

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA**



**FACOLTÀ DI FARMACIA**

*Corso di Laurea Specialistica in Farmacia*

**Tesi di Laurea:**

**SUBSTRATI, INIBITORI E ATTIVATORI DELLA  
GLICOPROTEINA P: PROGETTAZIONE E SINTESI DI NUOVI  
DERIVATI A STRUTTURA STILBENICA PER LA PREVENZIONE E  
IL TRATTAMENTO DELLE PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE**

**Relatore:**

*Chiar.ma Prof.ssa Simona Rapposelli*

**Candidata:**

*Alice Mariotti*

**ANNO ACCADEMICO 2010/2011**

**Alla mia grande famiglia**

# **INTRODUZIONE GENERALE**

## IL TRASPORTO DI FARMACI PER MEZZO DEI TRASPORTATORI

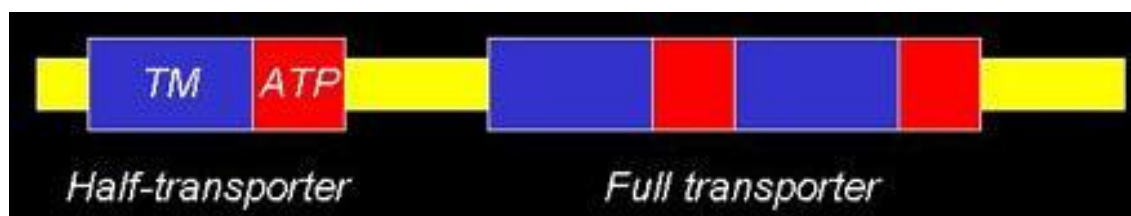
### ABC

I farmaci vengono trasportati all'interno e all'esterno della cellula prevalentemente per mezzo di carriers appartenenti ad una superfamiglia di proteine transmembranal ATP-dipendenti, detta *ATP-binding cassette* (ABC).

Il trasporto per mezzo delle proteine ABC è unidirezionale e avviene dal citoplasma al liquido extracellulare o ad un compartimento intracellulare, come il reticolo endoplasmatico, i mitocondri o i perossisomi. Il principale ruolo fisiologico di tali trasportatori sembra consistere nella protezione dell'organismo dagli xenobiotici, e si basa sul loro trasferimento fuori dalle cellule per facilitarne l'escrezione tramite urina e/o bile.

Le proteine ABC sono caratterizzate da siti di legame intracellulari per l'ATP.

Attualmente si ritiene che i geni che codificano per i trasportatori ABC siano 49, raggruppati in 7 famiglie principali (ABCA-ABCG). [1]

