromette l'interazione con NPSR e gli analoghi sono 100 volte meno attivi se paragonati al peptide di riferimento. L'aromaticità in posizione 3 non è tollerata, anche in presenza di funzioni chimiche o di eteroatomi in grado di accettare/donare legame idrogeno (Tyr, His, 2'-, 3' e - 4'-Pal).

Aminoacidi basici, caratterizzati da una catena laterale che porta una funzione amminica primaria (composti **43, 46, 49, 50**), come aspettato, sono tollerati e mostrano una potenza variabile a seconda dell'aminoacido. La sostituzione di Arg<sup>3</sup> con Lys comporta una debole riduzione di potenza, che si accentua con la progressiva delezione dello spacer tra la funzione basica ed il backbone peptidico (Lys>Orn>Dab>Dap).

Aminoacidi con catena laterale alifatica ramificata (composti **35** e **36**) riducono sostanzialmente l'attività, mentre aminoacidi a catena laterale alifatica lineare (composti **47** e **48**) sono più tollerati anche se meno potenti rispetto al riferimento [8 volte (Nva) e 30 volte (Abu), rispettivamente]. La sostituzione di Arg<sup>3</sup> con aminoacidi idrofili (composti **37, 38, 39, 41, 42, 45, e 57**) riduce significativamente l'attività dei derivati. La funzione chimica meglio tollerata è quella amidica della Gln, mentre l'acetilazione della Lys (composto **57**) non modifica sostanzialmente l'attività. Questo ultimo dato indica che in posizione 3 non è indispensabile un residuo a carattere basico. Come previsto aminoacidi con catena laterale acida (composti **44** e **45**) sono del tutto inattivi a livello nM. Il comportamento divergente dei composti **42** e **45** e il fatto che la presenza in posizione 3 di una catena laterale lineare a tre atomi di carbonio (Nva; composto **47**) sia sufficiente a garantire l'interazione con NPSR suggeriscono che la tasca recettoriale in grado di accogliere la catena laterale del residuo in posizione 3 potrebbe essere costituita da aminoacidi con caratteristiche acide e neutre.

Nessuno dei composti sintetizzati ha mostrato differenze di effetto massimo rispetto a hNPS suggerendo che tutti i composti agiscono da agonisti per il recettore. Poiché aminoacidi con catena laterale molto diversa, come Gln (ammidica), Orn (basica), Nva (alifatica) sono comunque tollerati in posizione 3 suggerisce che tale posizione potrebbe non essere coinvolta in modo diretto nell'attivazione di NPSR. Si può ipotizzare che il residuo in posizione 3 abbia un ruolo determinante nell'orientare le catene laterali dei residui di Phe<sup>2</sup> e/o Asn<sup>4</sup> (essenziali per l'attività biologica) e contribuire a determinare la conformazione bioattiva del message domain di NPS, in grado di occupare ed attivare NPSR.

<b>No</b>	<b>Composto</b>	<b>pEC<sub>50</sub> (CL<sub>95%</sub>)</b>	<b>E<sub>max</sub> ± SEM</b>
	hNPS	7.92 (7.83-8.01)	297 ± 10%
<b>32</b>	[Phe <sup>3</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 µM 46 ± 6%	
<b>33</b>	[Tyr <sup>3</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 µM 73 ± 4%	
<b>34</b>	[His <sup>3</sup> ]NPS	5.81 (5.20-6.42)	273 ± 18%
<b>35</b>	[Leu <sup>3</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 µM 36 ± 9%	
<b>36</b>	[Val <sup>3</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 µM 129 ± 30%	
<b>37</b>	[Thr <sup>3</sup> ]NPS	6.06 (5.97-6.15)	272 ± 20%
<b>38</b>	[Ser <sup>3</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 µM 175 ± 19%	
<b>39</b>	[Cys <sup>3</sup> ]NPS	6.43 (5.97-6.89)	256 ± 26%
<b>40</b>	[Gly <sup>3</sup> ]NPS	5.90 (5.71-6.09)	264 ± 7%
<b>41</b>	[Asn <sup>3</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 µM 161 ± 33%	
<b>42</b>	[Gln <sup>3</sup> ]NPS	6.89 (6.76-7.02)	295 ± 21%
<b>43</b>	[Lys <sup>3</sup> ]NPS	7.74 (7.70-7.78)	290 ± 17%
<b>44</b>	[Asp <sup>3</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 µM 73 ± 24%	

45	[Glu <sup>3</sup> ]NPS		crc incomplete: at 10 μM 89 ± 3%
46	[Orn <sup>3</sup> ]NPS	7.50 (7.24-7.76)	318 ± 12%
47	[Nva <sup>3</sup> ]NPS	6.87 (5.95-7.79)	207 ± 23%
48	[Abu <sup>3</sup> ]NPS	6.29 (5.43-7.15)	218 ± 17%
49	[Dab <sup>3</sup> ]NPS	6.69 (6.12-7.26)	207 ± 32%
50	[Dap <sup>3</sup> ]NPS	6.62 (6.32-6.87)	196 ± 17%
51	[Cit <sup>3</sup> ]NPS	6.78 (6.45-7.11)	285 ± 11%
52	[hArg <sup>3</sup> ]NPS	7.97 (7.70-8.24)	288 ± 16%
53	[Arg(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>3</sup> (Asym)]NPS	7.65 (7.52-7.78)	281 ± 15%
54	[Arg(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>3</sup> (Sym)]NPS	7.50 (7.40-7.60)	272 ± 10%
55	[Arg(NO <sub>2</sub> ) <sup>3</sup> ]NPS	7.66 (7.49-7.83)	288 ± 17%
56	[Arg(Tos) <sup>3</sup> ]NPS		crc incomplete: at 10 μM 104 ± 16%
57	[Lys(Tfa) <sup>3</sup> ]NPS	7.07 (6.60-7.54)	231 ± 18%
58	[2'-Pal <sup>3</sup> ]NPS		crc incomplete: at 10 μM 19 ± 4%
59	[3'-Pal <sup>3</sup> ]NPS		crc incomplete: at 10 μM 42 ± 11%
60	[4'-Pal <sup>3</sup> ]NPS		crc incomplete: at 10 μM 154 ± 17%

**Tabella 9.** Profilo farmacologico di hNPS e di analoghi di [Xaa<sup>3</sup>] testati in cellule HEK 293 esprimenti il recettore mNPSR.

### *Studio della posizione 5*

La sostituzione di Gly<sup>5</sup> con aminoacidi aromatici (composti **61** e **62**) riduce drasticamente l'attività agonista (circa 300 volte), associata nel caso della Phe ad una importante perdita di efficacia.

Gli aminoacidi alifatici (composti **63-66**) generano composti ad attività agonista, meno potenti di hNPS con valori di pEC<sub>50</sub> compresi tra 6.64 e 7.86. In particolare [Cys<sup>5</sup>]hNPS è 6 volte meno potente di hNPS, mentre, aumentando l'ingombro sterico dell'aminoacido come nel caso di [Leu<sup>5</sup>]hNPS si perde circa 100 volte di potenza rispetto a hNPS.

Come prospettato i risultati indicano che in posizione 5 per l'attività agonista possono essere tollerate sostituzioni con aminoacidi caratterizzati da una catena laterale con ingombro sterico ridotto.

La configurazione relativa L dell'aminoacido in posizione 5 non influenza (ad eccezione di Phe<sup>5</sup> hNPS) l'efficacia del peptide.

Al fine di investigare in modo dettagliato l'influenza della chiralità della posizione 5 per l'attività di NPS, gli stessi aminoacidi sono in configurazione relativa D. La sostituzione con D aminoacidi caratterizzati da catena laterale aromatica (composti **67** e **68**) ha prodotto antagonisti puri di NPSR poco potenti. La sostituzione, invece, con D aminoacidi caratterizzati da catena laterale idrofobica alifatica ha portato ad agonisti parziali ([D-Leu<sup>5</sup>]hNPS e [D-Cys<sup>5</sup>]hNPS) o antagonisti puri ([D-Val<sup>5</sup>]hNPS e [D-Met<sup>5</sup>]hNPS) per NPSR. In linea con quanto osservato precedentemente, anche per gli aminoacidi di configurazione relativa D, all'aumentare dell'ingombro sterico della catena laterale fa seguito una diminuzione di potenza del corrispondente peptide (composti **73** e **74**). Si può osservare ulteriormente che i due requisiti fondamentali per l'antagonismo in posizione 5 sono la chiralità e l'ingombro sterico del residuo.

Aminoacidi con configurazione relativa D determinano una importante riduzione o totale perdita di efficacia nei confronti del recettore NPSR, suggerendo che anche la posizione 5 può contribuire in modo determinante all'organizzazione conformazionale di hNPS, probabilmente influenzando sulla disposizione spaziale relativa del message e del secondary domain. Sostituzioni con aminoacidi di configurazione relativa L favoriscono conformazioni "agoniste", mentre aminoacidi con configurazione relativa D favoriscono conformazioni di hNPS "antagoniste".

Il composto più interessante identificato in questa prima parte del lavoro sulla posizione 5, [D-Val<sup>5</sup>]hNPS, è stato valutato per la sua capacità di antagonizzare gli effetti di hNPS nel saggio dell'attività locomotoria nel topo. L'iniezione i.c.v. di hNPS nel topo nel range di dose 0,01-1 nM è in grado di aumentare l'attività locomotoria, ridurre il tempo di immobilità e di incrementare il numero di episodi di raddrizzamento sulle zampe posteriori dell'animale (**Figura 13**).

Dati riportati in **Figura 14** dimostrano come [D-Val<sup>5</sup>]hNPS di per sé non modifichi i parametri comportamentali precedentemente riportati, mentre è in grado di revertire gli effetti indotti dalla somministrazione i.c.v. di NPS. Questo dato conferma l'attività antagonista in vivo di [D-Val<sup>5</sup>]hNPS.

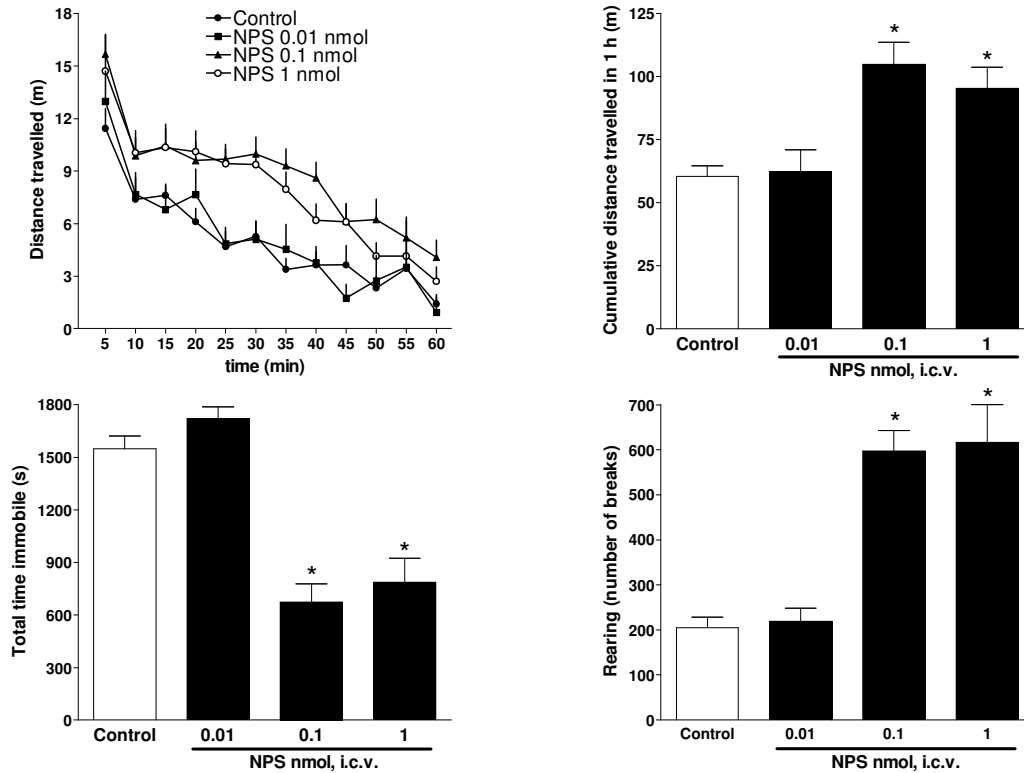
No	Composto	Agonista		Antagonista
		pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± sem	pK <sub>B</sub> (CL <sub>95%</sub> )
	NPS	8.65 (8.55-8.75)	295 ± 22%	ND
<b>61</b>	[Phe <sup>5</sup> ]NPS	6.11 (5.35-6.90)	69 ± 8%*	< 6
<b>62</b>	[Trp <sup>5</sup> ]NPS	crc incomplete at 10 μM: 30 ± 9%		< 6
<b>63</b>	[Val <sup>5</sup> ]NPS	7.18 (6.57-7.79)	231 ± 68%	ND
<b>64</b>	[Leu <sup>5</sup> ]NPS	6.64 (6.47-6.81)	214 ± 26%	ND
<b>65</b>	[Cys <sup>5</sup> ]NPS	7.86 (7.25-8.47)	280 ± 37%	ND
<b>66</b>	[Met <sup>5</sup> ]NPS	7.06 (6.69-7.43)	240 ± 19%	ND
<b>67</b>	[D-Phe <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		6.27 (5.88-6.66)
<b>68</b>	[D-Trp <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		6.79 (6.21-7.37)
<b>69</b>	[D-Val <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 μM		7.56 (7.12-8.00)
<b>70</b>	[D-Leu <sup>5</sup> ]NPS	7.05 (6.53-7.57)	118 ± 33%*	7.44 (6.96 – 7.94)
<b>71</b>	[D-Cys <sup>5</sup> ]NPS	7.15 (6.39-7.91)	59 ± 13%*	7.84 (7.52-8.16)



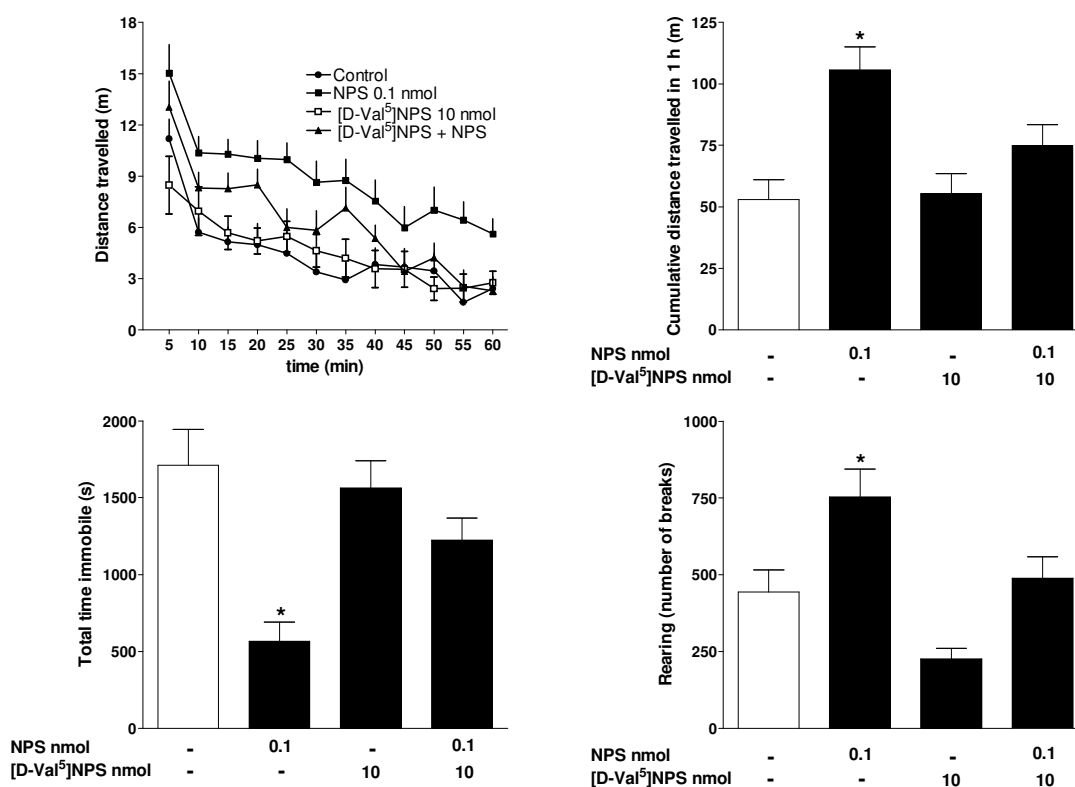
72	[D-Met <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 $\mu$ M		7.09 (6.31-7.87)
73	[D-Cys(Acm) <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 $\mu$ M		6.47 (5.27-7.67)
74	[D-Cys(Bzl) <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 $\mu$ M		7.22 (7.01-7.43)
75	[D-Ile <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 $\mu$ M		6.72 (6.10-7.34)
76	[D-Thr <sup>5</sup> ]NPS	7.10 (6.79-7.41)	25 $\pm$ 5%*	7.09 (6.792-7.39)
77	[D-Nva <sup>5</sup> ]NPS	6.57 (6.02-7.12)	24 $\pm$ 7%*	24 $\pm$ 7%*
78	[cyclohexyl-D-Gly <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 $\mu$ M		< 6
79	[D-Cha <sup>5</sup> ]NPS	inattivo fino a 10 $\mu$ M		< 6
80	[D-Phg <sup>5</sup> ]NPS	7.18 (6.81-7.55)	15 $\pm$ 2%*	15 $\pm$ 2%*
81	[tBu-D-Gly <sup>5</sup> ]NPS	<b>inattivo fino a 10 <math>\mu</math>M</b>		<b>8.06 (7.48 – 8.64)</b>
82	[D-Pen <sup>5</sup> ]NPS	<b>inattivo fino a 10 <math>\mu</math>M</b>		<b>8.28 (7.66-8.90)</b>
83	[tBu-D-Ala <sup>5</sup> ]NPS	6.78 (6.06-7.50)	104 $\pm$ 2%*	104 $\pm$ 2%*

**Tabella 10.** Effetti di hNPS e degli analoghi di hNPS modificati in posizione 5 testati in cellule HEK293 esprimenti il recettore NPSR di topo.

\*: significativamente diverso da  $E_{max}$  di hNPS in accordo ad ANOVA seguita dal test di Dunnet . I dati sono media  $\pm$  SEM di almeno 5 esperimenti separati.



**Figura 13.** Nei grafici è riportato come si modifica il comportamento dell'animale in seguito a somministrazioni rispettivamente di 0,01; 0,1 ; 1nM di hNPS. In particolare sono state valutate: distanza percorsa dal topo, tempo di immobilità totale, numero di raddrizzamenti sulle zampe posteriori.



**Figura 14.** I grafici riportano variazioni dell'attività locomotoria di topo in seguito somministrazione di hNPS in concentrazione di 0,1nM; in seguito a somministrazione di [D-Val<sup>5</sup>]hNPS in concentrazione di 10 nM; in seguito a somministrazione incrociata dei due composti per valutare in vivo l'antagonismo prodotto da [D-Val<sup>5</sup>]NPS; In particolare sono state valutate: distanza percorsa dal topo, tempo di immobilità totale, numero di raddrizzamenti sulle zampe posteriori.

La sostituzione del gruppo isopropilico della D-Val (ramificazione della catena laterale sul C $\beta$  del residuo aminoacidico) con un gruppo sec-butilico (composto **75**) o la sostituzione di un metile del gruppo isopropilico con un ossidrilico (composto **76**) determina una diminuzione di potenza antagonista e nel caso della funzione polare idrossilica un comportamento dualista.

La completa scomparsa della ramificazione del radicale isopropilico della D-Val che si ottiene con il corrispondente aminoacido lineare D-Nva (composto **77**) determina un'attività di parziale agonista.

Questi dati suggeriscono che il gruppo isopropilico in posizione  $\beta$  sia molto importante per ottenere un composto con attività antagonista; in genere quando si modifica questo sostituente si ottengono antagonisti poco potenti o dualisti.

I dati relativi agli analoghi **78**, **79** e **80** confermano che all'aumentare dell'ingombro sterico della catena laterale è associata una diminuzione della potenza del peptide. [cyclohexyl-D-Gly<sup>5</sup>]hNPS (composto **78**), che rappresenta una ulteriore funzionalizzazione del radicale isopropilico della D-Val, e [D-Cha<sup>5</sup>]hNPS (composto **79**), che rappresenta una ulteriore funzionalizzazione del radicale butilico secondario della D-Leu, sono risultati composti inattivi. [D-Phg<sup>5</sup>]hNPS (composto **80**) è un composto dualista; la presenza di una funzione aromatica planare riduce l'ingombro sterico del radicale al carbonio  $\beta$ . Il comportamento del composto **80** è del tutto simile a quello del composto **77** ed all'omologo con lo stesso farmacoforo aromatico più lontano dal backbone peptidico (composto **67**).

L'ulteriore sostituzione dell'idrogeno del radicale isopropilico [CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] con un radicale metilico (composto **81**) o con un gruppo mercaptanico (SH) (composto **82**), come aspettato, conferma il comportamento antagonista e ne migliora la potenza.

[D-Pen<sup>5</sup>]hNPS è l'antagonista peptidico più potente, oggi disponibile, per gli studi del sistema NPS-NPSR.

Infine, l'aumento della distanza del gruppo tert-butilico del derivato **81** dal backbone peptidico tramite un atomo di carbonio (composto **83**) determina, come prevedibile, una diminuzione di potenza ed efficacia del peptide.

In conclusione la presenza in posizione 5 di un residuo di configurazione relativa D con una catena laterale di natura alifatica ramificata e di dimensioni contenute determina un'attività antagonista dei ligandi peptidici.

### *Studio della posizione 4 (Asn)*

La sostituzione della funzionalità amidica con una catena di tipo acido (composto **84**) determina una drastica riduzione di attività, mentre aminoacidi aventi funzionalità chimica diversa (random replacement) come Phe (composto **85**), Thr (composto **86**), ha dato risultati positivi solo nel caso di Thr.

Anche l'incremento della distanza della funzionalità amidica dal backbone peptidico (composto **87**) è tollerata per l'interazione con il recettore sebbene il composto mostri una significativa riduzione di potenza.

Abbiamo apportato modifiche chimiche più mirate al gruppo amidico dell'Asn come la riduzione della funzionalità amidica a funzionalità aminica (composto **88**) che non è tollerata dal NPSR. Le caratteristiche basiche del nuovo gruppo funzionale e la mancanza del carbonile amidico per accettare interazioni mediante legame idrogeno con residui aminoacidici della proteina recettoriale confermano l'importanza della funzione amidica di Asn<sup>4</sup>.

Lo stesso risultato farmacologico è stato osservato per il composto **89** in cui la funzionalità amidica è stata sostituita dalla sola funzione chetonica e, come atteso, quando la funzione amidica è stata sostituita da una una funzione alifatica (composto **90**). Tutti i composti mostrano una drastica diminuzione di interazione con la proteina recettoriale. Le modifiche chimiche apportate alla funzione amidica nei composti **88-90** confermano l'importanza della funzione amidica primaria, nella sua possibile forma enolica, per l'interazione recettoriale.

Infine la monometilazione così come la dimetilazione del residuo di Asparagina in posizione 4 del Neuropeptide S (composti **91** e **92**) non sono tollerate per l'interazione con la proteina recettoriale ed entrambi i composti mostrano un'attività a concentrazione micromolare.

L'ammide primaria di Asn è quindi importante per l'interazione recettoriale. La possibilità di formare legami idrogeno con la proteina recettoriale così come la sua enolizzazione (-OHCH=NH-) sembrano elementi importanti della funzione amidica.

Complessivamente le modifiche apportate alla posizione 4 di hNPS confermano l'estrema importanza del gruppo funzionale amidico primario e della distanza dal backbone peptidico.

No	Composto	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± SEM
	hNPS	7.99 (7.65-8.33)	234 ± 12%
84	[Asp <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 μM	146 ± 6%
85	[Phe <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 μM	118 ± 19%
86	[Thr <sup>4</sup> ]NPS	6.99 (6.86-7.12)	243 ± 10%
87	[Gln <sup>4</sup> ]NPS	6.25 (5.65-6.85)	210 ± 19%
88	[Dab <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 μM	169 ± 18%
89	[Ova <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 μM	136 ± 17%
90	[Nva <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 μM	240 ± 39%
91	[Nmm <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 μM	188 ± 18%
92	[Ndm <sup>4</sup> ]NPS	crc incomplete: at 10 μM	89 ± 12%

**Tabella 11.** Profilo farmacologico di hNPS e di analoghi di [Xaa<sup>4</sup>]hNPS testati in cellule HEK 293 esprimenti il recettore mNPSR.

## CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi sono stati affrontati studi SAR del Neuropeptide S; è stato dimostrato il ruolo fondamentale della sequenza Phe<sup>2</sup>-Arg<sup>3</sup>-Asn<sup>4</sup> nell'interazione ed attivazione del recettore e del probabile contributo della sequenza Gly<sup>5</sup>-Val<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Thr<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup> nell'indurre la conformazione bioattiva del neurotrasmettitore.

Dallo studio SAR condotto sulla posizione 2 si è dimostrato:

- i) per l'attività agonista è importante la lipofilia della catena laterale dell'aminoacido presente in posizione 2 e non l'aromaticità: una catena lipofila di tipo ciclico sembra essere sufficiente per una buona attivazione di NPSR;
- ii) la dimensione e la distanza dal backbone peptidico del farmacoforo dell'aminoacido in posizione 2 rispetto sono elementi importanti per l'attività del composto. L'anello aromatico di Phe<sup>2</sup> può essere incrementato con la specie chimica naftalenica o, anche, ridotto ad isobutile, mentre la distanza può essere solo aumentata di un atomo di carbonio;
- iii) la posizione 2 di hNPS può essere implicata sia per l'interazione che per l'attivazione del recettore; come abbiamo riportato la sostituzione in posizione para con un fenile riduce l'efficacia di attivazione di NPSR.

Lo studio SAR riguardante la posizione 3 ha messo in evidenza che:

- i) il gruppo guanidinico non è indispensabile per l'attività biologica;
- ii) la basicità non è un requisito essenziale per l'attivazione di NPSR;
- iii) aminoacidi alifatici non ramificati e aminoacidi polari sono tollerati, mentre aminoacidi aromatici e acidi generano composti inattivi

La posizione 3 potrebbe essere di per se poco importante per l'interazione recettoriale ma determinare il corretto orientamento delle catene laterali di Phe<sup>2</sup> e Asn<sup>4</sup> e concorrere in tal modo a determinare la conformazione bioattiva di hNPS.

I risultati più interessanti si sono ottenuti dallo studio della posizione 5 dove è emerso che aumentando l'ingombro sterico della catena laterale di questa posizione 5 si ottiene una progressiva diminuzione di attività agonista del ligando.

La chiralità della posizione 5 svolge un ruolo cruciale nell'attivazione di NPSR da parte del neuropeptide: L-aminoacidi generano agonisti, mentre D-aminoacidi agonisti parziali o antagonisti del recettore NPSR. E' stato possibile identificare i primi antagonisti peptidici di elevata potenza di NPSR. L'attività antagonista di [D-Val<sup>5</sup>]hNPS è stata confermata anche in vivo nel topo nel saggio di attività locomotoria dove è in grado di revertire, ad una concentrazione 10 nM, gli effetti stimolatori indotti dalla somministrazione i.c.v si hNPS 0.1 nM.

Lo studio più approfondito riguardante la posizione 5 ha confermato i risultati ottenuti: la configurazione relativa D degli aminoacidi di questa posizione induce l'attività antagonista e la potenza dei composti è inversamente proporzionale alle dimensioni della catena laterale di D-Xaa<sup>5</sup>.

La stereochimica del centro chirale e le caratteristiche chimico-fisiche dei sostituenti del residuo in posizione 5 sono importanti per indurre l'occupazione del recettore: il gruppo tert-butilico e il gruppo mercapto isopropilico hanno permesso di incrementare la potenza antagonista.

[tBu-D-Gly<sup>5</sup>]hNPS e [D-Pen<sup>5</sup>]hNPS, identificati in questo studio, rappresentano i migliori antagonisti peptidici per NPSR.

La posizione 4 sembra, invece, essere molto sensibile alla sostituzione del farmacoforo amidico di Asn poiché tutti i composti sintetizzati sono risultati meno potenti rispetto al peptide nativo o inattivi. I dati ottenuti suggeriscono che Asn<sup>4</sup> svolga un ruolo fondamentale per l'attivazione del recettore.



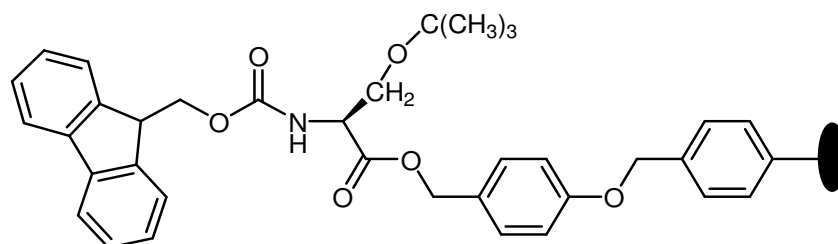
## PARTE SPERIMENTALE

### *Sintesi dei composti*

Il Neuropeptide S e gli analoghi sono stati sintetizzati in fase solida utilizzando la chimica Fmoc e un sintetizzatore automatico Syro XP.

Questa metodica sintetica prevede la sintesi del peptide a partire dal residuo C-terminale ancorato ad un supporto solido, attraverso successive reazioni di deprotezione dell' $\alpha$ -ammino gruppo seguite da reazioni di acilazione della componente carbossilica, opportunamente attivata.

Per gli analoghi peptidici è stata utilizzata una resina di Wang, (un supporto solido di stirene-divinilbenzene funzionalizzato con un linker di tipo p-benzilossibenzilalcolico), esterificata con la serina (**Figura 15**), amminoacido C-terminale nella sequenza di NPS, protetta al gruppo amminico con il gruppo Fmoc e al gruppo ossidrilico con tBu [10]. Questo tipo di linker permette la rimozione del peptide dalla resina mediante trattamento con acido trifluoroacetico (TFA) in modo da ottenere l'estremità C-terminale libera.



**Figura 15.** Resina di tipo Wang funzionalizzata con Fmoc-Serina(tBu).

Gli amminoacidi impiegati per la sintesi sono protetti sulla funzione  $\alpha$ -amminica con il gruppo Fmoc che è rimosso, all'inizio di ogni singolo ciclo sintetico, utilizzando una soluzione di piperidina al 40% in DMF.

La funzionalità  $\alpha$ -carbossilica di ogni singolo aminoacido è stata attivata con DIPCDI in presenza di HOBt. La stechiometria della reazione prevede un eccesso molare del componente acilante di quattro volte rispetto alla componente amminica legata alla resina e tempi di reazione di 1h.

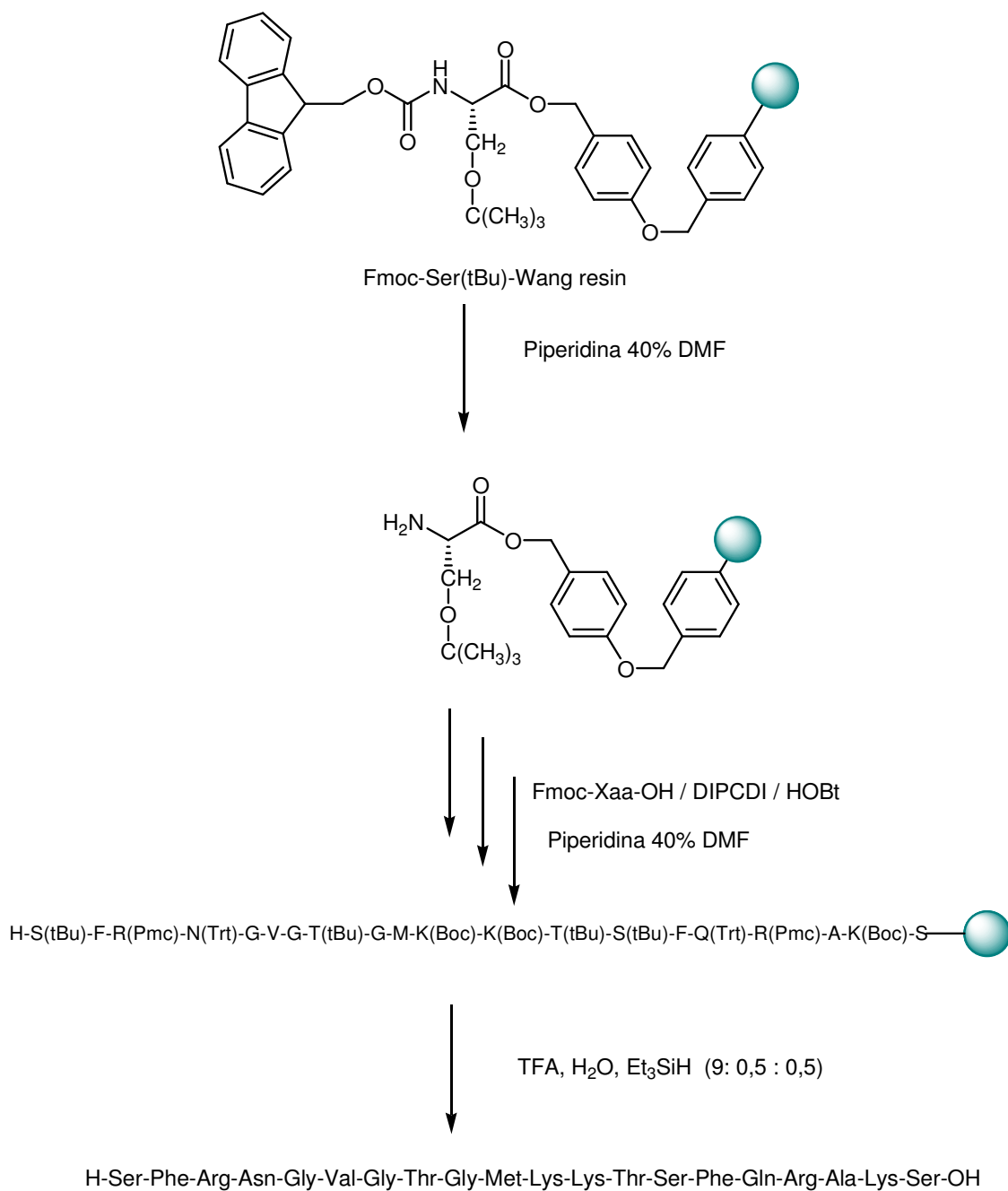
Le catene laterali degli aminoacidi sono state protette, quando necessario, con gruppi protettori acido labili come Boc per Lys, Trp e aminoacidi non naturali come Orn, Cit, Dab, Dap; Trt per Asn, Gln e Cys; Pmc per Arg; OtBu per Glu e Asp; tBu per Thr, Tyr e Ser.

Gli aminoacidi e gli intermedi non disponibili commercialmente sono stati sintetizzati secondo le procedure note in letteratura di seguito riportate.

Al termine del processo di sintesi, il peptide è stato rimosso dalla resina e contemporaneamente privato dei gruppi protettori in catena laterale, mediante trattamento per 1,5 h con una miscela di TFA, H<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>SiH (9:0.5:0.5); la resina esaurita è stata eliminata per filtrazione e la miscela di solventi evaporata.

Il peptide grezzo è stato cristallizzato in etere etilico e il solido ottenuto purificato mediante HPLC preparativo.

Nello **Schema 1** è riportata la sintesi di hNPS. Gli altri composti sono stati sintetizzati in modo analogo.



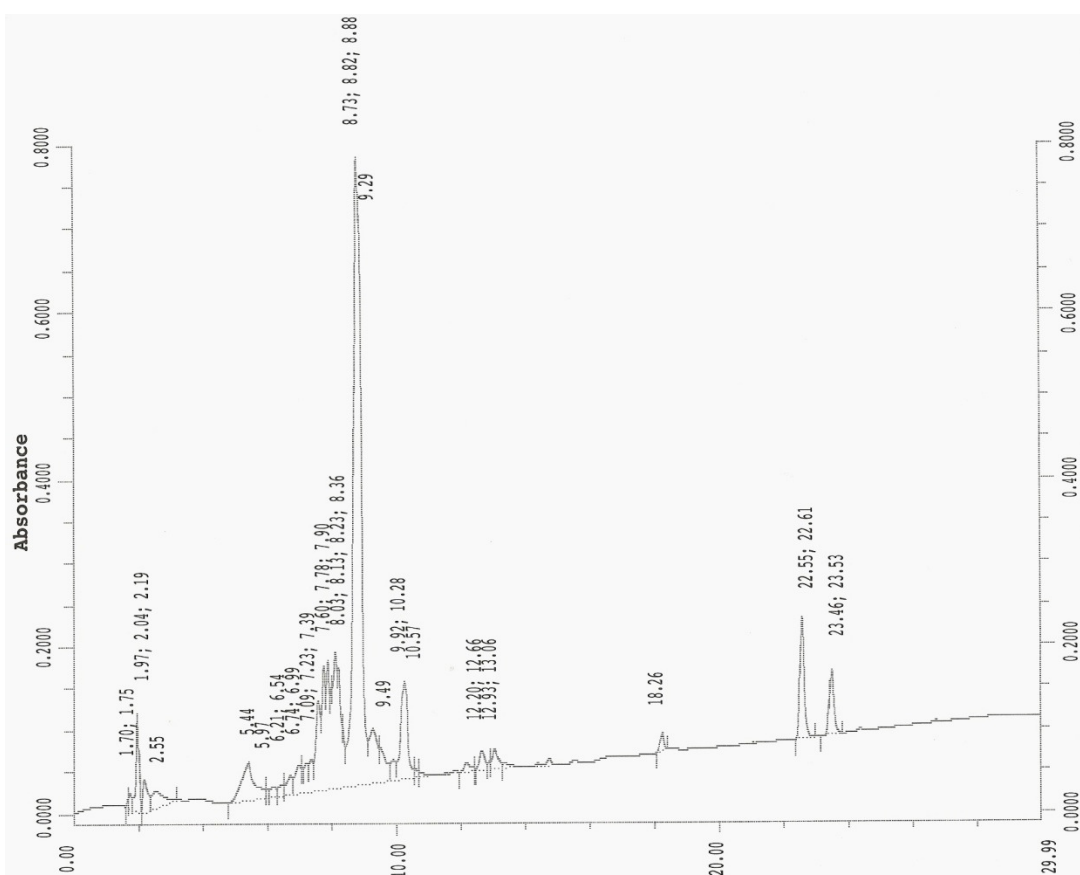
**Schema 1.** Schema di sintesi in fase solida di hNPS.

## Purificazione e controllo analitico

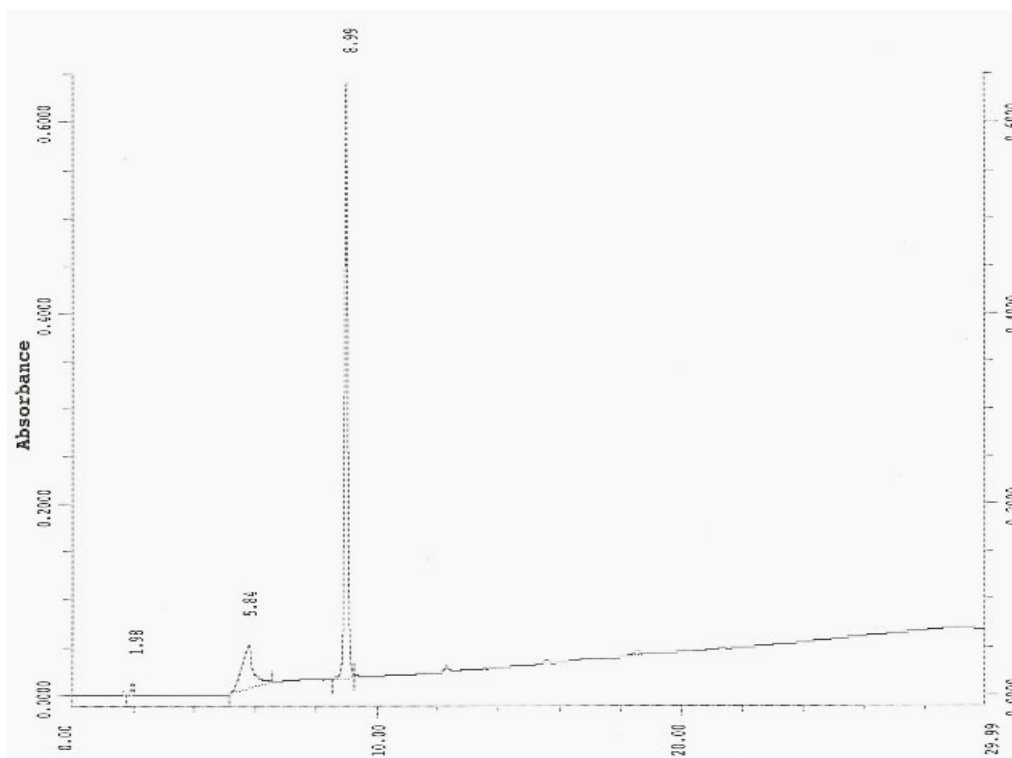
Per valutare la purezza dei grezzi di reazione e dei prodotti finali sono stati effettuati controlli mediante HPLC analitico Beckman System Gold 168 utilizzando una colonna Alltech C<sub>18</sub> (150 x 4.6 mm, 5 µm) e un rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile fissata a 220 nm.

Le analisi sono state condotte con un sistema eluente binario costituito da CH<sub>3</sub>CN e H<sub>2</sub>O entrambi contenenti lo 0.1% v/v di TFA, ad un flusso di 1 ml/min.

Nelle **Figure 16** e **17** sono riportati i profili analitici di hNPS grezzo e purificato.



**Figura 16.** Cromatogramma di hNPS grezzo dopo lo sblocco dalla resina.



**Figura 17.** Cromatogramma di hNPS purificato.

I tempi di ritenzione  $t_R$  sono stati ottenuti utilizzando due gradienti lineari diversi:

$t_R$  I: 0-100% di  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 25 minuti

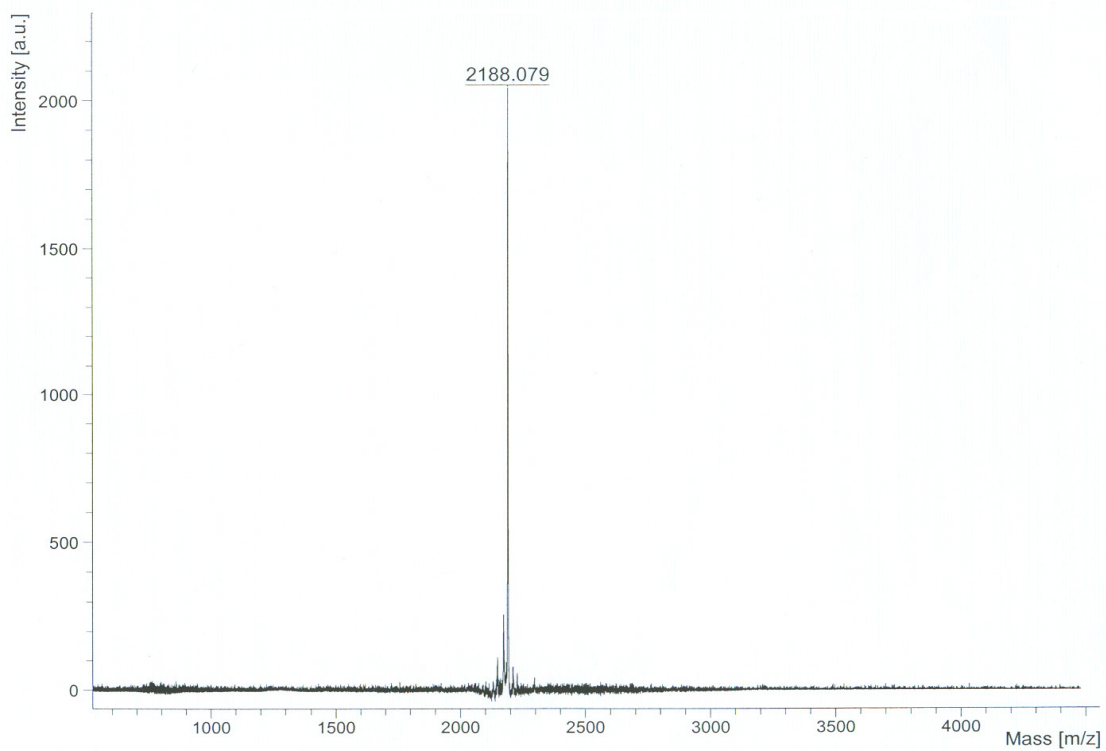
$t_R$  II: 0-50% di  $\text{CH}_3\text{CN}$  in 25 minuti

I peptidi grezzi sono stati purificati mediante HPLC preparativo Waters Delta Prep 4000 utilizzando una colonna Jupiter  $\text{C}_{18}$  15  $\mu\text{m}$ , 300 $\text{\AA}$ , 250 x 30 mm, eluita con la stessa fase mobile utilizzata per l'HPLC analitico e con gradienti programmati di volta in volta a seconda del profilo analitico del grezzo di reazione.

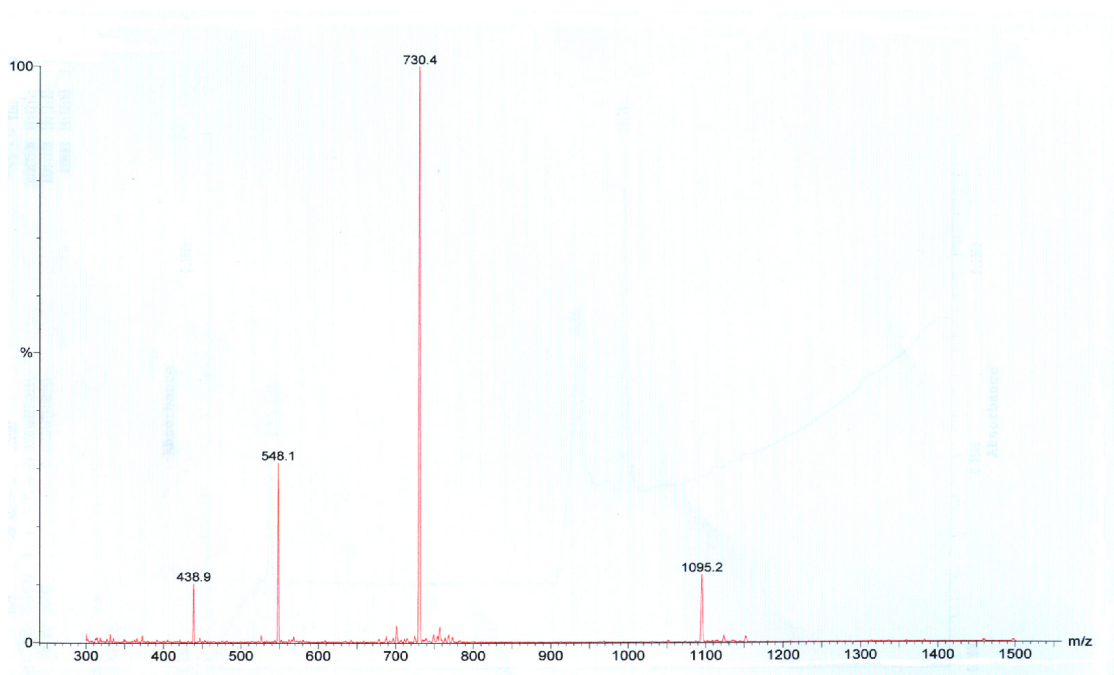
La determinazione del peso molecolare dei peptidi è stata ottenuta mediante spettrometria di massa electrospray utilizzando uno strumento Micromass ZMD2000 o uno strumento MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) Bruker Omniflex e impiegando come matrice l'acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossi-cinnamico.

Sono riportati, come esempio, gli spettri di hNPS nella **Figure 18 e 19**.

I valori ottenuti sono riportati nelle **Tabelle 12-15**.