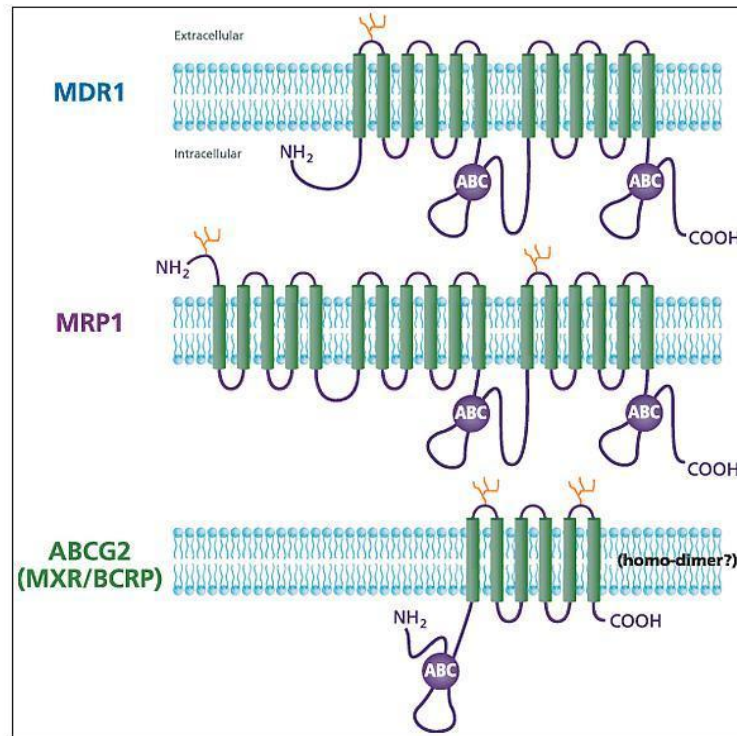


**Figura 1:** Struttura del gene ABC

Ciascun gene possiede un dominio altamente conservato del nucleotide, contenente due motivi strutturali dominanti, Walker A e Walker B, tipici di proteine ATPasi/Elicasi; queste ultime impiegano l'idrolisi di ATP come fonte di energia per il trasporto di substrati contro gradiente di concentrazione. A svariati membri di questa superfamiglia è attribuito un ruolo importante nell'evoluzione di alcune patologie. [2]

In base al gene, i trasportatori ABC si possono classificare in tre classi principali:

- Glicoproteina P (ABCB)
- MRP (Multidrug Resistance associated protein) (ABCC)
- BCRP (breast cancer resistance protein) (ABCG2)



**Figura 2:** Struttura a livello di membrana dei principali trasportatori ABC

Il trasportatore ABC di maggior interesse farmacologico è la glicoproteina P, solitamente indicata come ABCB1 o MDR1 o P-gp. Questo trasportatore risulta essere associato ad un'alterata permeabilità della membrana ai farmaci. [3]

La glicoproteina P è una flippasi, cioè favorisce il passaggio della molecola dallo strato fosfolipidico interno a quello esterno, attraverso il consumo di 2 molecole di ATP. Essa non trasporta sostanze endogene, ma soltanto xenobiotici aventi come caratteristiche una struttura planare, un peso molecolare superiore a 500 Dalton, un'elevata idrofobicità o anfipaticità ed eventualmente un azoto basico. [4]

Le proteine MRP sono omologhe strutturali della glicoproteina P, dalla quale differiscono per un peso molecolare maggiore (190 kDa invece che 170 kDa) e per la presenza di tre domini transmembrana. Ad oggi sono state individuate nove isoforme di MRP, di cui sette localizzate nell'epatocita, ciascuna coinvolta nel trasporto di alcune sostanze endogene tra cui il leucotriene C<sub>4</sub> e il glutatione e di vari xenobiotici contraddistinti da elevato peso molecolare e caratteristiche acide. [5]

Le proteine MRP2, localizzate nella membrana apicale di fegato, rene, intestino e placenta, hanno come funzione principale l'escrezione della bilirubina coniugata nella bile; l'assenza

di MRP2 è causa della sindrome di Dubin-Johnson, una patologia genetica caratterizzata da un elevato tasso ematico di bilirubina coniugata. [6]

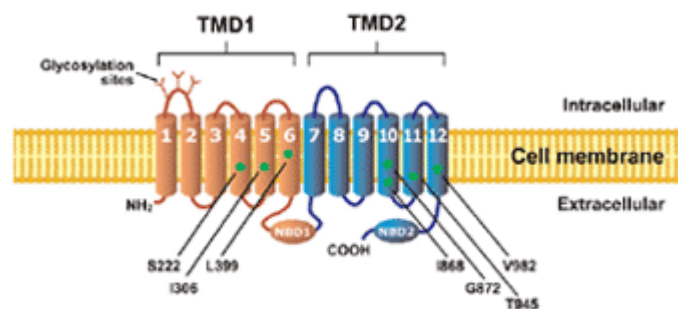
Inoltre l'MRP2 trasporta nella bile numerose sostanze acide o coniugate con acidi (glucuronico, solforico, glutatione) e partecipa all'escrezione di anioni organici nel lume tubulare del rene.