**Figura 18.** Spettro di massa MALDI-TOF di hNPS purificato.



**Figura 19.** Spettro di massa ESI di hNPS purificato.

no	Sigla	$t_r$		$MH^+$	
		I	II	found	calculated
	hNPS	9.86	14.02	2188.5	2188.6
1	[His <sup>2</sup> ]hNPS	9.71	14.21	2177.5	2177.4
2	[Tyr <sup>2</sup> ]hNPS	9.79	14.33	2203.5	2203.8
3	[Trp <sup>2</sup> ]hNPS	10.19	14.92	2226.6	2226.2
4	[Leu <sup>2</sup> ]hNPS	10.20	14.91	2153.5	2153.2
5	[Lys <sup>2</sup> ]hNPS	9.43	13.79	2168.5	2169.4
6	[Asp <sup>2</sup> ]hNPS	9.41	13.76	2155.5	2155.4
7	[Glu <sup>2</sup> ]hNPS	9.42	13.77	2169.5	2169.6
8	[Asn <sup>2</sup> ]hNPS	9.91	14.49	2154.5	2154.2
9	[Gln <sup>2</sup> ]hNPS	10.10	14.77	2168.5	2168.0
10	[Thr <sup>2</sup> ]hNPS	9.37	13.71	2141.5	2141.4
11	[Cha <sup>2</sup> ]hNPS	10.10	14.77	2193.6	2193.6
12	[(pI)Phe <sup>2</sup> ]hNPS	12.30	17.98	2313.4	2314.4
13	[(pF)Phe <sup>2</sup> ]hNPS	10.38	15.17	2206.5	2206.0
14	[(pCl)Phe <sup>2</sup> ]hNPS	10.45	15.28	2223.4	2223.6
15	[(pBr)Phe <sup>2</sup> ]hNPS	9.96	14.56	2267.4	2267.6
16	[(pCH <sub>3</sub> )Phe <sup>2</sup> ]hNPS	9.95	14.56	2202.3	2202.8
17	[(pCF <sub>3</sub> )Phe <sup>2</sup> ]hNPS	9.74	14.24	2257.3	2256.8
18	[(pCN)Phe <sup>2</sup> ]hNPS	10.25	14.98	2214.5	2214.2
19	[(pNO <sub>2</sub> )Phe <sup>2</sup> ]hNPS	10.21	14.93	2234.5	2234.0
20	[(oCH <sub>3</sub> )Phe <sup>2</sup> ]hNPS	9.96	14.56	2202.5	2202.0
21	[1NaI <sup>2</sup> ]hNPS	10.47	15.31	2238.6	2238.6
22	[2NaI <sup>2</sup> ]hNPS	10.46	15.29	2238.6	2238.2
23	[Bip <sup>2</sup> ]hNPS	10.19	14.90	2264.4	2264.6

24	[Dip <sup>2</sup> ]hNPS	10.23	14.96	2264.4	2264.6
25	[Phg <sup>2</sup> ]hNPS	10.30	15.06	2174.2	2174.2
26	[hPhe <sup>2</sup> ]hNPS	10.35	15.13	2202.5	2202.2
27	[NPhē <sup>2</sup> ]hNPS	9.94	14.53	2187.5	2187.6
28	[βPhe <sup>2</sup> ]hNPS	10.01	14.63	2187.5	2188.0
29	[Tic <sup>2</sup> ]hNPS	9.98	14.59	2200.3	2200.4
30	[Atc <sup>2</sup> ]hNPS	9.99	14.62	2213.6	2213.6
31	[Aic <sup>2</sup> ]hNPS	10.03	14.66	2200.3	2200.4

**Tabella 12.** Tempi di ritenzione I e II e pesi molecolari degli analoghi di hNPS modificati in posizione 2.

n°	Sigla	t <sub>r</sub>		MH <sup>+</sup>	
		I	II	calcolato	misurato
	hNPS	11.88	19.42	2188.5	2188.6
32	[Phe <sup>3</sup> ]hNPS	11.32	19.95	2179.5	2178.9
33	[Tyr <sup>3</sup> ]hNPS	10.67	18.86	2195.5	2194.3
34	[His <sup>3</sup> ]hNPS	10.82	19.07	2169.5	2168.7
35	[Leu <sup>3</sup> ]hNPS	11.40	20.15	2145.5	2144.7
36	[Val <sup>3</sup> ]hNPS	11.44	19.11	2131.5	2131.0
37	[Thr <sup>3</sup> ]hNPS	10.76	19.06	2133.4	2133.2
38	[Ser <sup>3</sup> ]hNPS	11.14	18.87	2119.4	2118.9
39	[Cys <sup>3</sup> ]hNPS	11.83	19.27	2133,4	2135
40	[Gly <sup>3</sup> ]hNPS	11.12	19.55	2089.4	2087.9
41	[Asn <sup>3</sup> ]hNPS	10.42	18.38	2146.4	2145.1
42	[Gln <sup>3</sup> ]hNPS	10.98	19.42	2160.5	2159.5
43	[Lys <sup>3</sup> ]hNPS	10.86	19.04	2160.5	2158.9



44	[Asp <sup>3</sup> ]hNPS	10.84	18.99	2147.4	2146.8
45	[Glu <sup>3</sup> ]hNPS	11.04	19.52	2161.4	2160.6
46	[Orn <sup>3</sup> ]hNPS	10.06	17.94	2146.5	2147.1
47	[Nva <sup>3</sup> ]hNPS	11.77	19.38	2131.5	2131.4
48	[Abu <sup>3</sup> ]hNPS	11.33	19.12	2117.4	2116.4
49	[Dab <sup>3</sup> ]hNPS	10.87	19.06	2132.5	2132.0
50	[Dap <sup>3</sup> ]hNPS	10.08	18.00	2118.5	2117.6
51	[Cit <sup>3</sup> ]hNPS	10.15	18.03	2189.5	2190.1
52	[hArg <sup>3</sup> ]hNPS	10.20	18.11	2202.5	2201.8
53	[Arg(Me) <sub>2</sub> <sup>3</sup> (Asym)]hNPS	10.60	18.86	2215.5	2216.0
54	[Arg(Me) <sub>2</sub> <sup>3</sup> (Sym)]hNPS	11.00	19.28	2215.5	2216.2
55	[Arg(NO <sub>2</sub> ) <sup>3</sup> ]hNPS	10.11	18.07	2233.5	2188.9
56	[Arg(Tos) <sup>3</sup> ]hNPS	13.62	22.02	2342.7	2342.4
57	[Lys(Tfa) <sup>3</sup> ]hNPS	13.18	21.96	2256.5	2256.4
58	[2'-Pal <sup>3</sup> ]hNPS	11.30	19.46	2180.5	2180.2
59	[3'-Pal <sup>3</sup> ]hNPS	11.90	19.35	2180.5	2180.2
60	[4'-Pal <sup>3</sup> ]hNPS	10.89	19.39	2180.5	2180.2

**Tabella 13.** Tempi di ritenzione I e II e pesi molecolari degli analoghi di hNPS modificati in posizione 3.

n°	Sigla	t <sub>r</sub>		MH <sup>+</sup>	
		I	II	I	II
	hNPS	9.59	13.06	2188.5	2188.2
<b>61</b>	[Phe <sup>5</sup> ]hNPS	10.65	14.14	2278.6	2278.6
<b>62</b>	[Trp <sup>5</sup> ]hNPS	10.96	13.23	2317.7	2317.2
<b>63</b>	[Val <sup>5</sup> ]hNPS	10.34	14.51	2230.6	2231.0
<b>64</b>	[Leu <sup>5</sup> ]hNPS	9.61	13.63	2244.6	2244.8
<b>65</b>	[Cys <sup>5</sup> ]hNPS	10.07	13.92	2235.6	2235.2
<b>66</b>	[Met <sup>5</sup> ]hNPS	10.08	13.98	2262.7	2261.2
<b>67</b>	[D-Phe <sup>5</sup> ]hNPS	10.46	14.22	2278.6	2278.6
<b>68</b>	[D-Trp <sup>5</sup> ]hNPS	10.76	14.30	2317.7	2318.0
<b>69</b>	[D-Val <sup>5</sup> ]hNPS	9.92	13.92	2230.6	2230.8
<b>70</b>	[D-Leu <sup>5</sup> ]hNPS	9.54	13.69	2244.6	2244.6
<b>71</b>	[D-Cys <sup>5</sup> ]hNPS	9.98	13.82	2235.6	2235.4
<b>72</b>	[D-Met <sup>5</sup> ]hNPS	9.75	14.01	2262.7	2263.6
<b>73</b>	[D-Cys(Acm) <sup>5</sup> ]	10.68	14.08	2307.7	2307.8
<b>74</b>	[D-Cys(Bzl) <sup>5</sup> ]	10.92	14.52	2324.7	2324.2
<b>75</b>	[D-Ile <sup>5</sup> ]hNPS	8.44	13.84	2244.6	2245.6
<b>76</b>	[D-Thr <sup>5</sup> ]hNPS	8.03	13.15	2232.6	2233.4
<b>77</b>	[D-Nva <sup>5</sup> ]hNPS	8.44	13.27	2230.6	2231.6
<b>78</b>	[cyclohexyl-D-Gly <sup>5</sup> ]hNPS	8.87	14.61	2270.7	2271.2
<b>79</b>	[D-Cha <sup>5</sup> ]hNPS	9.62	15.85	2284.7	2285.2
<b>80</b>	[D-Phg <sup>5</sup> ]hNPS	8.36	13.91	2264.6	2265.2
<b>81</b>	[tBu-D-Gly <sup>5</sup> ]hNPS	8.66	13.16	2244.7	2245.2

<b>82</b>	[D-Pen <sup>5</sup> ]hNPS	8.41	13.41	2260.2	2262.6
<b>83</b>	[tBu-D-Ala <sup>5</sup> ]hNPS	8.44	13.62	2258.7	2259.6

**Tabella 14.** Tempi di ritenzione I e II e pesi molecolari degli analoghi di hNPS modificati in posizione 5.

<b>n°</b>	<b>Sigla</b>	<b>t<sub>r</sub></b>		<b>MH<sup>+</sup></b>	
		<b>I</b>	<b>II</b>	<b>calcolato</b>	<b>misurato</b>
	hNPS	11.88	19.42	2188.5	2188.6
<b>84</b>	[Asp <sup>4</sup> ]hNPS	9.63	11.79	2189.5	2189.2
<b>85</b>	[Phe <sup>4</sup> ]hNPS	11.07	13.88	2221.6	2222.0
<b>86</b>	[Thr <sup>4</sup> ]hNPS	10.87	13.32	2175.5	2175.6
<b>87</b>	[Gln <sup>4</sup> ]hNPS	11.18	13.79	2202.6	2203.2
<b>88</b>	[Dab <sup>4</sup> ]hNPS	9.51	11.64	2174.5	2175.0
<b>89</b>	[Ova <sup>4</sup> ]hNPS	10.91	13.28	2186.5	2186.2
<b>90</b>	[Nva <sup>4</sup> ]hNPS	8.64	10.78	2173.6	2173.8
<b>91</b>	[Nmm <sup>4</sup> ]hNPS	9.79	12.01	2202.5	2202.2
<b>92</b>	[Ndm <sup>4</sup> ]hNPS	9.65	11.82	2216.6	2216.8

**Tabella 15.** Tempi di ritenzione I e II e pesi molecolari degli analoghi di hNPS modificati in posizione 4.

### ***Procedure sintetiche***

I punti di fusione sono stati determinati con uno strumento Kofler (Reicher-Yung, Austria) e non sono stati corretti.

Per la cromatografia su strato sottile sono state utilizzate piastre di gel di silice F 254 (Merck, Darmstadt, Germany) e come reagenti di sviluppo ninidrina 1% in MeOH, ipoclorito di sodio 50% in acqua, KI in salda d'amido 5% in acqua, permanganato di potassio in soluzione acquosa al 2%.

I sistemi cromatografici utilizzati sono i seguenti.

B1: butanolo / acido acetico / acqua 3:3:1

B2: cloroformio / metanolo / toluene 17:1:2

Gli spettri [<sup>1</sup>H]NMR e [<sup>13</sup>C]NMR sono stati registrati mediante uno strumento Varian 200 MHz o uno strumento Varian 400 MHz e i campioni sono stati solubilizzati in CDCl<sub>3</sub> o DMSO. Gli spostamenti (**d**) vengono espressi in parti per milione (ppm) e sono riferiti al picco a 7.256 ppm del CDCl<sub>3</sub>; le costanti di accoppiamento (**J**) sono espresse in Hz. Per i segnali multipli valgono le seguenti abbreviazioni: s = singoletto; d = doppietto; t = tripletto; q = quartetto; m = multipletto.

Il controllo analitico degli intermedi e dei prodotti finali è stato fatto mediante HPLC analitico Beckmann Sistem Gold 168 e utilizzando una colonna Alltech C-18 (150 x 4.6 mm, 5 µm). I composti sono stati analizzati utilizzando un sistema eluente binario composto da H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>CN entrambi acidificati con lo 0.1% v/v di TFA (A ed B rispettivamente) ad un flusso di 1 ml/min.

I pesi molecolari degli intermedi e dei prodotti finali sono stati determinati mediante uno spettrometro di massa ESI MICROMASS ZMD 2000 e uno strumento MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) Bruker Omflex.

Gli spettri IR sono stati eseguiti con apparecchio Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500, per le intensità valgono le seguenti abbreviazioni: s = forte; m = media; w = debole.

I derivati aminoacidici Fmoc-Ova-OH, Fmoc-Nmm-OH e Fmoc-Ndm-OH sono stati sintetizzati seguendo gli **Schemi 2 e 3**.

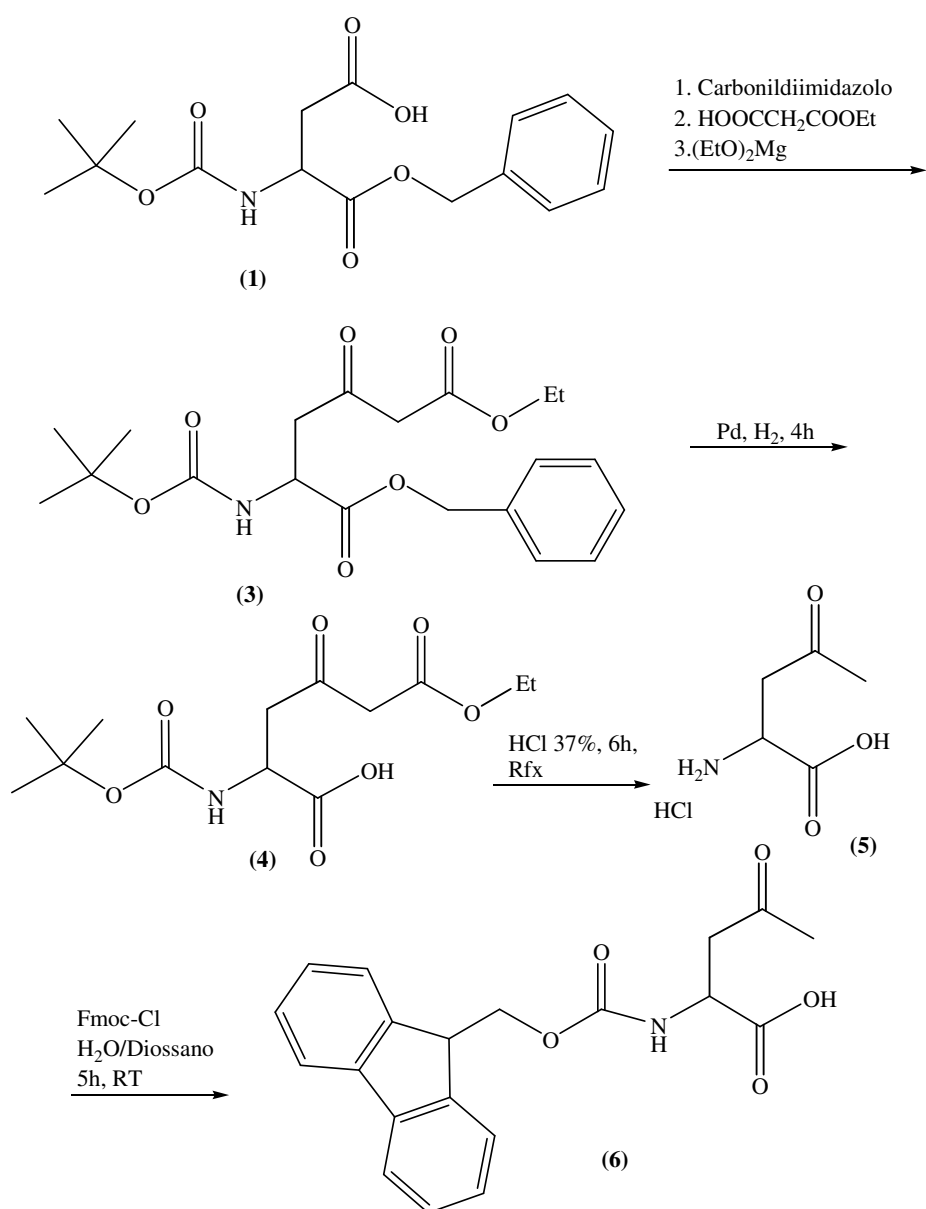
In particolare nello **Schema 2** è riportata la sintesi del composto Fmoc-Ova-OH.

Boc-Asp-OBzl è stato trattato con il carbonildimidazolo; all'imidazolide così ottenuto è stato aggiunto il sale di magnesio dell'estere etilico dell'acido malonico precedentemente preparato per reazione dell'etossido di magnesio con il monoestere etilico dell'acido malonico [11].

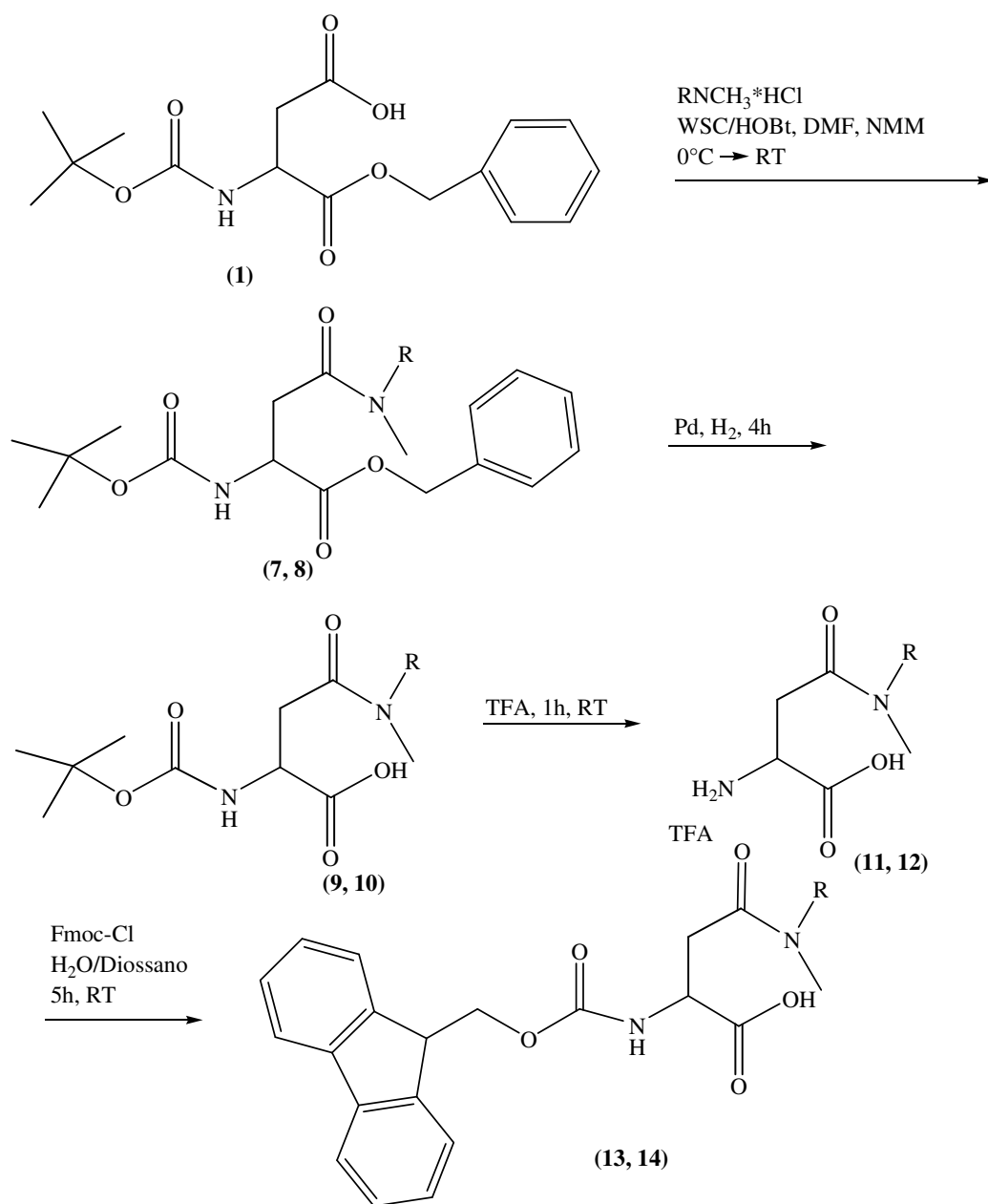
Il prodotto ottenuto è stato sottoposto a idrogenazione catalitica al fine di rimuovere il benzilestere. Il  $\beta$ -chetoestere sintetizzato è sottoposto ad idrolisi acida per HCl 6N ad ottenere l'idrolisi dell'estere presente in catena laterale seguita da decarbossilazione del  $\beta$ -chetoacido e contemporanea deprotezione del gruppo aminico che viene successivamente protetto come Fmoc.

Nello **Schema 3** è riportata la sintesi dei composti Fmoc-Nmm-OH e Fmoc-Ndm-OH.

Il Boc-Asp-OBzl è stato condensato con metilamina cloridrata o dimetilamina cloridrata utilizzando come agenti condensanti WSC e HOBt. Il prodotto ottenuto è stato sottoposto a idrogenazione catalitica al fine di rimuovere il benzilestere. Per trattamento con TFA si ha deprotezione del gruppo aminico che è stato successivamente protetto come Fmoc.



**Schema 2.** Schema di sintesi di Fmoc-Ova-OH.



**Schema 3.** Schema di sintesi di Fmoc-Nmm-OH e Fmoc-Ndm-OH.

### **Sintesi di monoestere etilico dell'acido malonico sale magnesiaco (1a)**

(5.30 g, 46.35 mmoli, 0.5 eq) di magnesio etossido sono aggiunti ad una soluzione di monoestere etilico dell'acido malonico (1.22 g, 92.70 mmoli) in THF anidro e la reazione è agitata per 1 h a temperatura ambiente. Si evapora a secchezza il solvente e si ottiene un solido bianco che viene utilizzato direttamente nello step successivo.

Caratteristiche del composto **(1a)**:

**Resa:** quantitativa (7.25 g)

### **Sintesi di *tert*-butil 1-[(benzilossi)carbonil]-4-(etoxicarbonil)-3-oxobutilcarbammato (3)**

Carbonildiimidazolo (1.65 g, 10.21 mmoli, 1.1 eq) è aggiunto ad una soluzione di Boc-Asp-OBzl (**1**) (3.0 g, 9.27 mmoli) in THF (70 ml) e la reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 6 h. Alla miscela di reazione è aggiunto il sale di magnesio precedentemente preparato (**1a**) (1.60 g, 10.21 mmoli, 1.1 eq). Si lascia agitare a temperatura ambiente per 18 h. Dopo aver evaporato il THF, si riprende con HCl 0.5 N e si estrae con etere. La fase organica è estratta NaHCO<sub>3</sub> saturo, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed evaporata a secchezza. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice utilizzando come fase eluente una miscela EtOAc/EtPt 1:1. Si ottiene un solido bianco.

Caratteristiche del composto **(3)**:

**Resa:** 85% (3.07 g)

[MH<sup>+</sup>]: 394.2

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 2982.32, 1731.40, 1499.63, 1368.89, 1329.97, 1152.04, 1032.60.

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 8.0 (s, 1H), 7.19 (s, 5H), 5.34 (s, 2H), 4.65 (t, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.18 (d, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.30 (t, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 200.9; 170.9; 166.7; 166.5; 135.3; 128.6 (2C); 128.4; 128.2 (2C); 80.2; 67.5; 62.0; 49.5; 49.2;; 41.7; 28.3 (3C); 14.1.



### **Sintesi di 2-[*tert*-butil-oxi-carbamoil]-5-(etoxicarbonil)-4-oxo-pentanoico acido (4)**

(3.07 g, 7.88 mmoli) di *tert*-butil 1-[(benziloxi)carbonil]-4-(etoxicarbonil)-3-oxobutilcarbammato (**3**) solubilizzati in EtOH (50 ml) e acido acetico glaciale (2 ml) sono idrogenati in presenza di C/Pd 5% per 4h a t.a. Il catalizzatore è eliminato per filtrazione e il solvente allontanato per evaporazione. Si ottiene un olio incolore.

Caratteristiche del composto (**4**):

**Resa:** 90% (2.15 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 304.1

**P.f.:** olio

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 11.0 (sb, 1H), 8.0 (s, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.12 (m, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.18 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.30 (t, 3H).

### **Sintesi di HClNH<sub>2</sub>-Ova-OH (5)**

(2.15 g, 7.09 mmoli) di 2-[*tert*-butil-oxi-carbamoil]-5-(etoxicarbonil)-4-oxo-pentanoico acido (**4**) sono solubilizzati in HCl 37% (30 ml) e lasciati reagire per 6h a riflusso. Si evapora il solvente a secchezza. Si ottiene un solido bianco.

Caratteristiche del composto (**5**):

**Resa:** 80% (0.74 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 132.0

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 11.5 (sb, 1H), 5.2 (s, 3H), 3.72 (m, 1H), 3.07 (m, 2H), 2.09 (s, 3H).

### **Sintesi di Fmoc-Ova-OH (6)**

(0.33 g, 1.96 mmoli) di HClNH<sub>2</sub>-Ova-OH (**5**) sono solubilizzati in una miscela H<sub>2</sub>O/diossano 1:1 (50 ml). Alla soluzione è aggiunto Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.62 g, 5.88 mmoli, 3 eq) La reazione è portata a 0°C e addizionata, goccia a goccia, di Fmoc-Cl (0.46 g, 1.76 mmoli, 0.9 eq) solubilizzato in diossano (3 ml). Si lascia agitare a temperatura ambiente per 6 h. Alla miscela di reazione sono aggiunti 20 ml di una soluzione di HCl satura di

NaCl e si estrae con acetato d'etile (50 ml). La fase organica è neutralizzata con brine, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed evaporata a secchezza. Il prodotto cristallizza da una miscela Et<sub>2</sub>O/EtPt 1:1 come solido bianco.

Caratteristiche del composto **(6)**:

**Resa:** 89% (0.44 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 354.5

**P.f.:** 85-90°C

**R.f. (B1):** 0.8

**t<sub>r</sub>:** 15.72 min

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** -4.80 (MeOH, c=1)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 13 (sb, 1H), 7.78-7.75 (d, 2H), 7.73-7.56 (m, 2H), 7.43-7.25 (m, 4H), 5.88 (d, 1H), 4.38 (m, 1H), 4.24 (d, 2H), 4.07 (t, 1H), 3.21-3.00 (m, 2H), 2.18 (s, 3H)

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 207.7, 174.9, 156.0, 143.6 (2C), 141.0 (2C), 128.8 (2C), 128.4 (2C), 128.2 (2C), 126.8 (2C), 67.4, 50.5, 47.0, 44.1, 30.6.

### Sintesi di Boc-Nmm-OBzl (7)

(2.0 g, 6.18 mmoli) di Boc-Asp-OBzl (**1**) sono solubilizzati in DMF anidra (20 ml). La soluzione è portata a 0°C e addizionata di HOBt (1.04 g, 6.80 mmoli, 1.1 eq), WSC (1.30 g, 6.80 mmoli, 1.1 eq), NMM (0.7 ml, 6.80 mmoli, 1.1 eq) ed infine metilamina cloridrato (0.46 g, 6.80 mmoli, 1.1 eq). Si lascia agitare a temperatura ambiente overnight. Dopo aver evaporato la DMF, si riprende con acetato d'etile e la fase organica è estratta con acido citrico (10%), NaHCO<sub>3</sub> (5%), neutralizzata con brine, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed evaporata a secchezza. Si ottiene un olio incolore.

Caratteristiche del composto **(7)**:

**Resa:** 91% (1.90 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 337.2

**P.f.:** olio

**R.f. (B1):** 0.8

**t<sub>r</sub>:** 11.33 min

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 8.0 (s, 1H), 7.19 (s, 5H), 5.88 (d, 1H), 5.34 (s, 2H), 4.65 (m, 1H), 2.66 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.40 (s, 9H).

### Sintesi di Boc-Nmm-OH (9)

(1.9 g, 5.65 mmoli) di Boc-Nmm-OBzl (7) solubilizzati in MeOH (50 ml) e acido acetico glaciale (2 ml) sono idrogenati in presenza di C/Pd 5% per 4h a t.a. Il catalizzatore è eliminato per filtrazione e il solvente allontanato per evaporazione. Si ottiene un olio incolore.

Caratteristiche del composto (9):

**Resa:** quantitativa (1.39 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 247.2

**P.f.:** olio

**R.f. (B1):** 0.5

**t<sub>r</sub>:** 5.89 min

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 8.0 (s, 1H), 5.88 (d, 1H), 4.69 (m, 1H), 2.55 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.40 (s, 9H).

### Sintesi di TFA·NH<sub>2</sub>-Nmm-OH (11)

(1.39 g, 5.65 mmoli) di Boc-Nmm-OH (9) sono solubilizzati in TFA (5 ml) e lasciati reagire per 1h a t.a. Si evapora il TFA coevaporando con toluene. Si ottiene un olio incolore.

Caratteristiche del composto (11):

**Resa:** quantitativa (1.47 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 147.0

**P.f.:** olio

**R.f. (B1):** 0.2

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 8.00 (s, 1H), 5.00 (d, 3H), 3.72 (m, 1H), 2.71 (s, 3H), 2.55 (m, 2H).

### Sintesi di Fmoc-Nmm-OH (13)

(1.47 g, 5.65 mmoli) di TFA·NH<sub>2</sub>-Nmm-OH (11) sono solubilizzati in una miscela H<sub>2</sub>O/diossano 1:1 (40 ml). Alla soluzione è aggiunto Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.80 g, 16.9 mmoli, 3 eq)

La reazione è portata a 0°C e addizionata, goccia a goccia, di Fmoc-Cl (1.87 g, 5.09 mmoli, 0.9 eq) solubilizzato in diossano (5 ml). Si lascia agitare a temperatura ambiente per 6 h. Alla miscela di reazione sono aggiunti 20 ml di una soluzione di HCl satura di NaCl e si estrae con acetato d'etile (50 ml). La fase organica è neutralizzata con brine, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed evaporata a secchezza. Il prodotto cristallizza da una miscela Et<sub>2</sub>O/EtPt 1:1 come solido bianco.

Caratteristiche del composto **(13)**:

**Resa:** 42% (0.78 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 369.2

**P.f.:** 146-154°C

**R.f. (B1):** 0.6

**t<sub>r</sub>:** 11.63min

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** +2.26 (MeOH, c=1)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 7.89-7.31 (m, 8H), 4.70 (d, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.35 (t, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.71 (s, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 173.07, 169.36, 155.69, 143.70 (2C), 140.60 (2C), 127.54 (2C), 126.99 (2C), 124.16 (2C), 120.02 (2C), 65.57, 52.80, 46.50, 36.87, 24.38.

### **Sintesi di Boc-Ndm-OBzl (8)**

(2.0 g, 6.18 mmoli) di Boc-Asp-OBzl (**1**) sono solubilizzati in DMF anidra (20 ml). La soluzione è portata a 0°C e addizionata di HOBt (1.04 g, 6.80 mmoli, 1.1 eq), WSC (1.30 g, 6.80 mmoli, 1.1 eq), NMM (0.7 ml, 6.80 mmoli, 1.1 eq) ed infine dimetilamina cloridrato (0.54 g, 6.80 mmoli, 1.1 eq). Si lascia agitare a temperatura ambiente overnight. Dopo aver evaporato la DMF, si riprende con acetato d'etile e la fase organica è estratta con acido citrico (10%), NaHCO<sub>3</sub> (5%), neutralizzata con brine, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed evaporata a secchezza. Si ottiene un olio incolore.

Caratteristiche del composto **(8)**:

**Resa:** 67% (1.46 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 351.2

**P.f.:** olio

**R.f. (B1):** 0.8

$t_r$ : 12.37 min

$^1\text{H-NMR}$ : (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 8.0 (s, 1H), 7.19 (s, 5H), 5.34 (s, 2H), 4.65 (m, 1H), 2.66 (m, 2H), 2.90 (s, 6H), 1.40 (s, 9H).

### **Sintesi di Boc-Ndm-OH (10)**

(1.46 g, 4.18 mmoli) di Boc-Ndm-OBzl (**8**) solubilizzati in MeOH (50 ml) e acido acetico glaciale (2 ml) sono idrogenati in presenza di C/Pd 5% per 4h a t.a. Il catalizzatore è eliminato per filtrazione e il solvente allontanato per evaporazione. Si ottiene un olio incolore.

Caratteristiche del composto (**10**):

**Resa**: quantitativa (1.08 g)

**[MH<sup>+</sup>]**: 261.2

**P.f.**: olio

**R.f. (B1)**: 0.6

$t_r$ : 7.28 min

$^1\text{H-NMR}$ : (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 8.0 (s, 1H), 4.69 (m, 1H), 2.55 (m, 2H), 2.90 (s, 6H), 1.40 (s, 9H).

### **Sintesi di TFA·NH<sub>2</sub>-Ndm-OH (12)**

(1.08 g, 4.18 mmoli) di Boc-Ndm-OH (**10**) sono solubilizzati in TFA (5 ml) e lasciati reagire per 1h a t.a. Si evapora il TFA coevaporando con toluene. Si ottiene un olio incolore.

Caratteristiche del composto (**11**):

**Resa**: quantitativa (1.15 g)

**[MH<sup>+</sup>]**: 161.1

**P.f.**: olio

**R.f. (B1)**: 0.2

$^1\text{H-NMR}$ : (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 5.00 (d, 3H), 3.72 (m, 1H), 2.90 (s, 6H), 2.55 (m, 2H).

### **Sintesi di Fmoc-Ndm-OH (14)**

(1.15 g, 4.18 mmoli) di TFA-NH<sub>2</sub>-Nmm-OH (**12**) sono solubilizzati in una miscela H<sub>2</sub>O/diossano 1:1 (40 ml). Alla soluzione è aggiunto Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.33 g, 12.5 mmoli, 3 eq). La reazione è portata a 0°C e addizionata, goccia a goccia, di Fmoc-Cl (1.87 g, 3.76 mmoli, 0.9 eq) solubilizzato in diossano (5 ml). Si lascia agitare a temperatura ambiente per 6 h. Alla miscela di reazione sono aggiunti 20 ml di una soluzione di HCl satura di NaCl e si estrae con acetato d'etile (50 ml). La fase organica è neutralizzata con brine, anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro ed evaporata a secchezza. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice utilizzando come fase eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 7:3. Si ottiene un solido bianco.

Caratteristiche del composto (**14**):

**Resa:** 57% (0.82 g)

**[MH<sup>+</sup>]:** 383.2

**R.f. (B1):** 0.7

**t<sub>r</sub>:** 12.32

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 7.91-7.32 (m, 8H), 4.70 (d, 2H), 4.50 (m, 1H), 4.35 (t, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.90 (s, 6H).

**<sup>13</sup>C-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 173.25, 169.14, 155.78, 143.81 (2C), 140.72 (2C), 127.65 (2C), 127.09 (2C), 125.25 (2C), 120.13 (2C), 50.46, 46.61, 36.58, 34.93, 34.44 (2C).

## BIBLIOGRAFIA

- [1]. Stadel J.M., Wilson S., Bergsma D.J., Orphan G-protein-coupled receptors: neglected opportunity for pioneer drug discovery. *TiPS*, **1997**, 18, 437.
- [2]. Civelli O., GPCR deorphanizations: the novel, the Known and the unexpected transmitters. *TRENDS*, Vol.26 No 1 January 2005.
- [3]. Xu Y-L., Reinscheid R.K., Huitron-Resendiz S., Clark S.D., Wang Z., Lin S.H., Brucher F.A., Zeng J., Ly N.K., Heinriksen S.J., Lecea L., Civelli O. Neuropeptide S: A Neuropeptide Promoting Arousal and Anxiolytic-like Effect. *Neuron*, **2004**, 43, 487-97 497.
- [4]. Reinscheid R.K., Xu Y-L. Neuropeptide S and Its Receptor: A New Deorphanized G Protein Coupled Receptor System. *The Neuroscientist*, **2005**, 11(6), 532-538.
- [5]. Bernier V., Stocco R., Bogusky M.J., Joyce J.G., Parachoniak, Grenier K., Arget M., Mathieu M-C., O'Neill G.P., Slipetz D., Crackower M.A., Tan C.M., Therien A.G. Structure-function relationships in the neuropeptide S receptor: molecular consequences of the asthma-associated mutation N107I. *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281(34), 24704-12.
- [6]. Roth A.L., Marzola E., Rizzi A., Arduin M., Trapella C., Corti C., Vergura R., Martinelli P., Salvadori S., Regoli D., Corsi M., Cavanni P., Calò G., Guerrini R., Structure activity studies on Neuropeptide S. *J. Biol. Chem.*, **2006**, 281(30), 20809-16.
- [7]. Tancredi T., Guerrini R., Marzola E., Ttrapella C., Calò G., Regoli D., Reinscheid R.K., Camarda V., Salvadori S., Temussi P.A., Conformation- Activity Relationship of Neuropeptide S and Some Structural Mutants: Helicity Affects Their Interaction with the Receptor. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 4501-4508.

- [8]. Hutchinson E. G., Thornton J. M., A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci.*, **1994**, 3, 2207-2216.
- [9]. Camarda V., Rizzi A., Ruzza C., Zucchini S., Marzola G., Marzola E., Guerrini R., Salvadori S., Reinscheid RK., Regoli D., Calò G., In vitro and in vivo pharmacological characterization of the neuropeptide S receptor antagonist [D-Cys(tBu)<sup>5</sup>]neuropeptide S. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2009**, 328(2), 549-55.
- [10]. Wang, S.S., p-alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzylcarbonylhydrazide Resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *JACS*, **1973**, 95, 1328-1333.
- [11]. Brooks D.W., Lu D.L-D., Masamune S., C-acylation under virtually neutral conditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1979**, 18, 72-74.



Modifiche chimiche per migliorare la  
farmacocinetica della Nocicettina

# INTRODUZIONE

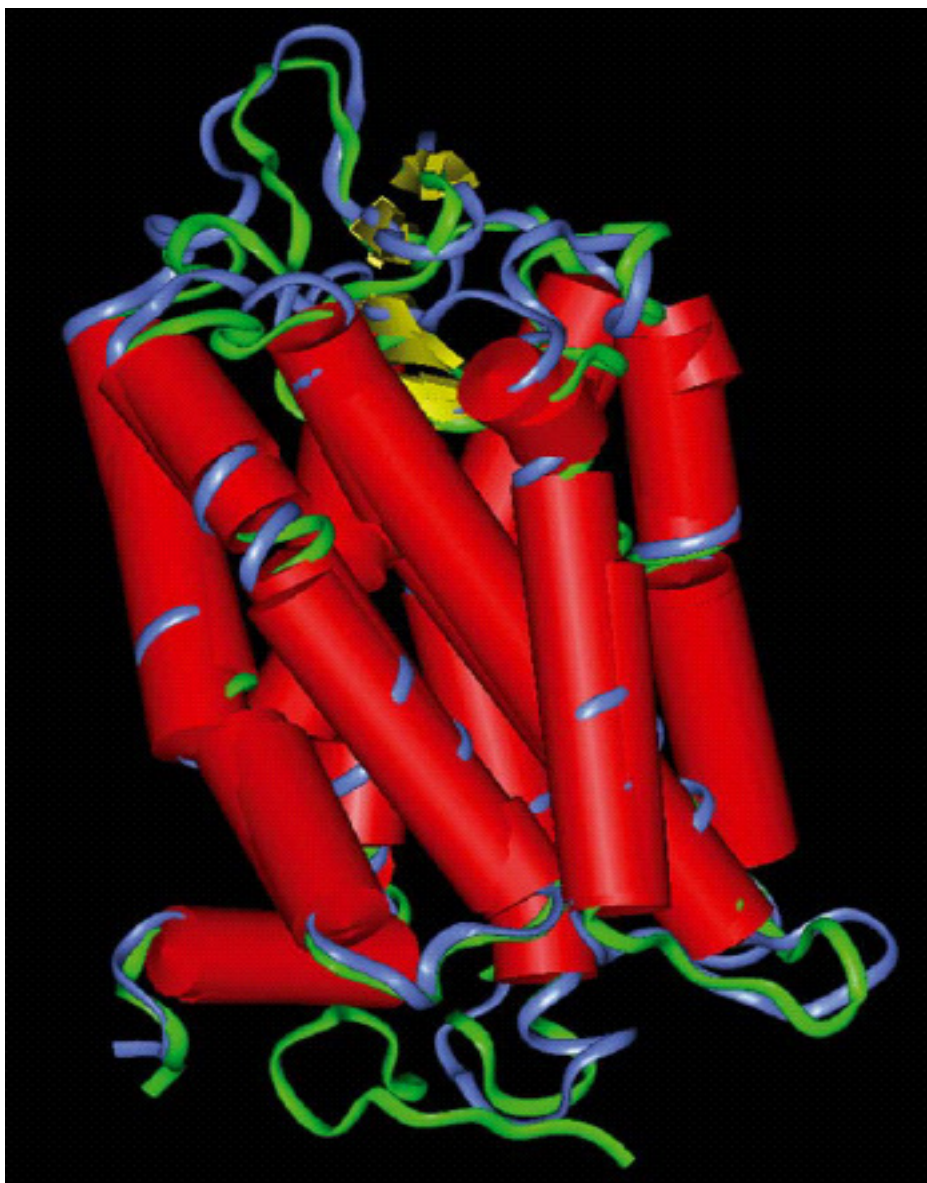
## *La nocicettina ed il suo recettore*

La N/OFQ è stata identificata, quale ligando endogeno del recettore ORL<sub>1</sub> (opioid receptor like 1), ora denominato NOP [1].

Il recettore NOP (nociceptin-orphanin FQ peptide) appartiene alla famiglia dei GPCRs (G protein coupled receptor) e mostra elevata omologia sequenziale nei confronti dei recettori oppioidi. La determinazione della struttura tridimensionale dei GPCRs risulta estremamente difficile senza il contributo essenziale della membrana cellulare o di un ambiente di studio che ne consideri le caratteristiche chimico-fisiche (micelle, solventi particolari, concentrazione ionica...).

Studiando prima la bacteriorodopsina, strutturalmente correlabile a queste proteine recettoriali [2], ed in seguito la rodopsina, si sono ottenute informazioni essenziali sulla topografia dei recettori accoppiati alle proteine G. Da questi studi è emerso che le sequenze aminoacidiche idrofobiche (circa 20-25 aa) vanno a costituire i sette domini di transmembrana con una struttura elicoidale, collegati da tre loop intracellulari e tre loop extracellulari. La sequenza N-terminale è extracellulare mentre quella C-terminale è intracellulare (**Figura 1**).

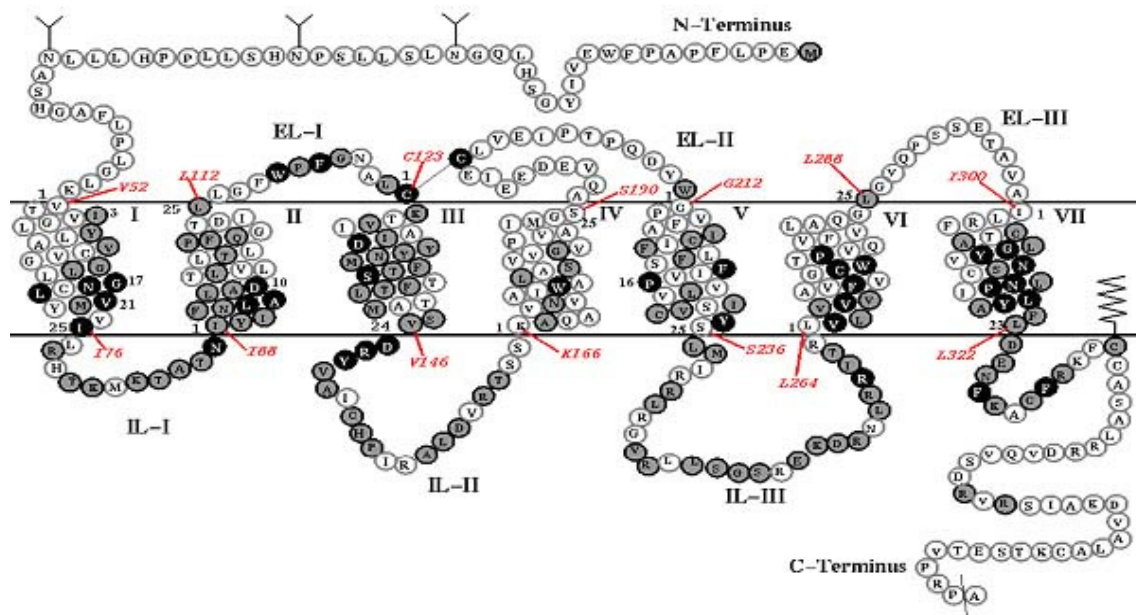
Come la maggior parte dei GPCRs il recettore NOP è glicosilato nella sequenza N-terminale per ancorarlo all'ambiente extracellulare, mentre all'estremità C-terminale un residuo di cisteina è acilato con acido palmitico che, con la sua catena lipofila, va inserirsi nella membrana cellulare.



**Figura 1.** Modello del recettore NOP (blu) sovrapposto alla rodopsina bovina (verde): lo scheletro proteico è rappresentato dai ribbons mentre le strutture secondarie dai cilindri rossi ( $\alpha$ -eliche) e dalle frecce gialle ( $\beta$ -foglietto) [3].

Il primo ed il secondo loop extracellulari sono legati da un ponte disolfuro che si instaura tra i residui di cisteina 123 e 200 (**Figura 2**).

In seguito all'interazione con ligandi specifici il recettore attiva il trimero delle proteine G localizzate sul lato citoplasmatico della membrana che a loro volta determinano l'attività di un effettore, di solito un enzima o un canale ionico.



**Figura 2.** Il recettore NOP.

Nel caso del recettore NOP la subunità  $\alpha$  può essere di tipo  $G_o$  (diminuzione della conduttanza al  $Ca^{2+}$ ) o  $G_i$  (inibizione dell'accumulo di AMPc e aumento della conduttanza al  $K^+$ ) [4].

Il recettore NOP è stato l'ultimo recettore oppioidi clonato nel 1994 e presenta circa l'80% di omologia sequenziale con gli altri recettori oppioidi [5]. La sua sequenza primaria è inoltre altamente conservata nelle varie specie (>90%).

I ligandi dei recettori oppioidi non legano il recettore NOP e gli antagonisti dei recettori oppioidi non modificano l'attivazione degli agonisti del recettore NOP [4].

Il recettore NOP è rimasto un recettore orfano per un certo tempo, e nel 1995 due gruppi di ricerca identificarono il suo ligando endogeno: Meunier isolò il ligando dal cervello di ratto e lo chiamò nocicettina per la sua capacità di diminuire la soglia di percezione dello stimolo doloroso quando iniettato intracerebroventricolarmente [1], mentre il gruppo di ricercatori della Roche isolò lo stesso ligando dal cervello di maiale chiamandolo 'orfantina FQ', come ligando di un recettore orfano e per la presenza di Phe e Gln alle estremità N- e C-terminale[6]. L'acronimo più utilizzato per il ligando è N/OFQ.

La N/OFQ è un eptadecapeptide il cui precursore, ppN/OFQ, strutturalmente simile in varie specie, consta di 181 aminoacidi nel ratto [7, 8], 187 aminoacidi nel topo e 176 aminoacidi nell'uomo. L'analisi della sequenza nucleotidica del gene che codifica la prepronocicettina ha inoltre rivelato caratteristiche simili a quelle dei precursori degli altri peptidi oppioidi, in particolare nei confronti della preproencefalina e della preprodinorfina, facendo presupporre che questi peptidi precursori possano avere un'origine comune [7, 9]. Il precursore della N/OFQ contiene altri peptidi biologicamente attivi: la Nocistatina che mostra un'azione antagonista nei confronti della nocicettina stessa [10] e l'Orfanina FQ2 che sembra possedere attività analgesica [11].