La BCPR, localizzata nel fegato, nell'intestino e nella barriera emato-encefalica, è una proteina ABC strutturalmente simile a MDR1 e MRP2; è capace di trasportare substrati neutri e carichi negativamente, tra cui composti citotossici come il metotrexato, farmaci solfoconiugati ed ormoni quali gli estrogeni solforati. [7]

## STUTTURA DELLA GLICOPROTEINA P

La P-gp è una glicoproteina che viene codificata dal gene ABCB1, dislocato sul cromosoma 7; ha peso molecolare di circa 170 Kda, e la sua struttura principale è composta da 1280 amminoacidi organizzati in due regioni ripetute di 610 aa ciascuna legate da un linker di 60 aa. [8]

Da molti studi si evince che le prime due regioni sono strutturalmente omologhe: entrambe sono costituite da un dominio transmembrana detto TMD, caratterizzato da 6  $\alpha$ -eliche, una porzione N-terminale idrofila, un dominio di legame per l'ATP (chiamato NBD: *Nucleotide Binding Domain*) e tre porzioni C-terminali intracellulari idrofile, che collegano i TMD agli NBD; si ritiene che il TMD rappresenti il principale sito di interazione per i farmaci.



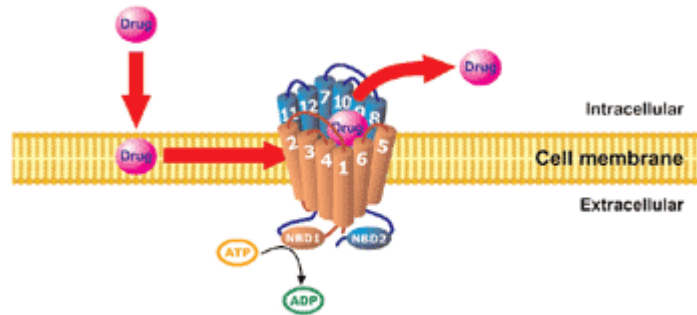
**Figura 3:** Struttura planare di una glicoproteina P

I 12 domini transmembrana sono responsabili della formazione del canale, avente un diametro di 5 nm ed un'altezza di 8 nm.

La P-gp è una proteina di trasporto ATP-dipendente che presenta un'attività ATPasica basale anche in assenza di substrato.

Studi di binding hanno dimostrato che l'ATP non è necessario per il legame del farmaco con la glicoproteina, mentre il legame e la successiva idrolisi dell'ATP sono essenziali per il trasporto del farmaco. [9]

Attualmente i meccanismi di trasporto degli xenobiotici attraverso la P-gp non sono ancora del tutto noti, proprio a causa delle insufficienti informazioni riguardo la struttura della proteina stessa, anche se molteplici studi di fotoaffinità, mutagenesi, labeling e cross-linking hanno consentito di identificare i residui coinvolti nel legame con il substrato.



**Figura 4:** Trasporto di un substrato tramite la P-gp

Questi studi suggeriscono che i segmenti transmembrana 4, 5 e 6 del primo dominio idrofobico e i segmenti 10, 11 e 12 del secondo sono coinvolti direttamente nel trasporto. [10]

La conformazione dei segmenti TMD e del sito di legame è variabile, quindi consente il legame di substrati strutturalmente diversi.

Il modello preso come riferimento per ipotizzare la struttura della P-gp è una proteina batterica omologa ottenuta dagli E.Coli, la MsbA, la cui struttura è stata analizzata tramite studi di molecular modeling. Questa proteina funziona come trasportatore di lipidi e sembra essere strutturalmente e funzionalmente molto simile alla P-gp umana, quindi il modello ottenuto dalla sua struttura cristallina ha permesso di individuare le interazioni fra TMD (dominio transmembranale) e NBD (dominio di legame con il nucleotide).

Le differenze principali tra il modello ottenuto dall'E.Coli e la P-gp sono le dimensioni del poro, la carica interna e la diversa specificità per la proteina batterica rispetto a quella umana.

Infine, misurando la distanza tra i domini transmembrana TMD6 e TMD1 di MsbA e paragonandola con i dati inerenti la P-gp, è stata confermata l'ipotesi dell'esistenza di due isoforme della P-gp: una forma aperta, paragonabile alla struttura cristallina della MsbA, ed una chiusa. [10]



Meccanismo d'azione

I farmaci agiscono in virtù della loro capacità di attraversare le barriere per raggiungere il proprio sito bersaglio. Mentre i farmaci lipofili diffondono passivamente attraverso le membrane plasmatiche, quelli idrofili richiedono meccanismi di trasporto specifici.