<p><b><u>Leu-encefalina</u></b></p> <p>H-Tyr<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-OH</p> <p><b><u>Dinorfina A</u></b></p> <p>H-Tyr<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Leu<sup>5</sup>-Arg<sup>6</sup>-Arg<sup>7</sup>-Ile<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>-Pro<sup>10</sup>-Lys<sup>11</sup>-Leu<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-Trp<sup>14</sup>-Asp<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Gln<sup>17</sup>-OH</p> <p><b><u>Nocicettina</u></b></p> <p>H-Phe<sup>1</sup>-Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Phe<sup>4</sup>-Thr<sup>5</sup>-Gly<sup>6</sup>-Ala<sup>7</sup>-Arg<sup>8</sup>-Lys<sup>9</sup>-Ser<sup>10</sup>-Ala<sup>11</sup>-Arg<sup>12</sup>-Lys<sup>13</sup>-Leu<sup>14</sup>-Ala<sup>15</sup>-Asn<sup>16</sup>-Gln<sup>17</sup>-OH</p>
---

**Tavola 1.** Strutture di [Leu<sup>5</sup>]-encefalina, Dinorfina A, N/OFQ a confronto.

La dinorfina A, ligando endogeno del recettore KOP, è il peptide oppioide che più assomiglia a N/OFQ, come è possibile osservare dal confronto delle sequenze primarie dei peptidi (**Tavola 1**), ma la dinorfina A non si lega al recettore NOP. Nella sequenza della nocicettina, così come è stato proposto per i peptidi oppioidi, è stato identificato il message e l'address domain [12]. L'address domain è rappresentato dall'estremità C-terminale del peptide dove indispensabili sembrano essere gli aminoacidi cationici in grado di interagire con i residui acidi presenti nel secondo loop extracellulare del recettore. L'address domain è importante, quindi, per

l'occupazione del recettore da parte del ligando. Il message domain è costituito, invece, dai primi quattro aminoacidi situati all'estremità N-terminale e determina l'attivazione del recettore. Queste osservazioni possono spiegare perchè la dinorfina A non interagisce con il recettore NOP: nell'address domain ci sono residui cationici ma in sequenza diversa rispetto alla N/OFQ; inoltre all'N-terminale la dinorfina A, come tutti i peptidi oppioidi, presenta una tirosina anzichè la fenilalanina. Il derivato [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ, infatti, è in grado di legare e attivare con elevata affinità e potenza sia il recettore NOP sia i recettori MOP e KOP e questo risultato identifica nella Phe<sup>1</sup> un elemento in grado di conferire selettività nei confronti del recettore NOP [13]. A conferma di questo, è interessante osservare che i due composti [Tyr<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub> e [Dmt<sup>1</sup>]N/OFQ(1-13)NH<sub>2</sub>, che mantengono una buona attività NOP agonista, sono parzialmente antagonizzati dal naloxone [14]. L'importanza dell'estremità N-terminale è anche dimostrata dal fatto che il composto [des-Phe<sup>1</sup>]N/OFQ è inattivo. In aggiunta l'acetilazione o la mono o dialchilazione dell'azoto libero della fenilalanina porta a composti privi di attività biologica; questo risultato conferma l'interazione dell'amina primaria con il residuo di acido aspartico presente nel terzo dominio transmembrana. Questa interazione è riportata per tutti i ligandi oppioidi e per le amine biogene in generale e questo residuo aminoacidico è conservato nelle sequenze di tutti i recettori di questi sistemi biologici. Sono state studiate anche altre modifiche nel message domain del peptide riguardanti sia lo spacer Gly<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup> sia la Phe<sup>4</sup>. L'eliminazione di una o entrambe le glicine non è tollerata e lo stesso risultato si ottiene mediante la sostituzione dello spacer con D-Ala o Pro. In posizione quattro l'attività biologica è compatibile solo sostituendo la fenilalanina con un altro aminoacido aromatico [14, 15]. All'estremità C-terminale, invece, sono permesse delezioni, fino ad arrivare all'identificazione del frammento minimo attivo, la N/OFQ(1-13). Quest'ultimo dato supporta l'importanza dei residui cationici (Arg<sup>8,12</sup>, Lys<sup>9,13</sup>) per l'interazione recettoriale.

### *Attività biologiche mediate dal sistema N/OFQ-Recettore NOP*

La localizzazione del recettore NOP è stata determinata utilizzando tecniche autoradiografiche in situ di immunoistochimica utilizzando anticorpi specifici per sequenze peptidiche caratteristiche di questo recettore oppioide. Nel sistema nervoso centrale il recettore NOP è localizzato in prevalenza nella corteccia, nell'ippocampo e nell'ipotalamo; a livello periferico la proteina è stata identificata nell'intestino, nei muscoli scheletrici, nella milza ed anche su cellule del sistema immunitario. Il sistema N/OFQ-recettore NOP, data la varietà di siti in cui è stato identificato, è coinvolto in numerosi processi biologici sia a livello centrale sia a livello periferico. Sin dai primi studi condotti è emerso che, a differenza dei peptidi oppioidi, la N/OFQ somministrata i.c.v. ha un effetto pronocicettivo che va incontro allo sviluppo di tolleranza; questa differente azione può essere relazionata ad una differente distribuzione dei recettori. Questi dati, però, sono stati anche interpretati ipotizzando che la riduzione dei tempi di latenza a stimoli nocicettivi, osservabile in seguito alla somministrazione di N/OFQ, sia un effetto antioppioide attribuibile allo stress che si verifica durante le procedure sperimentali [16]. Il blocco del segnale N/OFQ-NOP probabilmente previene lo sviluppo di tolleranza tipico degli analgesici oppioidi e questa ipotesi è supportata da vari dati: in topi knockout per il recettore NOP si osserva una diminuzione della tolleranza alla morfina; tale tolleranza può essere parzialmente diminuita somministrando i.c.v. anticorpi specifici per N/OFQ e nei ratti tolleranti alla morfina si evidenzia una produzione ed un rilascio accelerati di N/OFQ. Antagonisti del recettore NOP potrebbero essere utili come farmaci analgesici con attività a livello soprasspinale permettendo una riduzione, ad esempio, nel dosaggio della morfina, con conseguente diminuzione di tolleranza e dipendenza. La maggior parte degli studi dimostra che la somministrazione intratecale, a livello spinale, di N/OFQ provoca un effetto analgesico pari a quello degli agonisti oppioidi [17]; anche in questo caso dopo ripetute somministrazioni si sviluppa tolleranza ma non si verifica tolleranza crociata alla morfina e questo indica che l'azione biologica dei due ligandi è mediata da sistemi recettoriali distinti. Sempre a livello spinale N/OFQ inibisce il rilascio dei trasmettitori eccitatori (sostanza P) dalle afferenze primarie che trasmettono ai neuroni del midollo spinale un messaggio algogeno. La somministrazione i.c.v. di N/OFQ è in grado di modulare l'attività locomotoria (stimolazione a basse dosi, inibizione a dosi più alte) e di stimolare l'assunzione di

cibo. Diversamente dalle altre azioni N/OFQ mediate, quest'ultima viene inibita dal naloxone. Composti ad attività antagonista verso il recettore NOP potrebbero divenire nuovi farmaci anoressizzanti.

Grazie a test condotti sia in vitro che in vivo si è appreso che a livello centrale N/OFQ modula il rilascio di numerosi neurotrasmettitori, generalmente in senso negativo e questo effetto non è influenzato dalla presenza di naloxone. L'inibizione del rilascio di glutammato e il blocco della trasmissione eccitatoria glutammato-dipendente in varie aree cerebrali da parte di N/OFQ promuovono la ricerca di nuovi agonisti NOP come agenti antiepilettici dato che il glutammato svolge un ruolo fondamentale nell'epilessia e che è stato osservato un notevole aumento dell'espressione genica del peptide nel talamo durante le crisi epilettiche indotte da kainato [18]. E' stato dimostrato che N/OFQ ha un effetto ansiolitico, in quanto in animali sottoposti a condizioni di stress la somministrazione del peptide, anche a basse dosi (0,1-3 nM), riporta l'animale a comportamenti normali [19]; questo fa presupporre che la nocicettina possa essere coinvolta nelle risposte di adattamento a stimoli ansiogeni. Infatti topi NOP  $\gamma$  sono più suscettibili a stress acuti o ripetuti rispetto a topi wild-type. Il meccanismo tramite il quale il neurotrasmettitore esplica questo effetto non è chiaro ma ci potrebbe essere un controllo sul sistema serotoninergico per inibizione del rilascio di 5-HT. Agonisti del recettore NOP potrebbero essere utili come farmaci ansiolitici privi di effetti collaterali quali lo sviluppo della tendenza all'abuso. N/OFQ inibisce il rilascio di dopamina con la regolazione, quindi, della via dopaminergica sia mesolimbica sia nigrostriatale. Nel primo caso si evidenzia l'utilità di composti ad azione NOP agonista per controllare l'autosomministrazione di droghe, infatti la somministrazione i.c.v. di N/OFQ per sette giorni in ratti alcool preferring diminuisce l'assunzione di alcool ed una volta concluso il trattamento il consumo di alcool torna a livelli normali. E' noto che un elevato rilascio di dopamina a livello striatale facilita il movimento e quindi antagonisti NOP, che limitano il ruolo inibitorio endogeno esercitato da N/OFQ, possono essere in grado di ridurre i segni e i sintomi del morbo di Parkinson [20].

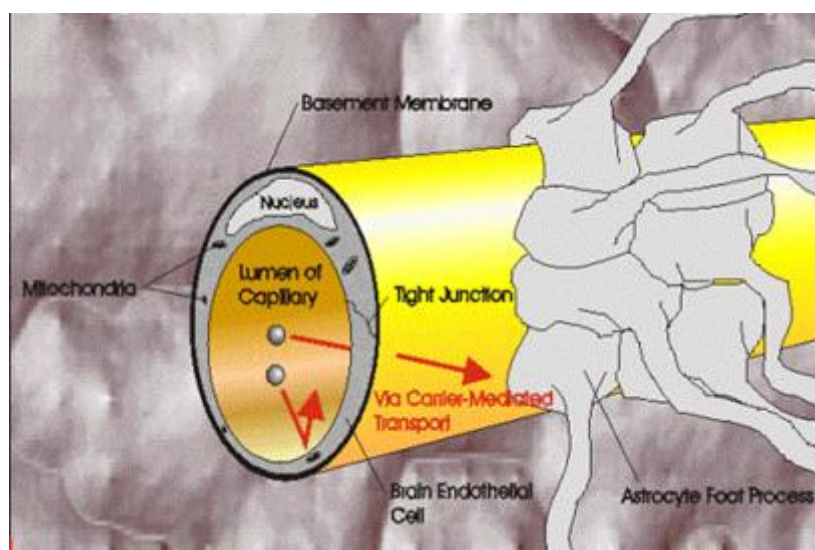
A livello periferico N/OFQ agisce sul sistema cardiovascolare, dopo somministrazione intravena induce ipotensione e bradicardia; a livello gastrointestinale induce riduzione della motilità, come gli oppioidi in generale, e quindi NOP agonisti potrebbero risultare utili nello sviluppo di farmaci in grado di ridurre la motilità gastrointestinale e rallentare il transito a livello del colon. Nel



rene si evidenzia un aumento marcato della diuresi e nell'apparato genitourinario un'inibizione del riflesso della minzione. Quest'ultima azione è di particolare interesse in quanto l'infusione intraventricolare di N/OFQ in pazienti affetti da incontinenza dovuta a vescica neurogena è in grado di inibire significativamente il riflesso della minzione consentendo un normale riempimento della vescica [21].

### ***La barriera ematoencefalica***

E' noto che numerose sostanze, sia fisiologiche che d'interesse farmacologico, mentre possono diffondere facilmente attraverso le pareti dei capillari sanguigni dei comuni tessuti, non possono attraversare quella dei capillari cerebrali e del midollo spinale . E' noto che una membrana particolare denominata “*barriera ematoencefalica*” limita selettivamente il passaggio delle sostanze dal plasma sanguigno verso il liquido interstiziale del tessuto cerebrale ed il liquor.



**Figura 3.** Rappresentazione schematica della barriera ematoencefalica.

La microscopia elettronica ha permesso di correlare la diversa permeabilità dei capillari cerebrali con la particolarità della loro struttura: le cellule endoteliali, che formano la parete dei capillari cerebrali, sono infatti strettamente congiunte tra loro e totalmente prive di fenestrature; inoltre lo strato endoteliale è circondato da uno spesso manicotto

formato dai piedi terminali degli astrociti gliari. Tutte queste particolarità strutturali sono indubbiamente indicative della presenza, nella parete dei capillari cerebrali, di un ostacolo della libera diffusione delle sostanze dal plasma sanguigno al tessuto nervoso.

Esistono tuttavia alcune parti dell'encefalo, complessivamente chiamati organi circumventricolari (CVOs), dove i capillari sanguigni hanno un endotelio fenestrato come quello degli altri tessuti. Ciò non deve sorprendere, perché i neuroni che vi si trovano svolgono importanti funzioni nella regolazione della composizione dei liquidi organici o del metabolismo dell'organismo; a tale fine questi neuroni devono essere sensibili alle variazioni chimiche e fisiche del plasma sanguigno, alle quali rispondono direttamente come "sensori". Alcune delle importanti formazioni encefaliche che si trovano al di fuori della barriera ematoencefalica sono il plesso corioideo, la neuroipofisi, la ghiandola pineale e l'area postrema dove si trovano i neuroni chemiocettivi del centro del vomito [22].

Il superamento della barriera ematoencefalica da parte di molti ioni in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  è differenziato, e comunque decine di volte più limitato rispetto a quanto avviene in altri capillari; gli ioni  $\text{H}^+$ , in particolare, praticamente non superano la barriera (il pH dei liquidi extracellulari dell'encefalo è infatti lievemente più acido di quello del plasma sanguigno). Non trovano invece alcun ostacolo alla barriera, oltre all' $\text{H}_2\text{O}$ , i due gas respiratori  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ . Tra le sostanze di interesse metabolico che possono attraversare la barriera ematoencefalica figura innanzitutto il glucosio, elemento nutrizionale essenziale per i neuroni, le cui molecole superano le membrane della barriera per diffusione facilitata; si pensa che lo stesso avvenga anche per gli aminoacidi ed i composti intermedi del metabolismo glucidico, come acido lattico e acido piruvico. Non attraversano la barriera, o lo fanno solamente in misura trascurabile, i peptidi, ed ovviamente le molecole proteiche, i costituenti lipidici del plasma (in particolare il colesterolo), le catecolamine.

La diffusione di sostanze, anche di interesse farmacologico, attraverso la barriera ematoencefalica, dipende quindi dalla capacità delle molecole di attraversare le membrane biologiche.

La Lipinski "rule of five", introdotta nel 1997 e largamente utilizzata per stimare la solubilità e la permeabilità delle molecole [23] prende in considerazione diversi fattori:

- i) un parametro determinante per la diffusione di molecole attraverso la barriera ematoencefalica è il loro peso molecolare: sostanze con peso

formula superiore a 400-500 Da non superano la barriera ematoencefalica in quantità significative;

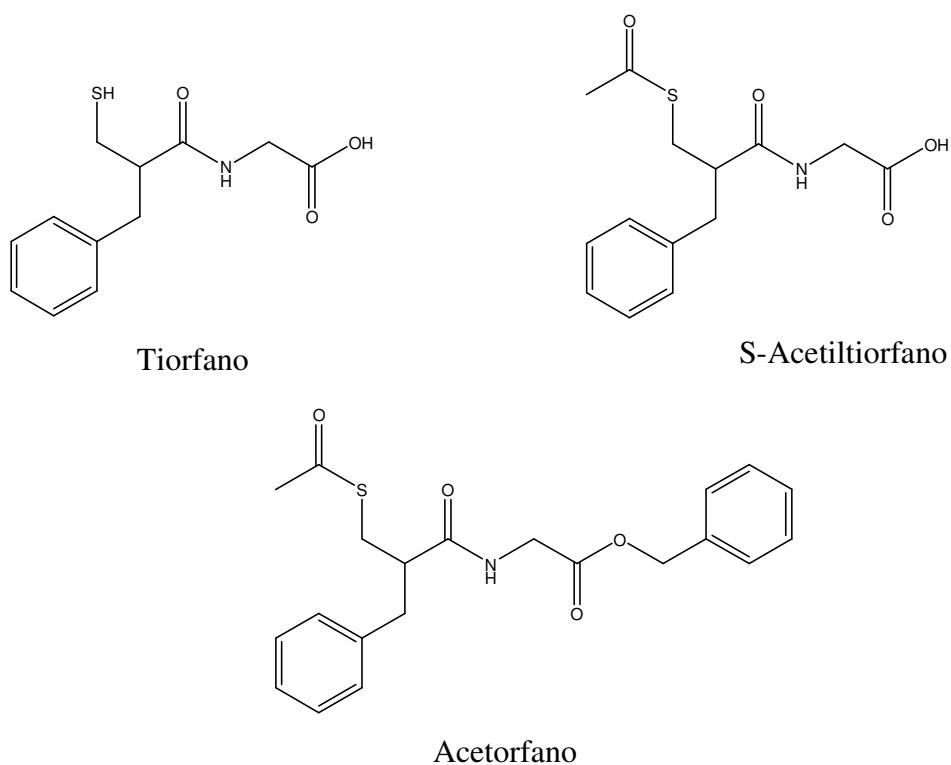
- ii) la diffusione passiva attraverso la barriera ematoencefalica diminuisce di 1 log di grandezza per ogni legame idrogeno che la molecola può instaurare: la situazione ottimale prevede un numero di legami idrogeno inferiore a 5 (intesi come somma di OHs e NHs)
- iii) un altro fattore da considerare è la farmacocinetica delle molecole nel plasma. Il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica diminuisce in modo proporzionale al diminuire della concentrazione del composto nel plasma, magari dovuto ad una maggior distribuzione della sostanza in altri tessuti periferici.

Sono state sviluppate molte strategie per permettere a molecole, che non possiedono le caratteristiche chimico-fisiche necessarie, di superare la barriera ematoencefalica.

#### *Lipidizzazione*

Come detto in precedenza un aumento della lipofilia delle molecole può favorire la loro diffusione passiva attraverso la barriera ematoencefalica: generalmente i gruppi polari vengono protetti con gruppi non polari formando esteri, eteri, amidi.

Un esempio di lipidizzazione può essere il tiorfano, un derivato della glicina inibitore delle endopeptidasi, che non attraversa la barriera ematoencefalica. L'*S*-acetiltiorfano, la forma monoacetilata del tiorfano, e l'acetorfano, l'estere benzilico dell'*S*-acetiltiorfano, mostrano un' aumentata attività analgesica che dimostra come l'aumento della lipofilia sia correlato all' aumento del passaggio attraverso la barriera ematoencefalica [24-26].



**Figura 4.** Struttura chimica del Tiorfano e derivati.

#### *Utilizzo di trasportatori*

Le molecole possono penetrare nel SNC utilizzando dei trasportatori specifici. I trasportatori endogeni possono essere classificati in tre categorie principali:

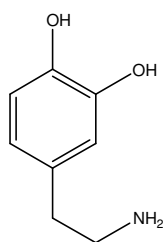
- i) **CMT** (passaggio trasportatore mediato): generalmente possono essere trasportate molecole con peso molecolare inferiore a 600 Da ed il trasporto può essere sia energia dipendente (ATP, Na<sup>+</sup>-dipendente) sia energia indipendente (passaggio facilitato);
- ii) **AET** (sistemi di efflusso attivo): questa categoria di trasportatori è in grado di espellere sostanze dal SNC, di conseguenza alcune molecole non riescono a superare la barriera ematoencefalica essendo substrati dei sistemi di efflusso AET. Lo sviluppo di molecole che bloccano i sistemi AET può rappresentare una strategia utile per aumentare il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica [27];
- iii) **RMT** (passaggio recettore mediato): è permesso il trasporto di molecole di maggiori dimensioni tramite un processo di endocitosi (ad esempio il trasporto di insulina).

Carrier	Type	Representative substrate	Main expression in blood/CNS barriers
Neutral amino acid	LAT 1	Phenylalanine	Blood-brain barrier
Hexose	GLUT 1	Glucose	Blood-brain-barrier
Monocarboxylic acid	MCT 1	Lactic acid	Blood-brain-barrier
Cationic aminoacid	CAT 1	Arginine	Blood-brain barrier
Nucleoside	CNT 2	Adenosine	Blood-brain barrier
Ascorbic acid	SVCT 2	Vitamin C	Choroid Plexus

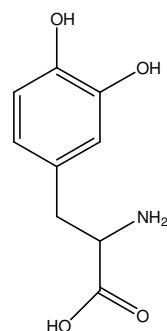
**Tabella 2.** Sistemi CMT coinvolti nel trasporto di nutrienti al SNC [28].

In generale i sistemi *CMT* (alcuni esempi sono riportati in **Tabella 2**) sono altamente specifici per i propri substrati e quindi richiedono precisi requisiti strutturali affinché una molecola possa essere trasportata; per fare in modo che molecole biologicamente attive possano raggiungere il SNC utilizzando i sistemi di trasporto *CMT* è stato proposto di:

i) modificare la molecola in un pseudonutriente che possieda le caratteristiche per fungere da substrato per i trasportatori. Un esempio di questa strategia è l'utilizzo della L-Dopa nella terapia del morbo di Parkinson. La terapia prevede il rilascio nel SNC di dopamina che come tale non è in grado di superare la barriera ematoencefalica; l' $\alpha$ -carbossilazione della dopamina a dare L-Dopa genera un aminoacido con caratteristiche neutre che diventa substrato per il trasportatore *LAT 1*. Nel sistema nervoso centrale la L-Dopa viene poi decarbossilata a dopamina.



Dopamina



L-Dopa

**Figura 5.** Struttura chimica di Dopamina e L-Dopa.

ii) coniugare la molecola di interesse con una sostanza substrato dei trasportatori. D-glucosio è un nutrimento fondamentale per il SNC e vi è trasportato tramite sistemi specifici, classificati in due famiglie principali SGLT (sodio dipendenti) e GLUT (sodio indipendenti) di cui GLUT 1 rappresenta circa il 90% dei trasportatori del glucosio a livello della barriera ematoencefalica. GLUT 1 trasporta D-glucosio, 2-desossiglucosio e 3-O-metilglucosio ma non L-glucosio [29]. La coniugazione di molecole con D-glucosio è stata proposta come strategia per aumentare il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica. Questo approccio è stato utilizzato coniugando peptidi ad attività oppioide [30].

## SCOPO DELLA TESI

Alcuni peptidi hanno mostrato un notevole potenziale terapeutico per il trattamento di patologie del sistema nervoso centrale, ma il loro utilizzo come potenziali farmaci risulta modesto.

Un problema generale che deve essere affrontato con molecole di natura peptidica bioattive riguarda le loro proprietà farmacocinetiche. Le caratteristiche idrofiliche associate a sequenze aminoacidiche determinano difficoltà nel passaggio delle membrane ed in particolare della barriera emato-encefalica. Altro parametro rilevante è rappresentato dai bassi valori dei tempi di emivita legati alla scarsa resistenza nei confronti della degradazione enzimatica. Questi fattori limitano in maniera rilevante gli studi biologici in vivo e di conseguenza una completa valutazione farmacologica dei peptidi biologicamente attivi. Fondamentali risultano la biodisponibilità e la resistenza alla proteolisi qualora l'interesse sia rivolto allo sviluppo di molecole peptidiche con potenziali applicazioni terapeutiche.

In questa parte della Tesi ho considerato la possibilità di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche della nocicettina (N/OFQ) utilizzando una strategia dei “*PEPTIDI CHIMERA*” che prevede il legame del peptide con un vettore noto essere in grado di attraversare la barriera ematoencefalica [31].

Come parametro biologico, in **Tabella 3**, è riportata l'attività nel vaso deferente di topo (mVD) stimolato elettricamente della N/OFQ e di alcuni suoi analoghi.

Il composto **1** rappresenta la sequenza naturale ed agisce da agonista del recettore NOP, la sequenza tronca N/OFQ(1-13) (composto **2**) mostra una drastica diminuzione di potenza pari a due ordini di grandezza. I composti **3** e **4**, che rappresentano la forma amidata dei precedenti peptidi, mostrano un'attività biologica paragonabile o addirittura leggermente superiore al ligando naturale così come la sequenza N/OFQ(1-16)-NH<sub>2</sub> (composto **5**) [32]. L'attività di agonista selettivo del recettore NOP dei composti **3** e **4** è stata confermata in un gran numero di studi sia in vitro che in vivo [33].

	Composto	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± SEM
1	N/OFQ	7.6	80 ± 2
2	N/OFQ(1-13)	5.7	78 ± 7
3	N/OFQ-NH <sub>2</sub>	7.7	83 ± 5
4	N/OFQ(1-13)-NH <sub>2</sub>	7.7	84 ± 4
5	N/OFQ(1-16)-NH <sub>2</sub>	7.3	71 ± 8

**Tabella 3.** Attività biologica nel vaso deferente di topo di N/OFQ e suoi analoghi.

Sulla base dei risultati di amidazione al C-terminale abbiamo utilizzato come composto di riferimento N/OFQ-NH<sub>2</sub> e ne abbiamo funzionalizzato l'estremità C-terminale con alcuni tipi di vettori.

#### Cell penetrating peptides

“Cell penetrating proteins o peptides” sono sequenze aminoacidiche in grado di attraversare le membrane cellulari in modo energia-recettore indipendente. Alcuni esempi sono riportati in **Tabella 4**.

Names	Sequences	Res.
<i>Peptides deriving from protein transduction domains and assimilated</i>		
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	16
Tat(48-60)	GRKKRRQRRPPQ	13
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	27
VP22	DAATATGRSAASRPTEPRAPARSASRPRRPVD	34
<i>Amphipathic peptides (secondary and primary)</i>		
MAP	KLALKLALKALKAALKLA	18
KALA	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKACEA	30
ppTG20	GLFRALLRLLRSLWRLLLRA	20
Trimer	(VRLPPP) <sub>3</sub>	18
P1	MGLGLHLLVLAALQGAWSQPKKKRKV	27
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV	27
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	21
<i>Other cell-penetrating peptides</i>		
Arg9	RRRRRRRR	9
Loligomer	Branched Polylysine + NLS	24
hCT(9-32)	LGTYTQDFNKFHTEFPQTAIGVVGAP	24

**Tabella 4.** Sequenze aminoacidiche di alcuni CPPs [34].



La prima sequenza CPP identificata fu la proteina Tat (trans-activating transcriptional activator) del virus HIV-1 che passa all'interno delle cellule dal terreno di coltura del virus.

In genere CPPs sono sequenze peptidiche relativamente corte (20-30 aminoacidi), molto ricche in aminoacidi basici.

CPPs sono già stati utilizzati per trasportare all'interno di diversi tipi cellulari varie classi di molecole, anche di grosse dimensioni come anticorpi, oligonucleotidi, proteine e liposomi [35].

Il meccanismo con cui avviene la traslocazione attraverso le membrane non è ancora del tutto chiarito; sono stati proposti alcuni modelli schematizzati in **Figura 6**:

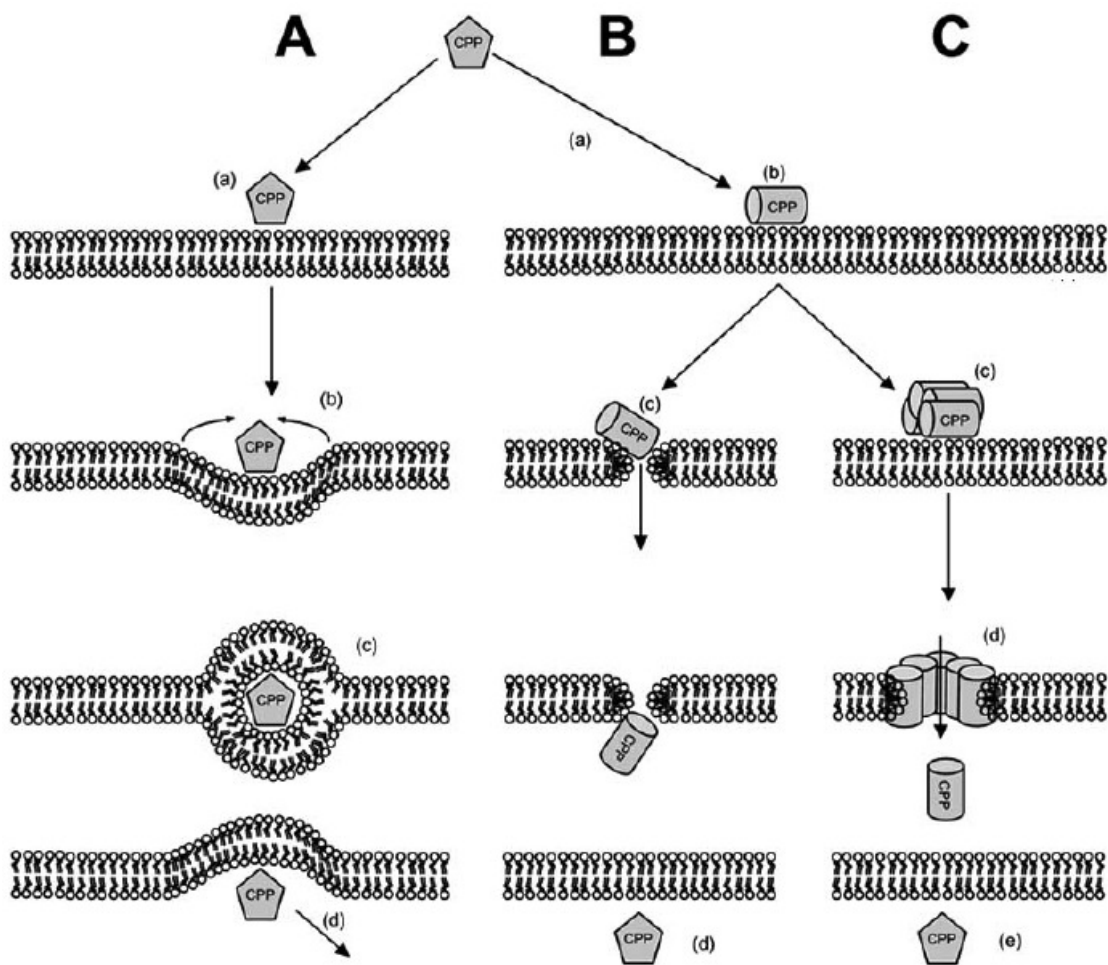
A) le cariche positive presenti nei CPPs interagiscono con le cariche negative dei fosfolipidi delle membrane cellulari. In un secondo momento intervengono le interazioni tra i residui idrofobici delle sequenze peptidiche e le membrane cellulari a formare una micella al cui interno viene a trovarsi il CPP, che viene poi rilasciato nel citoplasma;

B) CPP interagisce inizialmente con i fosfolipidi di membrana e questo causa una modifica nella struttura secondaria del CPP che permette ai residui idrofobici di interagire con il core idrofobico della membrana in cui si verifica una apertura momentanea attraverso la quale riesce a passare il peptide;

C) e' stato inoltre proposto, come meccanismo di traslocazione, anche la formazione di un poro transiente in cui i residui idrofobici delle sequenze penetranti interagiscono con la membrana cellulare mentre i residui idrofilici formano un canale attraverso il quale può passare CPP.

Ho considerato due sequenze CPPs. Penetratina, costituita da 16 aminoacidi, che deriva da una proteina di *Antennapedia* ed è efficace nel trasportare piccole proteine (meno di 100 residui aminoacidici), PNAs (peptide nucleic acid) e oligonucleotidi. Tat(48-60) è il frammento minimo ancora dotato di attività di traslocazione della proteina del virus HIV ed è utilizzata per il trasporto di molecole di grandi dimensioni come liposomi.

Alla nostra sequenza peptidica di riferimento (N/OFQ-NH<sub>2</sub>) sono state quindi legati questi due CPPs all'estremità C-terminale tramite un legame peptidico.



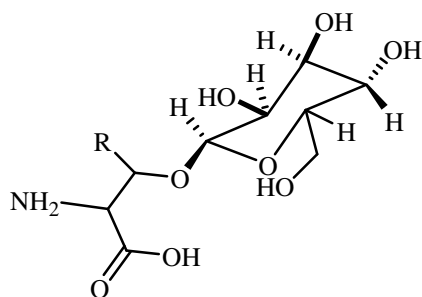
**Figura 6.** Modelli proposti per la traslocazione dei CPPs attraverso le membrane biologiche è [35].

### Lipoaminoacidi (LAA)

Un approccio interessante per migliorare la farmacocinetica di peptidi è la coniugazione con acidi grassi; è noto, infatti, che coniugati “acido grasso-peptide” sono in grado di attraversare le membrane cellulari inclusa la barriera ematoencefalica [36].

Abbiamo coniugato tramite un legame amidico all’estremità C-terminale della nostra sequenza riferimento un lipoaminoacido utilizzando il gruppo funzionale di una





**Figura 8.** Struttura chimica dell' aminoacido glicosilato inserito all'estremità C-terminale di N/OAQ-NH<sub>2</sub>; R=H serina, R=CH<sub>3</sub> treonina.

Come ho riportato precedentemente alcuni peptidi oppioidi glicosilati sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, come il derivato MMP-2200 (H-Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Ser[ $\beta$ -D-lattosio]-NH<sub>2</sub>). E' stato inoltre riportato che la sostituzione dell'aminoacido Tyr N-terminale con Gly-Phe, per privare questo peptide dell'attività oppioide, ed utilizzando il  $\beta$ -D-glucosio come zucchero al C-terminale, nel derivato H-Gly-Phe-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Ser[ $\beta$ -D-glucosio]-NH<sub>2</sub>, mantiene la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica. Il composto ottenuto è stato utilizzato per veicolare nel sistema nervoso centrale nanoparticelle di polimero PLGA [poly(D,L-lactide-co-glicolide)]contenti il derivato oppioide non peptidico loperamide [38, 39].

Un altro tentativo che abbiamo utilizzato per veicolare N/OAQ-NH<sub>2</sub> nel sistema nervoso centrale ha considerato l'utilizzo del peptide sopra riportato legato con legame covalente al C-terminale della sequenza di riferimento.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I composti sono stati valutati farmacologicamente in vitro utilizzando come preparato farmacologico il vaso deferente di topo (mVD) stimolato elettricamente. In questo tessuto la N/OFQ è in grado di indurre un'inibizione della contrazione indotta elettricamente concentrazione-dipendente, con una  $pEC_{50}$  pari a 7.40 e una  $E_{max}$  del 75%. La  $pEC_{50}$  è definita come il logaritmo negativo in base 10 della concentrazione molare di agonista che produce il 50% dell'effetto massimo possibile, mentre l' $E_{max}$  rappresenta l'effetto massimo che un agonista è in grado di indurre nel tessuto in quelle determinate condizioni sperimentali, ed è espresso, in questi esperimenti, come inibizione percentuale della contrazione indotta elettricamente.

La amidazione della funzione C-terminale determina un leggero incremento sia di potenza ( $pEC_{50} = 7.81$ ) che di effetto massimo ( $E_{max} = 93\%$ ). L'attività biologica degli analoghi nocicettinici sintetizzati è riportata nella **Tabella 5**. Tutti i composti testati si comportano da agonisti.

I composti **1** e **3** che presentano all'estremità C-terminale le sequenze di cell penetrating peptides sono rispettivamente circa 80 e 5 volte meno potenti nei confronti della sequenza di riferimento, mentre i peptidi TAT(48-60)-NH<sub>2</sub> e Penetratina-NH<sub>2</sub> (composti **2** e **4**) attivano il recettore solamente a concentrazioni  $\mu M$ . Probabilmente la differenza di attività tra i composti **1** e **3** risiede nella conformazione che viene assunta dai peptidi o dalla sequenza aminoacidica, non dalle dimensioni in quanto il peptide che porta legata la Penetratina (16 aa) è più potente rispetto al composto che presenta la sequenza TAT(48-60)-NH<sub>2</sub> (13aa). I dati sono rappresentati in **Figura 9A**.

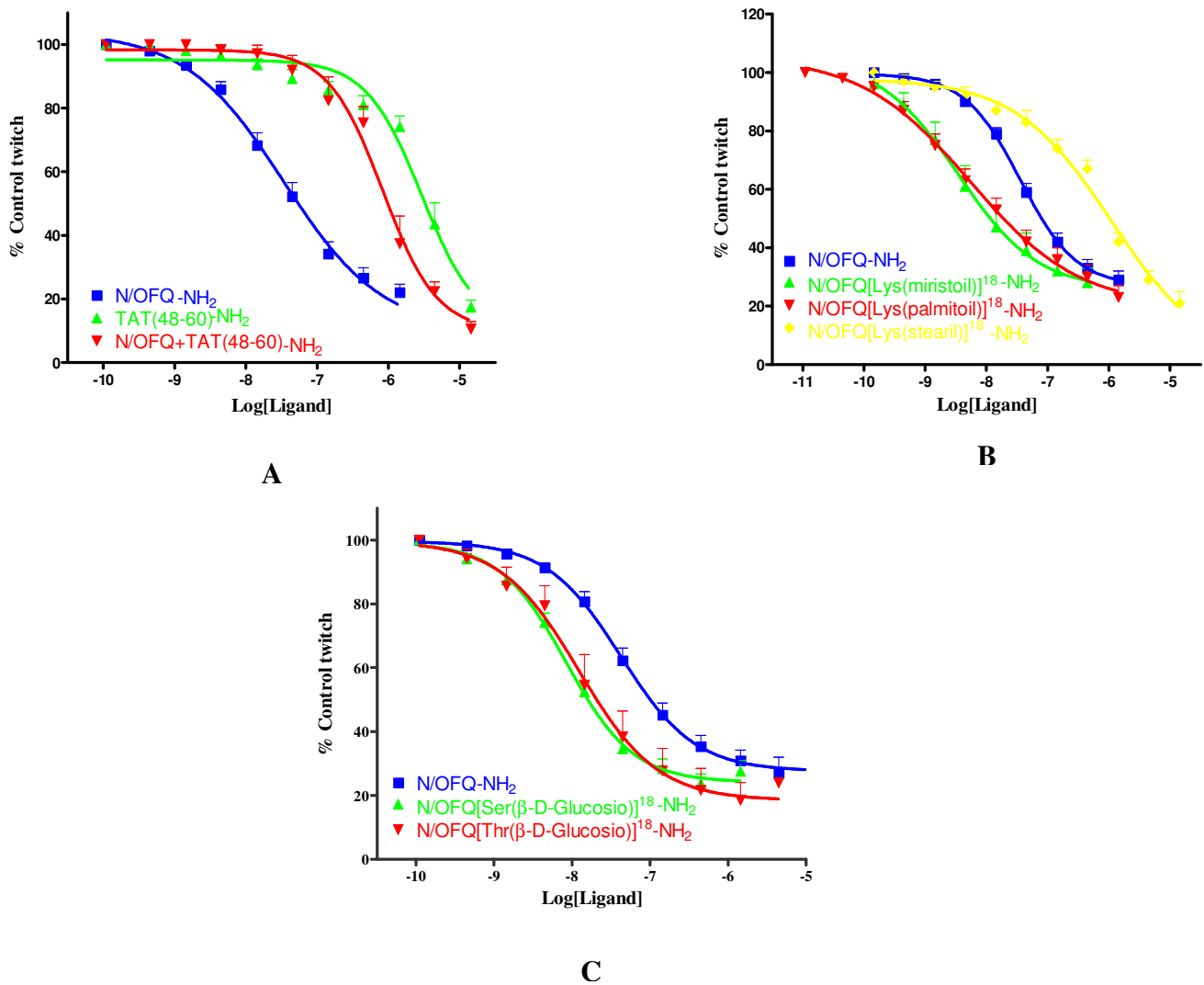
I composti **5-7**, derivatizzati con lipoaminoacidi al C-terminale del peptide, mostrano un'attività inversamente proporzionale alla lunghezza della catena lineare alifatica; in particolare i composti **5** e **6** risultano più potenti rispetto alla sequenza di riferimento con un effetto massimo inferiore (**Figura 9B**).

I glicopeptidi (composti **8** e **9**) mostrano un'attività ed un effetto massimo paragonabile alla sequenza di riferimento (**Figura 9C**).

Il composto **10**, che lega all'estremità C-terminale la sequenza pseudooppioidi glicosilata, è circa 80 volte meno potente rispetto a N/OFQ-NH<sub>2</sub> e con un effetto massimo paragonabile a quello del peptide di riferimento. La sequenza pseudooppioidi glicosilata (composto **11**) risulta inattiva ad una concentrazione 10 μM.

No	Composto	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> ± SEM
	N/OFQ-NH <sub>2</sub>	7.81 (7.70-7.90)	93 ± 4%
<b>1</b>	N/OFQ-TAT (48-60)-NH <sub>2</sub>	6.06 (5.77-6.35)	89 ± 3%
<b>2</b>	TAT(48-60)-NH <sub>2</sub>	5.43 (5.19-5.67)	82 ± 3%
<b>3</b>	N/OFQ-Penetratina-NH <sub>2</sub>	7.13 (6.92-7.34)	96 ± 5%
<b>4</b>	Penetratina-NH <sub>2</sub>	5.70 (5.35-6.05)	87 ± 2%
<b>5</b>	N/OFQ[LysN <sup>ε</sup> (miristoil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	8.35 (7.61-9.09)	76 ± 3%
<b>6</b>	N/OFQ[LysN <sup>ε</sup> (palmitoil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	8.05 (7.55-8.55)	76 ± 4%
<b>7</b>	N/OFQ[LysN <sup>ε</sup> (stearil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	6.10 (5.83-6.37)	79 ± 4%
<b>8</b>	N/OFQ[Ser(β-D-Glucosio)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	8.05 (7.94-8.16)	75 ± 3%
<b>9</b>	N/OFQ[Thr(β-D-Glucosio)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	7.82 (7.25-8.39)	82 ± 3%
<b>10</b>	N/OFQ-Gly-Phe-DThr-Gly-Phe-Leu-Ser-(O-β-D-Glucosio)-NH <sub>2</sub>	7.13 (6.68-7.58)	82 ± 3%
<b>11</b>	Gly-Phe-DThr-Gly-Phe-Leu-Ser-(O-β-D-Glucosio)-NH <sub>2</sub>	cnc incomplete: at 10 μM -64 ± 8%	

**Tabella 5.** Attività biologica nel vaso deferente di topo(mVD) di N/OFQ-NH<sub>2</sub> e suoi analoghi.



**Figura 9.** Curve concentrazione-risposta di N-OFQ-NH<sub>2</sub> e analoghi testati nel vaso deferente di topo (mVD): A. analoghi con cell penetrating peptides B. analoghi con lipoaminoacidi C. analoghi con subunità di  $\beta$ -D-glucosio.

Il ligando di riferimento e tutti i composti sintetizzati sono stati anche valutati nel saggio di mobilizzazione del calcio in cellule CHO trasfettate stabilmente con il recettore ricombinante umano NOP, utilizzando il sistema automatizzato multicanale FlexStation II (Tabella 6).

I dati ottenuti sono in accordo con i precedenti. I composti **1** e **3** sono entrambi meno potenti del peptide di riferimento, mentre le sequenze penetranti (composti **2** e **4**) non attivano il recettore ad una concentrazione 1  $\mu$ M.

I composti **5-7** risultano circa 80 volte meno potenti rispetto a N/OFQ-NH<sub>2</sub>. Al contrario i composti glicosilati **8** e **9** hanno attività ed effetto massimo paragonabile al peptide di riferimento. Il composto **10** è circa 50 volte meno potente, mentre la sola sequenza penetrante-glicosilata (**11**) presenta una curva concentrazione-risposta incompleta.

No	Composto	pEC <sub>50</sub> (CL <sub>95%</sub> )	E <sub>max</sub> $\pm$ SEM
	N/OFQ-NH <sub>2</sub>	9.36 (9.24-9.48)	212 $\pm$ 12%
<b>1</b>	N/OFQ-TAT (48-60)-NH <sub>2</sub>	7.89 (7.21-8.57)	189 $\pm$ 20%
<b>2</b>	TAT(48-60)-NH <sub>2</sub>	crc incomplete: at 1 $\mu$ M	29 $\pm$ 8%
<b>3</b>	N/OFQ-Penetratina-NH <sub>2</sub>	8.02 (7.63-8.41)	197 $\pm$ 12%
<b>4</b>	Penetratina-NH <sub>2</sub>	crc incomplete: at 1 $\mu$ M	134 $\pm$ 18%
<b>5</b>	N/OFQ[Lys N <sup>ε</sup> (miristoil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	8.89 (8.49-9.29)	196 $\pm$ 21%
<b>6</b>	N/OFQ[Lys N <sup>ε</sup> (palmitoil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	8.90 (8.63-9.17)	207 $\pm$ 19%
<b>7</b>	N/OFQ[Lys N <sup>ε</sup> (stearil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	8.71 (8.49-8.93)	216 $\pm$ 18%
<b>8</b>	N/OFQ[Ser( $\beta$ -D-Glucosio)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	9.51 (9.09-9.93)	207 $\pm$ 11%
<b>9</b>	N/OFQ[Thr( $\beta$ -D-Glucosio)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	9.45 (9.15-9.75)	204 $\pm$ 14%
<b>10</b>	N/OFQ-Gly-Phe-DThr-Gly-Phe-Leu-Ser-(O- $\beta$ -D-Glucosio)-NH <sub>2</sub>	8.99 (8.59-9.39)	203 $\pm$ 12%
<b>11</b>	Gly-Phe-DThr-Gly-Phe-Leu-Ser-(O- $\beta$ -D-Glucosio)-NH <sub>2</sub>	crc incomplete: at 1 $\mu$ M	20 $\pm$ 13%

**Tabella 6:** Attività biologica di N/OFQ-NH<sub>2</sub> e analoghi testati su cellule CHO esprimenti il recettore ricombinante umano NOP.



## CONCLUSIONI PRELIMINARI

In questo lavoro sono state introdotte delle modifiche all'estremità C-terminale del peptide N/OFQ-NH<sub>2</sub> al fine di migliorarne le caratteristiche farmacinetiche e di favorire quindi il passaggio attraverso la barriera emato-encefalica.

Tutte le modifiche chimiche introdotte sono compatibili con l'attività biologica anche se alcuni composti mostrano un notevole riduzione di potenza.

Non è ancora stato possibile valutare la capacità dei composti di attraversare la barriera emato-encefalica in modelli *in vitro*.

## PARTE SPERIMENTALE

### *Sintesi dei composti*

Tutti gli analoghi della N/OFQ sono stati sintetizzati in fase solida con chimica Fmoc, utilizzando un sintetizzatore automatico Syro XP.

Come materiale di partenza è stata utilizzata una resina polistirenica funzionalizzata con un linker Rink Amide MBHA (con grado di derivatizzazione 0.66 meq/g) che consente di ottenere peptidi ammidici nella fase di rimozione del peptide dalla resina.

La strategia di sintesi in fase solida prevede l'elongazione del peptide a partire dall'estremità C-terminale, attraverso una serie di reazioni successive di deprotezione dell' $\alpha$ -ammino gruppo e di acilazione con la componente carbossilica dell'amminoacido opportunamente attivata. Come esempio, nello **Schema 1** è riportata la sintesi della N/OFQ-NH<sub>2</sub>.

La funzionalità  $\alpha$ -amminica degli amminoacidi utilizzati è protetta con il gruppo Fmoc mentre le catene laterali sono protette, quando necessario, con gruppi protettori acido labili come Boc per la Lys e Trp, Pmc per l'Arg, tBu per la Ser e la Thr, Trt per l'Asn e la Gln.

L'attivazione della funzionalità  $\alpha$ -carbossilica di ciascun amminoacido è stata eseguita mediante l'utilizzo di DIPCDI e di HOBt.

La stechiometria della reazione di acilazione prevede un eccesso molare del componente acilante di quattro volte rispetto alla componente amminica legata alla resina e tempi di reazione di 1h.

La rimozione del peptide dalla resina e la contemporanea rimozione dei gruppi protettori dalle catene laterali di ogni singolo amminoacido è stata effettuata trattando il peptide con una miscela TFA/H<sub>2</sub>O/Et<sub>3</sub>SiH (9:0.5:0.5), per 1h 30' a temperatura ambiente. Nel caso dei composti contenenti le sequenze Tat(48-60) e Penetratina (composti **1-4**) è stato necessario aumentare i tempi di rimozione per almeno 3 ore.

Le protezioni del glucosio (composti **8-11**) sono state rimosse mediante trattamento con una miscela di idrazina idrato/metanolo (8:2) a 0°C per 30 minuti [40].

La resina esaurita è stata eliminata per filtrazione e la miscela di sblocco è stata evaporata a secchezza; il residuo ottenuto è stato ripreso con etere etilico, centrifugato e seccato.

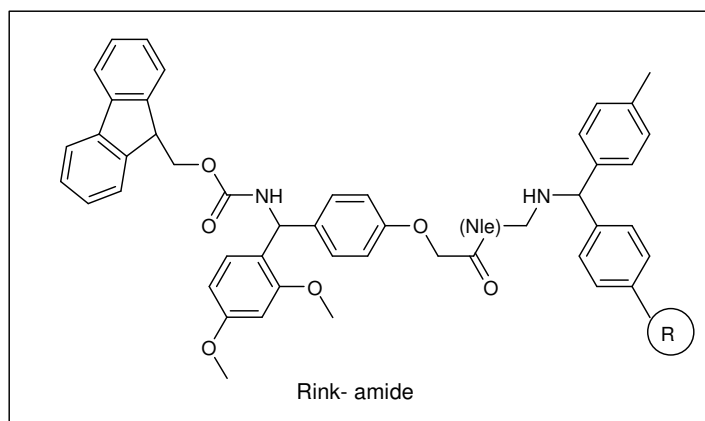
Gli aminoacidi e gli intermedi non disponibili commercialmente sono stati sintetizzati secondo le procedure note in letteratura e riportate negli **Schemi 2 e 3**.

In particolare nello **Schema 2** è riportata la sintesi dei composti Fmoc-Lys-[N<sup>ε</sup>(miristil)]-OH, Fmoc-Lys-[N<sup>ε</sup>(palmitoil)]-OH, Fmoc-Lys-[N<sup>ε</sup>(stearil)]-OH.

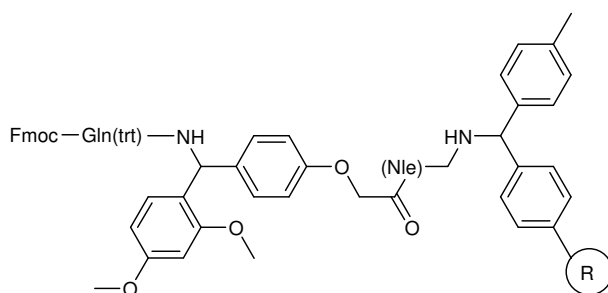
L'acido grasso di interesse (acido miristico, palmitico e stearico) è condensato con N-idrossisuccinimide in presenza di dicicloesilcarbodiimide. La dicicloesilurea che si forma nella reazione è allontanata per filtrazione e gli acidi grassi attivati come N-idrossisuccinimide estere sono ottenuti come solidi cristallini in buona resa [41]. Gli esteri attivi sono fatti reagire con Fmoc-Lys-OH cloridrato in presenza di DPEA per dare i corrispondenti N<sup>ε</sup>-acil-aminoacidi.