La quantità di farmaco che effettivamente raggiunge il proprio sito d'azione dipende poi dalla presenza di sistemi di efflusso nelle membrane, che ne promuovono l'espulsione.

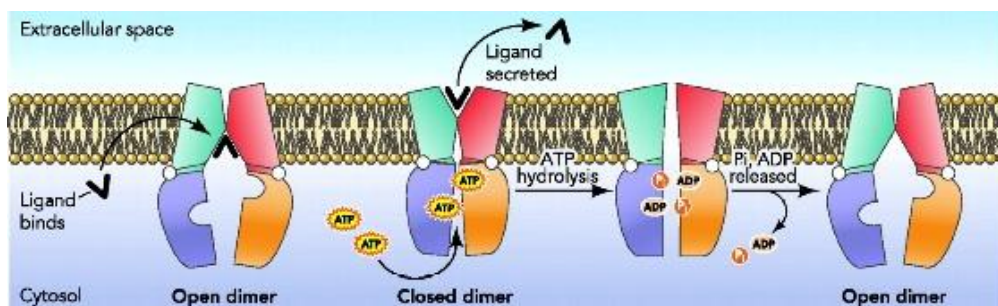
La glicoproteina P trasporta attivamente i farmaci fuori dalla cellula in modo unidirezionale ed utilizzando l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP.

Esistono due possibili meccanismi d'azione della glicoproteina P:

- **Modello a flippasi:** la P-gp agisce prevalentemente come “flippasi”, che trasferisce molecole organiche con peso molecolare compreso tra 200 e 1900 Dalton da una parte all'altra del doppio strato fosfolipidico; il meccanismo di trasporto comprende il legame del substrato ai due domini TMD e due idrolisi non simultanee di ATP. [11]

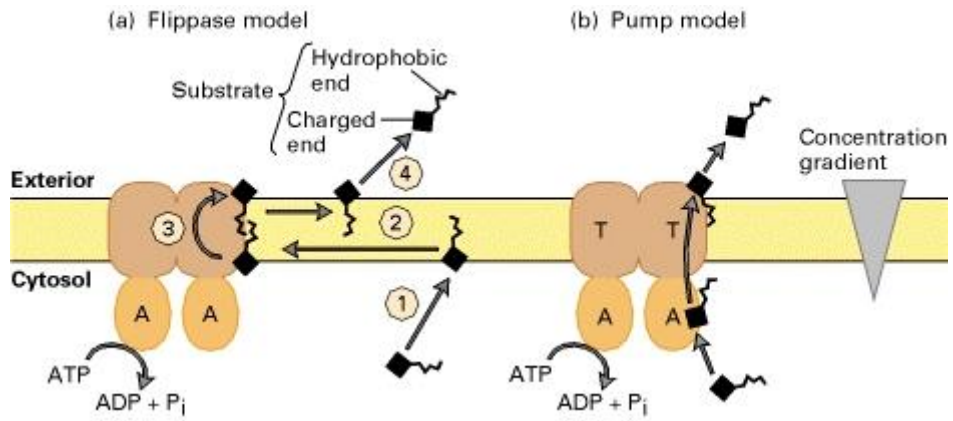
Il legame di un substrato attiva uno dei domini di legame con l'ATP, e l'idrolisi determina un cambiamento conformazionale nella struttura della P-gp, che porta all'efflusso del substrato stesso fuori dalla cellula. [12]

L'idrolisi della seconda molecola di ATP è necessaria per ristabilire la conformazione del trasportatore al suo stato originario. [13].



**Figura 5:** meccanismo d'azione della glicoproteina P

- **Modello a pompa:** il trasporto avviene attraverso una sorta di canale costituito dal ripiegamento di una o più subunità della proteina nello spessore della membrana. L'energia fornita dall'idrolisi dell'ATP è utilizzata per traslocare le molecole dall'ambiente idrofobico della membrana cellulare all'interno del canale proteico, attraverso cui queste diffondono nel mezzo extracellulare.



**Figura 6:** Meccanismi d'azione della P-gp: (a) modello a flippasi, (b) modello a pompa

## **CARATTERISTICHE FARMACOLOGICHE DELLA P-GP**

La glicoproteina P viene fisiologicamente espressa sulla superficie luminale degli organi adibiti ad assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione dei farmaci: le cellule endoteliali e gli astrociti della Barriera Emato-Encefalica (BEE), le cellule situate dal lato materno della placenta, la membrana con orletto a spazzola degli enterociti nell'intestino tenue e dei nefroni nei tubuli prossimali renali, la membrana canalicolare degli epatociti nel fegato, la barriera ematotesticolare e le cellule delle ghiandole surrenali.

Una serie di studi ha dimostrato come in tutti questi siti la funzione principale della P-gp sia la difesa dei tessuti da sostanze tossiche esogene o endogene, ottenuta attraverso 3 vie:

- Limitazione dell'assorbimento, per trasferimento del substrato dagli enterociti al lume intestinale e sua eliminazione con le feci.
- Eliminazione attiva, per trasferimento del substrato dalle cellule del tubulo prossimale al lume tubulare e sua eliminazione con le urine, o per trasferimento del substrato dagli epatociti alla bile.
- Limitazione della distribuzione ai tessuti, per trasferimento del substrato dall'endotelio cerebrale e testicolare ai capillari sanguigni, o per trasferimento del substrato dai capillari fetali al lato materno della placenta e quindi al sangue materno.

[14]

### *Intestino tenue: ruolo della P-gp*

Ogni farmaco è caratterizzato da proprietà chimiche, quali pKa, peso molecolare, solubilità e lipofilia, e influenzato da fattori biologici, quali tempo di transito gastrico e intestinale, circolazione del sangue attraverso le mucose e pH dell'ambiente intestinale; questi fattori influiscono sulla farmacocinetica del farmaco stesso, facilitandone l'assorbimento passivo.

[15]

Mentre dalla porzione prossimale dell'intestino tenue a quella distale l'espressione del CYP3A4 (Citocromo P450 3A4) diminuisce, l'espressione della glicoproteina P aumenta dalla regione prossimale a quella distale. [16]

E' noto quanto la parete della mucosa intestinale sia importante nel determinare la biodisponibilità dei farmaci assunti per via orale.

E' stato osservato che, dopo somministrazione endovenosa di digossina in topi che esprimono la P-gp e con occlusione del dotto biliare, circa il 16% della dose di farmaco è secreta nel lume intestinale entro 90 minuti.

A seguito della somministrazione orale di valsopodar, inibitore della P-gp, in topi knockout, non è stata osservata nessuna escrezione diretta di digossina nel lume intestinale. [17]

Il trasporto attivo mediato dalla glicoproteina P è confermato tramite somministrazione orale di alcuni farmaci antitumorali che si sono dimostrati dei substrati della P-gp. Tra questi paclitaxel e docetaxel, la cui biodisponibilità risulta essere scarsa a causa dell'espressione della P-gp nella mucosa del tratto gastrointestinale, che ne limita l'assorbimento orale tramite l'escrezione diretta nel lume intestinale.

L'incremento della biodisponibilità di paclitaxel e docetaxel è stato ottenuto con la co-somministrazione di inibitori della P-gp. [18]