Nello **Schema 3** è riportata la sintesi dei composti Fmoc-Ser[β-D-Glu(OAc)<sub>4</sub>]-OH e Fmoc-Thr[β-D-Glu(OAc)<sub>4</sub>]-OH.

Gli aminoacidi H-Ser-OH o H-Thr-OH sono protetti sul gruppo aminico come benzilossiuretani per reazione con il corrispondente cloruro e come benzil esteri al gruppo carbossilico. Il prodotto ottenuto (Z-AA-OBzl) è O-glicosilato in catena laterale per reazione di 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-β-D-glucopiranosio in presenza di BF<sub>3</sub> eterato al 48% [42]. Il composto è poi sottoposto a idrogenazione catalitica al fine di rimuovere contemporaneamente le protezioni presenti sia sul gruppo aminico sia sul gruppo carbossilico. Il gruppo aminico è successivamente protetto come Fmoc.



- 1) Piperidina 40% v/v in DMF
- 2) Fmoc- Gln(trt)-OH /HOBt



- 1) Piperidina 40% v/v in DMF
- 2) Fmoc- Xaa -OH /HOBt
- 3) Piperidina 40% v/v in DMF
- 4) DMF

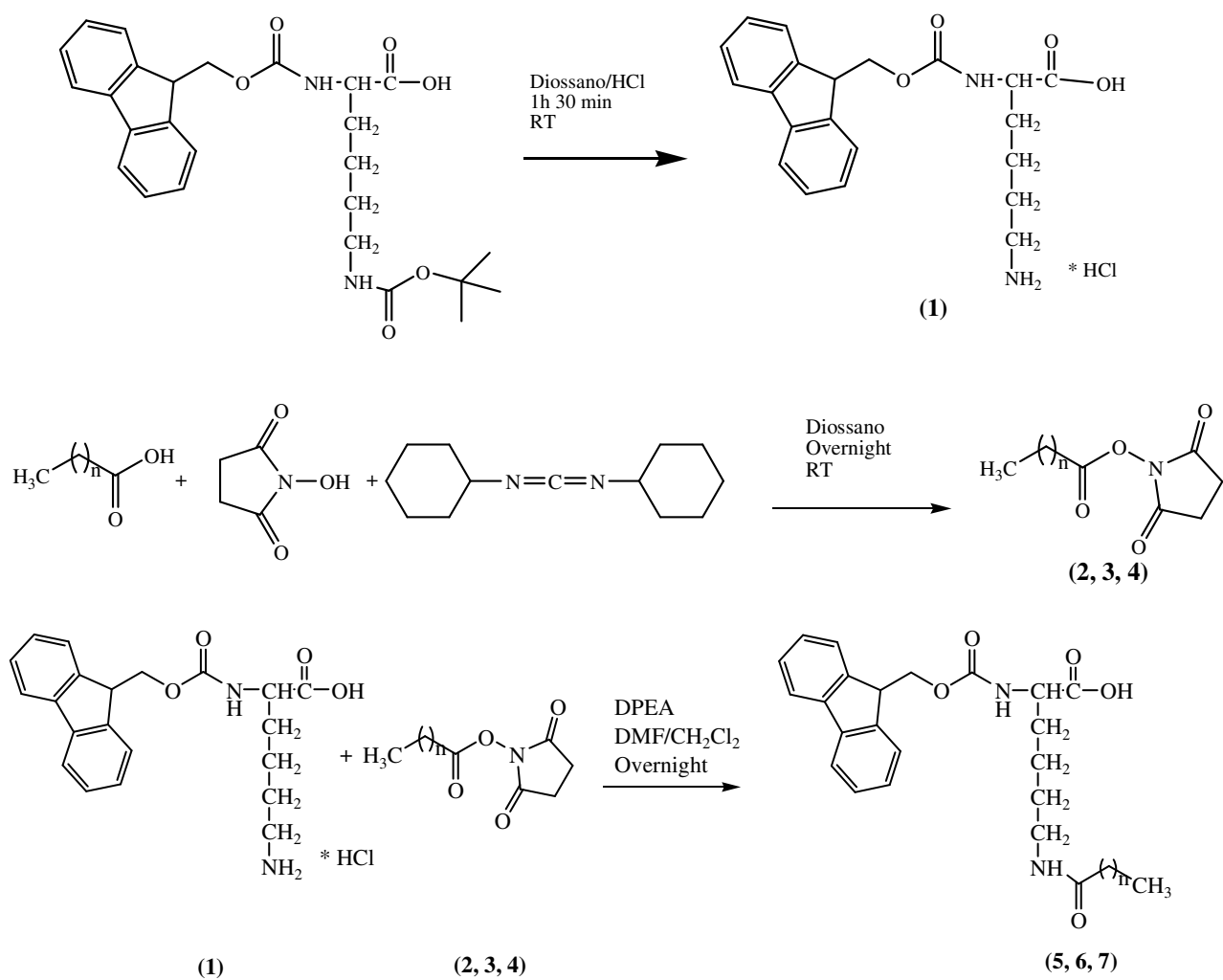
Phe-Gly-Gly-Phe-Thr(tBu)-Gly-Ala-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Ser(tBu)-Ala-Arg(Pmc)-Lys(Boc)-Leu-Ala-Asn(Trt)-Gln(Trt)

R

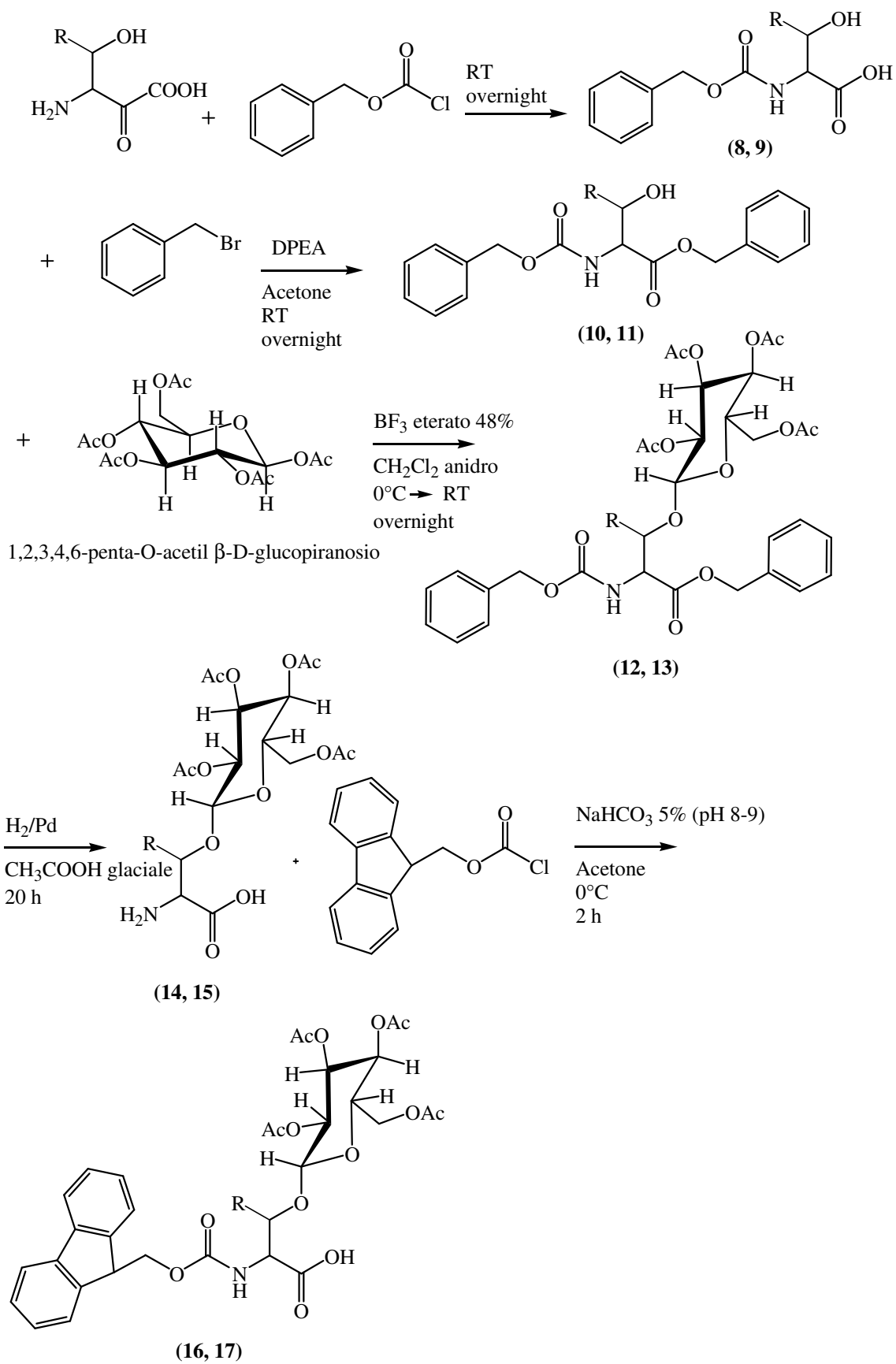
H<sub>2</sub>O 5%, Et<sub>3</sub>SiH 5%, TFA 90%

NH<sub>2</sub> -Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln-OH

**Schema 1.** Sintesi della N/OFG-NH<sub>2</sub>.



**Schema 2.** Sintesi di  $N^\epsilon$ -acil-lisina



**Schema 3.** Sintesi di Fmoc-Ser[β-D-Glu(OAc)<sub>4</sub>]-OH e Fmoc-Thr[β-D-Glu(OAc)<sub>4</sub>]-OH.

### *Purificazione e controllo analitico*

Il controllo analitico dei grezzi di reazione e dei prodotti finali è stato eseguito mediante HPLC analitico Beckman System Gold 168 utilizzando una colonna Alltech C-18 (150 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m) e un rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile fissata a 220 nm. Le analisi sono state condotte con un sistema eluente binario costituito da CH<sub>3</sub>CN e H<sub>2</sub>O entrambi contenenti lo 0.1% v/v di TFA, ad un flusso di 1 ml/min. I tempi di ritenzione  $t_r$  riportati in **Tabella 7** sono stati ottenuti utilizzando i seguenti gradienti  $t_r$ I: da 0% a 100% CH<sub>3</sub>CN in 25 min;  $t_r$ II: da 0% a 50% CH<sub>3</sub>CN in 25 min.

I peptidi grezzi sono stati purificati mediante HPLC preparativo Waters Delta Prep 4000 utilizzando una colonna ad impaccamento radiale Water Delta- LC 40 mm C-18 (30 x 4 cm, 300 Å, 15  $\mu$ m), eluita con la stessa fase mobile utilizzata per l'HPLC analitico e con gradienti programmati di volta in volta secondo il profilo analitico del grezzo di reazione.

Il peso molecolare dei composti è stato determinato mediante spettrometria di massa electrospray utilizzando uno strumento Micromass ZMD-2000; i valori ottenuti sono riportati in **Tabella 7**.

no	Sigla	$t_r$		MH <sup>+</sup>	
		I	II	calcolato	misurato
	N/OFQ-NH <sub>2</sub>	9.05	14.79	1808.1	1808.8
1	N/OFQ + TAT (48-60)-NH <sub>2</sub>	12.92	21.12	3508.1	3508.0
2	TAT(48-60)-NH <sub>2</sub>	6.87	11.23	1719.1	1718.7
3	N/OFQ + Penetratina-NH <sub>2</sub>	13.20	21.58	4033.8	4033.6
4	Penetratina-NH <sub>2</sub>	15.19	24.83	2246.8	2246.4
5	N/OFQ[Lys N <sup>ε</sup> (miristoil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	16.27	26.60	2146.6	2147.2
6	N/OFQ[Lys N <sup>ε</sup> (palmitoil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	18.06	29.03	2174.4	2175.0
7	N/OFQ[Lys N <sup>ε</sup> (stearil)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	20.32	-	2202.7	2203.2
8	N/OFQ[Ser( $\beta$ -D-Glucosio)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	7.07	11.56	2057.3	2058.2

9	N/OFQ[Thr( $\beta$ -D-Glucosio)] <sup>18</sup> -NH <sub>2</sub>	7.32	11.97	2071.3	2072.0
10	N/OFQ-Gly-Phe-DThr-Gly-Phe-Leu-Ser-(O- $\beta$ -D-Glucosio)-NH <sub>2</sub>	14.72	24.06	2680.0	2679.4
11	Gly-Phe-DThr-Gly-Phe-Leu-Ser-(O- $\beta$ -D-Glucosio)-NH <sub>2</sub>	9.12	14.91	889.2	889.7

**Tabella 7.** Tempi di ritenzione I e II e pesi molecolari degli analoghi pesi molecolari degli analoghi nocicettinici sintetizzati.

### **Materiali e metodi**

I punti di fusione (**Pf**) sono stati determinati con uno strumento Kofler (Reicher Yung, Austria) e non sono stati corretti.

I ratio factor (**Rf**) sono stati determinati tramite cromatografia su strato sottile, effettuata utilizzando piastre di gel di silice F 254 (Merck, Damstadt, Germania) e usando i seguenti sistemi eluenti:

B1: But-OH/CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O (3:1:1);

B2: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/toluene (17:2:1);

Come reagenti di sviluppo delle lastre cromatografiche sono stati usati ninidrina 1% in MeOH, NaClO 50% in acqua, KI in salda d'amido 5% p/v in acqua, KMnO<sub>4</sub> soluzione acquosa al 2%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soluzione acquosa al 30%.

Gli spettri [<sup>1</sup>H]NMR e [<sup>13</sup>C]NMR sono stati registrati mediante uno strumento Varian 200 o 400 MHz e i campioni sono stati solubilizzati in CDCl<sub>3</sub> o DMSO. Gli spostamenti ( $\delta$ ) vengono espressi in parti per milione (ppm) e sono riferiti al picco a 7.256 ppm del CDCl<sub>3</sub>; le costanti di accoppiamento (**J**) sono espresse in Hz. Per i segnali multipli valgono le seguenti abbreviazioni: s = singoletto; d = doppietto; t = tripletto; q = quartetto; m = multipletto.

Il controllo analitico degli intermedi e dei prodotti finali è stato fatto mediante HPLC analitico Beckmann Sistem Gold 168 e utilizzando una colonna Alltech C-18 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m). I composti sono stati analizzati utilizzando un sistema eluente binario composto da H<sub>2</sub>O e CH<sub>3</sub>CN entrambi acidificati con lo 0.1% v/v di TFA (A ed B rispettivamente) ad un flusso di 1 ml/min.



Gli spettri IR sono stati eseguiti con apparecchio Perkin-Elmer FT-IR Paragon 500, per le intensità valgono le seguenti abbreviazioni: s = forte; m = media; w = debole.

### *Procedure sintetiche*

#### **Sintesi di Fmoc-Lys-OH (1)**

A 1.00 g ( 2,13 mmol) di Fmoc-Lys(Boc)-OH si aggiungono 5 ml di diossano saturo di HCl e si lascia in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora e 30 minuti. Il solvente è evaporato a secchezza ad ottenere un solido bianco che cristallizza in etere etilico.

Caratteristiche del composto (1):

**Resa:** quantitativa

**[MH<sup>+</sup>]:** 369.0

**R.f (B1):** 0.46

**t<sub>r</sub>:** 16.70

**P.f:** 170-178°C

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.90-7.31 (m, 8H), 4.29 (d, 2H), 4.22 (t, 1H), 4.74 (m, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.35 (m, 2H), 1.08 (m, 2H).

#### **Sintesi di miristico-OSu (2)**

6.189 g di acido miristico (30 mmoli) sono disciolti scaldando leggermente in 100 ml di diossano; successivamente si aggiungono 3.798 g di N-idrossi succinimide (33 mmoli; 1.1 eq) e quando il tutto è disciolto si aggiungono 6.809 g di dicicloesilcarbodiimmide (33 mmoli; 1.1 eq) precedentemente disciolti in 25 ml di diossano. La reazione procede a temperatura ambiente su notte. La miscela di reazione è filtrata per eliminare l'urea formatasi e il filtrato è evaporato a secchezza. Il prodotto è cristallizzato caldo/freddo con alcol isopropilico.

Caratteristiche del composto (2):

**Resa:** 53%

**P.f:** 85-87°C

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>/DMSO), δ (ppm)= 2.8 (s, 4H), 2.6 (t, 2H), 1.74 (m, 2H), 1.2-1.5(m, 10H), 0.9 (t, 3H).

### **Sintesi di palmitico-OSu (3)**

7.693 g di acido palmitico (30 mmoli) sono disciolti scaldando leggermente in 100 ml di diossano; successivamente si aggiungono 3.798 g di N-idrossi succinimide (33 mmoli; 1.1 eq) e quando il tutto è disciolto si aggiungono 6.809 g di dicicloesilcarbodiimmide (33 mmoli; 1.1 eq) precedentemente disciolti in 25 ml di diossano. La reazione procede a temperatura ambiente overnight. La miscela di reazione è filtrata per eliminare l'urea formatasi e il filtrato è evaporato a secchezza. Il prodotto è cristallizzato caldo/freddo con alcol isopropilico.

Caratteristiche del composto (3):

**Resa:** 82%

**P.f:** 90-91°C

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>/ (DMSO), δ (ppm)= 2.8 (s, 4H), 2.6 (t, 2H) 1.74 (m, 2H), 1.2-1.4 (m, 12H), 0.88 (t, 3H).

### **Sintesi di stearico-OSu (4)**

8.535 g di acido stearico (30 mmoli) sono disciolti scaldando leggermente in 100 ml di diossano; successivamente si aggiungono 3.798 g di N-idrossi succinimide (33 mmoli; 1.1 eq) e quando il tutto è disciolto si aggiungono 6.809 g di dicicloesilcarbodiimmide (33 mmoli; 1.1 eq) precedentemente disciolti in 25 ml di diossano. La reazione procede a temperatura ambiente overnight. La miscela di reazione è filtrata per eliminare l'urea formatasi e il filtrato è evaporato a secchezza. Il prodotto è cristallizzato caldo/freddo con alcol isopropilico (2-propanolo).

Caratteristiche del composto (4):

**Resa:** 61%

**P.f:** 93-94°C

**IR:** (cm<sup>-1</sup>) 3502.16, 2920.79, 2850.27, 2360.57, 1827.26, 1788.93, 1727.13, 1210.67, 1072.10

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>/DMSO), δ (ppm)= 2.8 (s, 4H), 2.55 (m, 2H) 1.6 (m, 2H), 1.15-1.4 (m, 14H), 0.8 (t, 3H).

#### **Sintesi di Fmoc-Lys-[N<sup>ε</sup>(miristil)]-OH (5)**

585 mg di miristico-OSu (**2**) (1.9 mmoli; 0.9 eq) sono disciolti in 10 ml di una miscela 1:1 DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e a questa soluzione sono aggiunti a 0°C 809 mg di Fmoc-Lys-OH cloridrato (**1**) (2 mmoli) disciolti in 6 ml di una miscela 1:1 DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> contenente 0.34 ml di DPEA (258 mg; 2 mmoli; 1 eq). La reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight. Si evapora il solvente a secchezza. Il composto è precipitato in acqua acida (HCl 1N). Il solido bianco ottenuto è lavato con etere etilico.

Caratteristiche del composto (**5**):

**Resa:** 68%

**[MH<sup>+</sup>]:** 579.5

**P.f.:** 130-136°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** +5.7 (c=1, THF)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 7.75 (d, 2H), 7.2-7.6 (m, 8H), 4.2 (m, 1H), 4.2 (m, 1H), 3.15 (m, 2H), 2 (m, 2H), 1.15-1.75 (m, 30H), 0.9 (t, 3H).

#### **Sintesi di Fmoc-Lys-[N<sup>ε</sup>(palmitoil)]-OH (6)**

954 mg di palmitico-OSu (**3**) (2.7 mmoli; 0.9 eq) sono disciolti in 10 ml di una miscela 1:1 DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e a questa soluzione sono aggiunti a 0°C 1.214 g di Fmoc-Lys-OH cloridrato (**1**) (2 mmoli) disciolti in 6 ml di una miscela 1:1 DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. contenente 0.34 ml di DPEA (258 mg; 2 mmoli; 1 eq). La reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight. Si evapora il solvente a secchezza. Il composto è precipitato in acqua acida (HCl 1N). Il solido bianco ottenuto è lavato con etere etilico.

Caratteristiche del composto (**6**):

**Resa:** 65%

**[MH<sup>+</sup>]:** 607.3

**P.f.:** 130-135°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** +3.42 (c=1, THF)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 7.9 (d, 2H), 7.2-7.75 (m, 8H), 4.2 (m, 1H), 4.2 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 2 (m, 2H), 1.15-1.75 (m, 34H), 0.9 (t, 3H).

#### **Sintesi di Fmoc-Lys- [N<sup>ε</sup>(stearil)]-OH (7)**

671 mg di stearico-OSu (**4**) (1.9 mmoli; 0.9 eq) sono disciolti in 10 ml di una miscela 1:1 DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e a questa soluzione sono aggiunti a 0°C 896 mg di Fmoc-Lys-OH cloridrato (**1**) (2 mmoli) disciolti in 6 ml di una miscela 1:1 DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> contenente 0.34 ml di DPEA (258 mg; 2 mmoli; 0.95 eq) e si controlla il pH della reazione che deve essere basico. La reazione viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight. Si evapora il solvente a secchezza. Il composto è precipitato in acqua acida (HCl 1N). Il solido bianco ottenuto è lavato con etere etilico.

Caratteristiche del composto (**7**):

**Resa:** 89%

**[MH<sup>+</sup>]:** 635.6

**P.f.:** 136-140°C

**[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** +1.87 (c=1, THF)

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 12.5 (sb, 1H), 7.9 (d, 2H), 7.3-7.75 (m, 8H), 4.25 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH), 4.2 (m, 1H), 3.9 (m, 2H), 2 (m, 2H), 1.15-1.75 (m, 38H), 0.9 (t, 3H).

#### **Sintesi di Z-Ser-OH (8)**

11.55 g di H-Ser-OH (110 mmoli) sono disciolti in una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:NaHCO<sub>3</sub> 1:1 (500 ml); alla soluzione ottenuta si aggiungono 14.1 ml di benzilcloroformiato (17.06 g; 100 mmoli; 0.9 eq). La reazione è mantenuta in agitazione overnight a temperatura ambiente. Le fasi vengono separate e la fase acquosa è estratta 3X50 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e poi acidificata con HCl 37% e riestratta con 4X120 ml di EtOAc. Si evapora il solvente a secchezza. Il composto è cristallizzato da una miscela Et<sub>2</sub>O:EtP (1:9).

Caratteristiche del composto (**8**):

**Resa:** 53%

**[MH<sup>+</sup>]:** 240.0

**P.f.:** 115-120°C

**R.f (B1):** 0.65

**t<sub>r</sub>:** 13.84

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 13.0 (sb, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.19 (s, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.06 (m, 1H), 3.65 (m, 2H), 2.08 (s, 1H).

### **Sintesi di Z-Ser-OBzl (10)**

1000 mg di Z-Ser-OH (4.16 mmoli) sono sciolti in 20 ml di acetone a cui vengono aggiunti 1.4 ml di DPEA (8.32 mmoli; 2 eq) e 0.9 ml di benzilbromuro (8.32 mmoli; 2 eq). La reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente overnight.

L'acetone è evaporato a secchezza ed il solido ottenuto è disciolto in 60 ml di acetato d'etile. La fase organica è estratta 3X20 ml di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e neutralizzata con brine.

La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporata a secchezza. Il prodotto cristallizza da una miscela Et<sub>2</sub>O/EtPt 1:1 come solido bianco.

Caratteristiche del composto (10):

**Resa:** 61%

**[MH<sup>+</sup>]:** 330.1

**P.f:** 82-85°C

**R.f (B3):** 0.84

**t<sub>r</sub>:** 18.96

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm)= 7.34 (s, 10H), 7.26 (s, 1H), 5.21 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.5 (m, 1H), 4.0 (m, 2H), 2.15 (m, 1H).