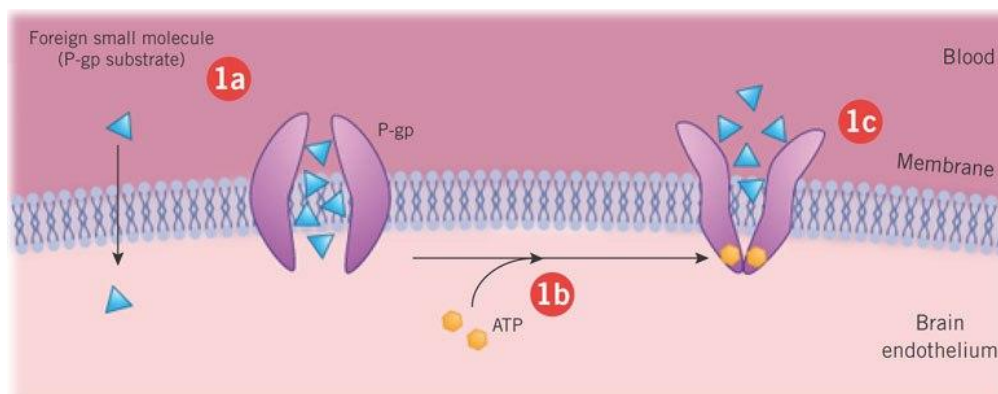
Questa combinazione di composti è utilizzata nello sviluppo formulativo delle forme farmaceutiche orali dei farmaci antitumorali, che sono substrati della P-gp.

#### Barriera Emato-Encefalica (BEE): ruolo della P-gp

La BEE è una membrana costituita da cellule endoteliali che rivestono i capillari che irrorano il cervello, quindi separa e al contempo mette in comunicazione il torrente circolatorio ed il tessuto cerebrale. [19]

Svolge un ruolo protettivo nei confronti del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e inoltre esplica un ruolo chiave nella regolazione dell'omeostasi cerebrale.

Il passaggio di una sostanza xenobiotica attraverso la barriera emato-encefalica è influenzato dalla sua lipofilia. Composti scarsamente lipofili hanno difficoltà ad oltrepassare la barriera: a causa della loro elevata idrofilia, infatti, non possono attraversare passivamente la BEE. [19]



**Figura 7:** Espressione della glicoproteina P a livello della Barriera Emato-Encefalica

Nonostante ciò esistono molti farmaci, come la ciclosporina A e la vincristina, che sono meno permeabili attraverso la membrana di quanto ci si possa aspettare considerando il loro grado di lipofilia. [20]

Questo fenomeno può essere spiegato grazie alla presenza di trasportatori, tra cui la stessa P-gp, che sono intercalati ai lipidi costituenti la membrana luminale delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali; la capacità di questi trasportatori è proprio quella di limitare l'accesso dei farmaci al SNC, quindi essi possono ostacolare alcune terapie farmacologiche.

La P-gp, infatti, oltre ad essere ampiamente espressa sulla superficie luminale dell'endotelio vascolare cerebrale, si ritrova anche sulle cellule epiteliali del plesso coroideo, a livello del quale trasporta i substrati attraverso la barriera del liquido cerebro-spinale. [21]

Uno degli studi che ha dimostrato il ruolo chiave della P-gp nel passaggio dei farmaci attraverso la BEE è incentrato sull'analisi dell'azione centrale della loperamide, oppioidi ad azione periferica identificato come substrato della P-gp.

Somministrando loperamide in presenza di chinidina, identificata invece come inibitore della P-gp, l'effetto della prima risulta essere centrale, con alterazione della risposta ventilatoria e conseguente aumento della concentrazione di biossido di carbonio. [22]

Altri studi per analizzare il ruolo della P-gp a livello della BEE sono stati condotti su colture di cellule endoteliali di capillari cerebrali [23] e su topi knockout (topi geneticamente modificati in cui è soppressa l'espressione di un determinato gene) con genoma privo di uno o entrambi i geni per la P-gp (MDR-1a e MDR-1b). [24]

Nei topi knockout le concentrazioni di vinblastina, paclitaxel e doxorubicina risultano incrementate a livello del SNC, in particolare la concentrazione di vinblastina è risultata essere circa 46 volte maggiore rispetto a quella osservata in topi che esprimono il gene MDR-1a. [25]

#### Placenta: ruolo della P-gp

La placenta costituisce una fondamentale barriera sangue-tessuto tra la madre e il feto, e come su molte altre membrane anche sulla sua superficie sono espressi diversi trasportatori di farmaci, tra cui la P-gp.