### **Sintesi di Z-Ser-[ $\beta$ -D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OBzl (12)**

2.27 g di 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosio (6.32 mmoli; 2 eq) sono disciolti in circa 10 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro sotto agitazione a 0°C. Alla soluzione si aggiunge Z-Ser-OBzl (1.00 g; 3.16 mmoli) e 6.37 ml di BF<sub>3</sub> eterato 48% goccia a goccia (27.1 mmoli, 10 eq). La reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight. La fase organica è lavata con 100 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata e la fase acquosa ottenuta a sua volta viene estratta con 2X30 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le fasi organiche vengono riunite e si lavano 3X40 ml di NaHCO<sub>3</sub> 2,5% e 2X40 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata.

La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporata a secchezza. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice utilizzando come fase eluente una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (9.5:0.5). Si ottiene un olio bianco.

Caratteristiche del composto (**12**):

**Resa:** 92%

**[MH<sup>+</sup>]:** 660.2

**P.f:** olio

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$  (ppm)= 8.00 (s, 1H), 7.19 (s, 10H), 5.34 (s, 4H), 5.54 (m, 1H), 5.25 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.34 (m, 2H), 4.11 (m, 2H), 2.01 (s, 12H).

#### **Sintesi di H-Ser-[ $\beta$ -D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OH (14)**

1.64 g Z-Thr-[ $\beta$ -D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OBzl (2.49 mmoli) solubilizzati in MeOH (25 ml) e acido acetico glaciale (2 ml) sono idrogenati in presenza di C/Pd 5% per 20h a t.a. Il catalizzatore è eliminato per filtrazione e il solvente allontanato per evaporazione. Si ottiene un solido bianco.

Caratteristiche del composto (**14**):

**Resa:** quantitativa

**[MH<sup>+</sup>]:** 436.1

**P.f:** 192-201°C

**R.f. (B1):** 0.33

#### **Sintesi di Fmoc-Ser-[ $\beta$ -D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OH (16)**

435 mg H-Ser-[ $\beta$ -D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OBzl (1 mmole) sono disciolti in circa 5 ml di NaHCO<sub>3</sub> 0,22 M e la reazione è portata a 0°C; 258 mg di Fmoc-Cl (1 mmole; 1eq) sono solubilizzati a parte in 8 ml di acetone e sono portati a 0°C. La soluzione contenente Fmoc-Cl viene poi aggiunta goccia a goccia all'ambiente di reazione che è mantenuto a 0°C per 2 ore e poi la reazione è lasciata a temperatura ambiente overnight. Il pH della reazione è mantenuto 7-8 tramite aggiunte di NaHCO<sub>3</sub> 5%.

Si acidifica l'ambiente di reazione con CH<sub>3</sub>COOH glaciale e si evapora la fase organica. La fase acquosa rimanente è estratta 4X50 ml di acetato d'etile ed in seguito con 3X25 ml di brine.

L'acetato d'etile è anidrificato con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e poi evaporato a secchezza. L'olio ottenuto è cristallizzato overnight in miscela Et<sub>2</sub>O:EtPt 1:9. Si ottiene un solido bianco.

Caratteristiche del composto **(16)**:

**Resa:** 16%

**[MH<sup>+</sup>]:** 658.1

**t<sub>r</sub>:** 23.25

**R.f. (B1):** 0.76

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 11.0 (sb, 1H), 8.0 (s, 1H), 7.84-7.28 (m, 8H), 5.54 (d, 1H), 5.25 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.70 (d, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.46 (t, 1H), 4.09 (d, 2H), 3.96 (m, 1H), 2.01 (s, 12H), 1.21 (d, 3H).

### **Sintesi di Z-Thr-OH (9)**

13.10 g di H-Thr-OH (110 mmoli) sono disciolti in una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:NaHCO<sub>3</sub> 1 N 1:1 (500 ml); alla soluzione ottenuta si aggiungono 14.1 ml di benzilcloroformiato (17.06 g; 100 mmoli; 0.9 eq). La reazione è mantenuta in agitazione overnight a temperatura ambiente. Le fasi vengono separate e la fase acquosa è estratta 3X50 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e poi acidificata con HCl 37% e riestratta con 4X120 ml di EtOAc. Si evapora il solvente a secchezza. Si ottiene un olio bianco.

Caratteristiche del composto **(9)**:

**Resa:** 72%

**[MH<sup>+</sup>]:** 254.3

**R.f (B1):** 0.66

**t<sub>r</sub>:** 8.75

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO), δ (ppm)= 13.0 (sb, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.19 (s, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.54 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 2.08 (s, 1H), 1.21 (d, 3H).

### **Sintesi di Z-Thr-OBzl (11)**

1.00 g di Z-Thr-OH (3.95 mmoli) sono sciolti in 20 ml di acetone a cui vengono aggiunti 1.6 ml di DPEA (7.9 mmoli; 2 eq) e 0.9 ml di benzilbromuro (7.9 mmoli; 2 eq). la reazione viene lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente overnight.

L'acetone è evaporato a secchezza ed il solido ottenuto è disciolto in 60 ml di acetato d'etile. La fase organica è estratta 3X20 ml di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e neutralizzata con brine.

La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporata a secchezza. Il prodotto cristallizza da una miscela Et<sub>2</sub>O/EtPt 1:1 come solido bianco.

Caratteristiche del composto **(11)**:

**Resa:** 53%

**[MH<sup>+</sup>]:** 344.3

**P.f:** 78-80°C

**[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>:** -3,42 (c=1, THF)

**t<sub>r</sub>:** 18.08

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm)= 7.3 (m, 10H), 5.6 (d, 1H), 5.19 (d, 2H), 5.12 (d, 2H), 4.3 (m, 2H), 2 (s, 1H), 1.2 (d, 3H).

### **Sintesi di Z-Thr-[β-D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OBzl (13)**

2.26 g di 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil-β-D-glucopiranosio (5.80 mmoli; 2 eq) sono disciolti in circa 10 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro sotto agitazione a 0°C. Alla soluzione si aggiunge Z-Thr-OBzl (1.00 g; 2.90 mmoli) e 8.56 ml di BF<sub>3</sub> eterato 48% goccia a goccia (29.0 mmoli; 10 eq). La reazione è lasciata in agitazione a temperatura ambiente overnight. La fase organica è lavata con 100 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata e la fase acquosa ottenuta a sua volta viene estratta con 2X30 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Le e fasi organiche vengono riunite e si lavano 3X40 ml di NaHCO<sub>3</sub> 2,5% e 2X40 ml di H<sub>2</sub>O deionizzata.

La fase organica è anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporata a secchezza. Il grezzo ottenuto è stato purificato su colonna di gel di silice utilizzando come fase eluente una miscela CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub> (9.5:0.5). Si ottiene un olio bianco.

Caratteristiche del composto **(13)**:



**Resa:** 65%

**[MH<sup>+</sup>]:** 674.8

**P.f:** olio

**t<sub>r</sub>:** 21.44

**<sup>1</sup>H-NMR:** (CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm)= 8.00 (s, 1H), 7.19 (s, 10H), 5.34 (s, 4H), 5.54 (m, 1H), 5.25 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.34 (m, 2H), 4.11 (m, 1H), 2.01 (s, 12H), 1.20 (d, 3H).

### **Sintesi di H-Thr-[β-D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OH (15)**

1.64 g Z-Thr-[β-D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OBzl (2.49 mmoli) solubilizzati in MeOH (25 ml) e acido acetico glaciale (2 ml) sono idrogenati in presenza di C/Pd 5% per 20h a t.a. Il catalizzatore è eliminato per filtrazione e il solvente allontanato per evaporazione. Si ottiene un solido bianco.

Caratteristiche del composto **(15)**:

**Resa:** quantitativa

**[MH<sup>+</sup>]:** 450.5

**P.f:** 153-155°C

**R.f. (B1):** 0.52

### **Sintesi di Fmoc-Thr-[β-D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OH (17)**

4.18 g H-Thr-[β-D-Glc(OAc<sub>4</sub>)]-OBzl (9.30 mmoli) sono disciolti in circa 50 ml di NaHCO<sub>3</sub> 0.22 M e la reazione è portata a 0°C; 2.40 mg di Fmoc-Cl (9.30 mmole; 1eq) sono solubilizzati a parte in 25 ml di acetone e sono portati a 0°C. La soluzione contenente Fmoc-Cl viene poi aggiunta goccia a goccia all'ambiente di reazione che è mantenuto a 0°C per 2 ore e poi la reazione è lasciata a temperatura ambiente overnight. Il pH della reazione è mantenuto 7-8 tramite aggiunte di NaHCO<sub>3</sub> 5%.

Si acidifica l'ambiente di reazione con CH<sub>3</sub>COOH glaciale e si evapora la fase organica. La fase acquosa rimanente è estratta 4X50 ml di acetato d'etile ed in seguito con 3X25 ml di brine.

L'acetato d'etile è anidrificato con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e poi evaporato a secchezza. L'olio ottenuto è cristallizzato overnight in miscela  $\text{Et}_2\text{O}:\text{EtPt}$  1:9. Si ottiene un solido bianco.

Caratteristiche del composto (**17**):

**Resa:** 13%

**[MH<sup>+</sup>]:** 672.9

**P.f.:** 126-131°C

**t<sub>r</sub>:** 16.18

**R.f. (B1):** 0.81

**<sup>1</sup>H-NMR:** (DMSO),  $\delta$  (ppm)= 11.0 (sb, 1H), 8.0 (s, 1H), 7.84-7.28 (m, 8H), 5.54 (d, 1H), 5.25 (m, 1H), 4.98 (m, 1H), 4.78 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.70 (d, 2H), 4.65 (m, 1H), 4.46 (t, 1H), 4.09 (d, 2H), 3.98 (m, 2H), 2.01 (s, 12H).

## BIBLIOGRAFIA

- [1]. Meunier, J.C., Mollerau, C., Toll, L., Saudeau, C., Moisand, C., Alvinerie, P., Butour, J.L., Guillemot, J.C., Ferrara, P., Monserrat, B., Marzaguil, H., Vassart, G., Parmentier, M., Costentin, J. (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of the opioid receptor-like ORL<sub>1</sub> receptor. *Nature*, 377, 532-535.
  
- [2]. Engelman, D.M., Zaccari, G. (1980). Bacteriorhodopsin is an inside-out protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 77 (10), 5894-5898.
  
- [3]. Bröer, B.M., Gurrath, M., Höltje, H. (2003). Molecular modeling studies on the ORL1-receptor and ORL1-agonists. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 17, 739-754.
  
- [4]. Calò, G., Guerrini, R., Rizzi, A., Salvadori, S., Regoli, D. (2000). *Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. British Journal of Pharmacology*, 129, 1261-1283.
  
- [5]. Mollerau, C., Parmentier, M., Mailleux, P., Butour, J.L., Moisand, C., Chalon, P., Caput, D., Vassart, G., Meunier, J.C. (1994). ORL<sub>1</sub>, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Letters*, 341, 33-38.
  
- [6]. Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourso, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzon, J.R., Grandi, D.K., Langen, H., Monsma, F.J., Civelli, O. (1995). Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioid like G protein-coupled receptor. *Science*, 270, 792-794.
  
- [7]. Mollerau, C., Simons, M.J., Soularue, P., Liners, F., Vassart, G., Meunier, J.C., Parmentier, M. (1996). Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 93, 8666-8670.
  
- [8]. Houtani, T., Nishi, M., Takeshima, H., Nukada, T., Sugimoto, T. (1996). Structure and regional distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 219, 714-719.

- [9]. Nothacker, H.P., Reinscheid, R.K., Mansour, A., Henningsen, R.A., Ardati, A., Monsma, F.J., Watson, S.J., Civelli, O. (1996). Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 93, 8677-8682.
- [10]. Okuda-Ashikata, E., Minami, T., Tachibana, S., Yoshihara, Y., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Ito, S. (1998). Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature*, 392, 286-289.
- [11]. Rossi, G.C., Mathis, J.P., Pasternak, G.W. (1998). Analgesic activity of orphanin FQ2, murine prepro-orphanine in mice. *Neuroreport*, 9, 1165-1168.
- [12]. Portoghese, P.S. (1989). Bivalent ligands and the message-address concept in the design of selective opioid receptor antagonists. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10, 230-235.
- [13]. Calò, G., Rizzi, A., Bodin, M., Neugebauer, W., Salvadori, S., Guerrini, R., Bianchi, C., Regoli, D. (1997). Pharmacological characterization of nociceptin receptor: an in vitro study. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75, 713-718.
- [14]. Salvadori, S., Guerrini, Remo., Calò, Girolamo., Regoli, Domenico. (1999). Structure-activity studies on nociceptin/orphanin FQ: from full agonist, to partial agonist, to pure antagonist. *Il Farmaco*, 54, 810-825.
- [15]. Calò, G., Guerrini, R., Bigoni, R., Rizzi, A., Bianchi, C., Regoli, D., Salvadori, S. (1998). Structure-activity study of the Nociceptin(1-13)-NH<sub>2</sub> N-terminal tetrapeptide and discovery of a nociceptin receptor antagonist. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41, 3360-3366.
- [16]. Mogil, J.S., Grisel, J.E., Reinscheid, R.K., Civelli, O., Belknap, J.K., Grandy, D.K. (1996). Orphanin FQ is a functional anti-opioid peptide. *Neuroscience*, 75, 333-337.
- [17]. Bertorelli, R., Citterio, F., Tupper, J., Ongini, E. (1999). Further analysis of nociceptin and derivatives following intratecal administration in mice. *Regulatory Peptides*, 80, 122.
- [18]. Zgodzinski, W., Rubaj, A., Gustaw, K., Sieklucka-Dziuba, M., Kleinrok, Z. (1999). Anticonvulsant effects of orphanin FQ receptor ligands. *In International Narcotics Research Conference. Saratoga Springs, NY, July 10-15.*

- [19]. Jenck, F., Moreau, J.L., Martin, J.R., Kilpatrick G.J., Reinscheid, R.K., Monsma, F.J., Nothacker, H.P., Civelli, O. (1997). Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 94, 14854-14858.
- [20]. Marti, M., Mela, F., Veronesi, C., Guerrini, R., Salvadori, S., Federici, M., Mercuri, N.B., Rizzi, A., Franchi, G., Beani, L., Bianchi, C., Morari, M. (2004). Blockade of nociceptin/orphanin FQ receptor signaling in rat substantia nigra pars reticulata stimulates nigrostriatal dopaminergic transmission and motor behavior. *The Journal of Neuroscience*, 24 (30), 6659-6666.
- [21]. Lezzeri, M., Calò, G., Spinelli, M., Guerrini, R., Beneforti, P., Sandri, S., Zanollo, A., Regoli, D., Turini, D. (2001). Urodynamic and clinical evidence of acute inhibitory effects of intravesical nociceptin/orphanin FQ on detrusor overactivity in humans: a pilot study. *The Journal of Urology*, 166, 2237-2240.
- [22]. Begley, D.J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics*, 104, 29-45.
- [23]. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (1997). Experimental and computational approach to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23, 3-25.
- [24]. Roques, B.P., Lucas-Soroca, E., Chaillet, P., Costentin, J., Fournie-Zaluski M.C. (1980). The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature*, 288, 286-288.
- [25]. Lecomte, J.M., Costentin, J., Vlaiculescu, A., Chaillet, P., Marcais-Collado, H., Llorens-Cortes, C., Leboyer, M., Schwartz, J.C. (1986). Pharmacological properties of acetopharn, a parenterally active "enkephalinase" inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237, 937-944.
- [26]. Lambert, S.M., Mergen, F., Poupaert, J.H., Dumont, P. Analgesic potency of S-acetylthiorphan after intravenous administration to mice. (1993). *Eur. J. Pharmacol.*, 243, 129-134.
- [27]. Pardridge, W.M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2, 3-14.

- [28]. Pavan, B., Dalpiaz, A., Ciliberti, N., Biondi, C., Manfredini, S., Vertuani, S. (2008). Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach. *Molecules*, 13, 1035-1065.
- [29]. Pardridge, W.M., Olendorf, W.H. (1975). Kinetics of blood-brain barrier transport of hexoses. *Biochim. Biophys. Acta*, 382, 377-392.
- [30]. Bilsky, E.J., Eggleton, R.D., Mitchell, S.A., Palian, M.M., Davis, P., Huber, J.D., Jones, H.; Yamamura, H.I., Janders, J., Davis, T.P., Porreca, F., Hruby, V.J., Polt, R. (2000). Enkephalin glycopeptide analogues produce analgesia with reduced dependence liability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2586-2590.
- [31]. Bikel, U., Yoshikawa, T., Pardridge, W.M. (2001). Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 247-279.
- [32]. Guerrini, R., Calò, G., Rizzi, A., Bianchi, C., Lazarus, L. H., Salvadori, S., Temussi P. A., Regoli, D. (1997). Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure- activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 1789-1793.
- [33]. Calò, G., Bigoni, R., Rizzi, A., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D. (2000). Nociceptin/orphanin FQ receptor ligands. *Peptides*, 21, 935-947.
- [34]. Deshayes, S., Morris, M.C., Divita, G., Heitz, F. (2005). Cell-penetrating peptides tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 1839-1849.
- [35]. Wagstaff, K.M., Jans, D.A. (2006). Protein-transduction: Cell-penetrating peptides and their therapeutic applications. *Current medicinal Chemistry*, 13, 1371-1387.
- [36]. Chekonin, V.P., Kabanov, A.V., Zhirkov, Y.A., Morozov, G.V. (1991). Fatty acid acylated Fab-fragments of antibodies to neurospecific proteins as carriers for neuroleptic targeted delivery in brain. *FEBS Letters*, 287, 149-152.
- [37]. Polt, R., Dhanasekaran, M., Keyari, C.M. (2005). Glycosylated neuropeptides: a new vista for neuropsychopharmacology?. *Medicinal Research Reviews*, 25 (5), 557-585.

- [38]. Costantino, L., Gandolfi, F., Tosi, G., Rivasi, F., Vandelli, M.A., Forni, F. (2005). Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the bloo-brain barrier. *Journal of controlled release*, 108, 84-96.
- [39]. Tosi, G., Costantino, L., Rivasi, F., Ruozi, B., Leo, E., Vergoni, A.V., Tacchi, R., Bertolini, A., Vandelli, M.A., Forni, F. (2007). Targeting the central nervous system: in vivo experiments with peptide-derivatized nanoparticles loaded with loperamide and rhodamine-123. *Journal of controlled release*, 122, 1-9.
- [40]. Egleton, R.D, Bilsky, E.J., Tollin, G., Dhanasekaran M., Lowery, J., Alves, I., Davis, P., Porreca, F., Yamamura, H.I., Yeomans, L., Keyari, C.M., Polt, R. (2005). Biosian glycopeptides penetrate the blood-brain barrier. *Tetrahedron Asymmetry*, 16, 65-75.
- [41]. Filira, F., Biondi, L., Cavaggion, F., Scolaro, B., Rocchi, R. (1990). Synthesis of *O*-glycosylated tuftins by utilizing threonine derivatives containing an unprotected monosaccharide moiety. *International Journal of peptide and Protein Research*, 36, 86-96.
- [42]. Lapidot, Y., Rappoport, S., Wolman, Y. (1967). Use of esters of N-hydroxysuccinimide in the synthesys of N-acylamino acids. *Journal of Lipid Research*, 8, 142-145.

## ABBREVIAZIONI

<b>Abu</b>	$\alpha$ -Amino butirrico acido
<b>AcOEt o EtOAc</b>	acetato d'etile
<b>Acm</b>	Acetamido
<b>Aib</b>	Acido aminoisobutirrico
<b>Aic</b>	Acido 2-aminoindano-2-carbossilico
<b>Atc</b>	Acido 2-amino-tetralino-2-carbossilico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>Bip</b>	$\beta$ -4-biphenylAla
<b>Boc</b>	Terbutilossicarbonile
<b>Bzl</b>	Benzile
<b>cAMP</b>	Ciclico adenosina monofosfato
<b>Cha</b>	Cicloesilalanina
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	Acetonitrile
<b>CHO</b>	Chinese hamster ovary
<b>Dab</b>	2,4-diamino butirrico acido
<b>Dap</b>	2,3-diamino propionico acido
<b>Dip</b>	$\beta$ -phenylPhe o 3,3-diphenyl-Ala
<b>DCM</b>	Cloruro di metilene



<b>DIPCDI</b>	Diisopropilcarbodiimide
<b>DIPEA o DPEA</b>	Diisopropiletilammina
<b>DMF</b>	N,N-dimetilformamide
<b>Etere o Et<sub>2</sub>O</b>	Etere etilico
<b>EtPt</b>	Etere di petrolio
<b>Et<sub>3</sub>SiH</b>	Trietilsilano
<b>Fluo-4AM</b>	Fluo-4-acetossimetil estere
<b>Fmoc</b>	9-fluorenilmetilossicarbonile
<b>GDP</b>	Guanosina difosfato
<b>GPCR</b>	G protein coupled receptor
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>HEK</b>	Human embrionic kidney
<b>HOBt</b>	1-H-Idrossibenzotriazolo
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography
<b>i.c.v</b>	intracerebroventricularly
<b>mRNA</b>	Messenger ribonucleic acid
<b>Ndm</b>	(3-dimetilcarbamoil)-2-amino propanoico acido
<b>NMM</b>	4-Methyl morpholine
<b>Nmm</b>	(3-metilcarbamoil)-2-amino propanoico acido
<b>NMR</b>	Risonanza magnetica nucleare
<b>Nal</b>	Naftilalanina

<b>NPS</b>	Neuropeptide S
<b>NPSR</b>	Neuropeptide S receptor
<b>Nva</b>	Norvalina
<b>OtBu</b>	Terbutilestere
<b>Ova</b>	2-amino-4oxo-pentanoico acido
<b>Pal</b>	Piridilalanina
<b>P.f</b>	Punto di fusione
<b>Phg</b>	Fenilglicina
<b>Pmc</b>	2, 2, 5, 7, 8- pentametilcromano- 6-sulfonile
<b>ppNPS</b>	Proteina precursore del Neuropeptide S
<b>ppN/OFQ</b>	Prepronocicettina
<b>R.f</b>	Ratio Front
<b>SAR</b>	Structure-activity relationship
<b>tBu</b>	Terburiletere
<b>TEA</b>	Trietilammina
<b>THF</b>	Tetraidrofurano
<b>TFA</b>	Acido trifluoroacetico
<b>Tic</b>	Acido 1,2,3,4-tetraidroisochinolinico
<b>Tos</b>	Tosile
<b>Trt</b>	Trifenilmetile
<b>WSC</b>	1-etil-(3-dimetil-amino-propil)-carbodiimmide cloridrato

## PUBBLICAZIONI

[1]. [A new opioid designed multiple ligand derived from the  \$\mu\$  opioid agonist endomorphin-2 and the  \$\delta\$  opioid antagonist pharmacophore Dmt-Tic.](#)

Salvadori S., Trapella C., Fiorini S., Negri L., Lattanti R., Bryant SD., Jinsmaa Y., Lazarus LH., Balboni G..

*Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, 15(22), 6876-81.

[2]. [Role of benzoimidazole \(Bid\) in the d-opioid agonist pseudopeptide H-Dmt-Tic-NH-CH<sub>2</sub>-Bid \(UFP-502\).](#)

Salvadori S., Fiorini S., Trapella C., Porreca F., Davis P., Sasaki Y., Ambo A., Marczak ED., Lazarus LH., Balboni G..

*Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16(6), 3032-8.

[3]. [Synthesis and biological activity of human neuropeptide S analogues modified in position 2.](#)

Camarda V., Trapella C., Calò G., Guerrini R., Rizzi A., Ruzza C., Fiorini S., Marzola E., Reinscheid RK., Regoli D., Salvadori S..

*J. Med. Chem.*, **2008**, 51(3), 655-8.

[4]. [Vinyl ester-based cyclic peptide proteasome inhibitors.](#)

Baldisserotto A., Marastoni M., Fiorini S., Pretto L., Ferretti V., Gavioli R., Tomatis R..

*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18(6), 1849-54.

[5]. [Further studies on lead compounds containing the opioid pharmacophore Dmt-Tic.](#)

Balboni G., Fiorini S., Baldisserotto A., Trapella C., Porreca F., Sasaki Y., Ambo A., Marczak ED., Lazarus LH., Salvadori S..

*J. Med. Chem.*, **2008**, 51(16), 5109-17.

[6]. [Structure-activity study at position 3 and 4 of human neuropeptide S.](#)

Camarda V., Trapella C., Calò G., Guerrini R., Rizzi A., Ruzza C., [Fiorini S.](#), Marzola E., Reinscheid RK., Regoli D., Salvadori S..

*Bioorg. Med. Chem.*, **2008**, 16(19), 8841-5.

[7]. [Synthesis and biological activity of human neuropeptide S analogues modified in position 5: identification of potent and pure neuropeptide S receptor antagonists.](#)

Guerrini R., Camarda V., Trapella C., Calò G., Rizzi A., Ruzza C., [Fiorini S.](#), Marzola E., Reinscheid RK., Regoli D., Salvadori S..

*J. Med. Chem.*, **2009**, 52(2), 524-9.