La funzione di questi trasportatori a livello placentare è quella di proteggere il feto da eventuali esposizioni della madre a sostanze xenobiotiche o terapie farmacologiche necessarie per la madre ma dannose per il feto durante la gravidanza.

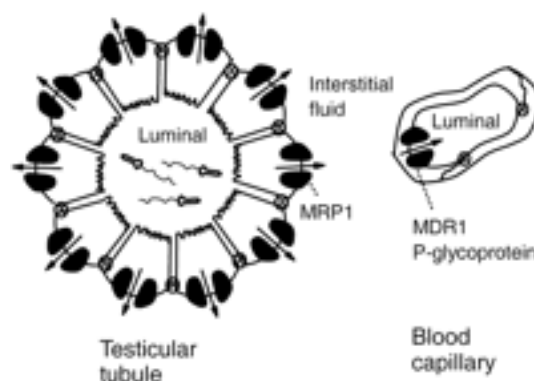
La P-gp è stata individuata a livello del trofoblasto placentare grazie ad una serie di esperimenti di Western Blot condotti per analizzare i livelli di espressione delle proteine negli omogenati di placenta. [26]

L'espressione della P-gp a livello placentare tende ad aumentare con l'aumento ponderale della placenta stessa, mentre non è stato evidenziato alcun nesso con il peso del feto né con l'età gestazionale.

#### Barriera Emato-Testicolare: ruolo della P-gp

Nelle cellule endoteliali dei capillari vascolari del tessuto testicolare sono presenti diversi tipi di MDR-1.

Il ruolo della P-gp a livello della membrana emato-testicolare, analogamente al suo ruolo a livello della BEE, consiste nella protezione dall'accumulo di xenobiotici.



**Figura 8:** Espressione della glicoproteina P a livello della Barriera Emato-Testicolare

#### Fegato e reni: ruolo della P-gp

I principali organi adibiti all'escrezione degli xenobiotici dall'organismo sono il fegato e il rene.

La prima fase che caratterizza l'escrezione biliare di un farmaco consiste nel suo transito attraverso la membrana sinusoidale dell'epatocita, che può avvenire passivamente o tramite trasportatori localizzati sulla membrana stessa. [27]

Una volta attraversata questa barriera, il farmaco si addentra nella cellula epatica, e raggiunge la membrana canalicolare, a livello della quale viene trasportato nella bile ad opera della P-gp.

L'assorbimento epatico, la diffusione intracellulare e la biotrasformazione, che spesso avviene all'interno dell'epatocita, sono i fattori principali che influenzano l'escrezione biliare di un farmaco.

Analogamente, il primo passaggio chiave nell'escrezione renale degli xenobiotici consiste nell'assorbimento dei farmaci attraverso la membrana basolaterale delle cellule epiteliali del rene, anch'essa contenente trasportatori attivi che regolano l'assorbimento intracellulare dei farmaci.

## **P-GP E MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

La glicoproteina P è la componente principale della BEE, e limita o previene l'ingresso di numerosi agenti chemioterapici, piccoli peptidi, antibiotici, inibitori dell'HIV proteasi e farmaci antidepressivi nel SNC.

Mentre, da una parte, questo effetto risulta essere una protezione per il cervello da sostanze tossiche, dall'altro lato può rappresentare il principale fattore limitante coinvolto nella riduzione dell'efficacia di alcune terapie per il trattamento di malattie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson e quello di Alzheimer.

Infatti molti farmaci generalmente utilizzati a questo fine sembrerebbero essere substrati della P-gp, e quindi la loro permeabilità attraverso la BEE potrebbe essere drasticamente ridotta.

Un recente studio ha evidenziato la correlazione tra alcune malattie del SNC ed il ruolo giocato dalla P-gp sia nell'eziologia, sia nella progressione di questi stati patologici. La P-gp rappresenta dunque un possibile bersaglio che può essere opportunamente modulato per aumentare l'efficacia di terapie esistenti. [28]

Un'iperespressione della P-gp è stata individuata anche nell'epilessia, in cui l'efflusso mediato dal trasportatore limita o impedisce l'ingresso di farmaci nel SNC. Il risultato è una riduzione della risposta dei pazienti al trattamento con farmaci antiepilettici. [29]

La riduzione dell'attività della glicoproteina P contribuisce al danno neuronale indotto dall'aumentato accumulo di tossine, come accade nella malattia di Parkinson, o dalla ridotta capacità del cervello di espellere proteine che vi si accumulano, come nella malattia di Alzheimer.

Negli stadi avanzati di entrambe le patologie si osservano un'induzione dell'espressione e quindi un incremento dell'azione della P-gp, conseguenti al danno neuronale: durante il processo infiammatorio si ha un'intensa attivazione della microglia, che esprime la P-gp, e anche la liberazione di altri mediatori dell'infiammazione come il TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha), l'IL-6 (interleuchina 6) e l'ossido nitrico, che contribuiscono a loro volta ad aumentare l'attività della glicoproteina. [30]

L'attivazione di questa pompa di efflusso è in grado di promuovere la clearance cerebrale di composti potenzialmente tossici.



A partire da questa intuizione, il miglioramento dell'efflusso dalla BEE mediato dalla P-gp potrebbe costituire un innovativo approccio terapeutico, utile per prevenire l'accumulo di tossine e proteine responsabili dello sviluppo delle patologie neurodegenerative. [28]

Inoltre, substrati e inibitori della P-gp sono potenziali nuovi strumenti per la diagnosi di malattie del SNC tramite le tecniche di PET e SPECT; in particolare, i pazienti affetti da Parkinson e Alzheimer possono essere monitorati nei primi stadi e durante l'avanzamento della patologia per mezzo di composti radiomarcanti che interagiscono con la P-gp. [29]

#### La malattia di Alzheimer e la P-gp

La malattia di Alzheimer è caratterizzata da una progressiva perdita delle funzioni cognitive che conduce alla demenza, ed è dovuta soprattutto all'accumulo di aggregati di peptide  $\beta$ -amiloide che formano placche insolubili nel cervello. [31; 32]

Recenti studi hanno dimostrato che la quantità di peptide depositato nel cervello è inversamente proporzionale all'espressione della P-gp cerebrovascolare, fatto che suggerisce il ruolo chiave della glicoproteina nell'eliminazione del peptide  $\beta$ -amiloide. [33]

Studi *in vitro* hanno evidenziato che il peptide  $\beta$ -amiloide è un substrato della P-gp. [34] Su questa base, l'impiego di alcuni modulatori della P-gp su modelli di Alzheimer ha evidenziato un aumento della clearance cerebrale di peptide  $\beta$ -amiloide.

Un successivo studio *in vivo* con pazienti affetti da Alzheimer, da lieve a moderato, ha permesso di osservare una riduzione del declino cognitivo dopo 12 mesi di trattamento con rifampicina, un potente induttore della P-gp. [35]

Tuttavia, se la possibilità di usare induttori della P-gp potrebbe essere un valido approccio per la riduzione dei livelli di peptide  $\beta$ -amiloide nel cervello in stadi precoci della malattia, l'iperespressione della proteina negli stadi avanzati costituisce essa stessa il limite principale per l'efficacia delle terapie farmacologiche attuali: molti farmaci utilizzati sono, infatti, substrati della stessa P-gp. [28]

#### La malattia di Parkinson e la P-gp

Analogamente all'Alzheimer, la malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa attualmente incurabile, caratterizzata dalla perdita irreversibile di neuroni dopaminergici nella substantia nigra, e soprattutto dall'accumulo di aggregati proteici detti Corpi di Lewy. [36]

Anche se la patogenesi della malattia è ancora sconosciuta, è stato ampiamente dimostrato il contributo della glicoproteina P all'efflusso cellulare di alcuni pesticidi [37] ed altre tossine ambientali responsabili dell'insorgenza della patologia. [38]

Molti farmaci antiparkinson, come L-DOPA e bromocriptina, sono substrati della P-gp, quindi la loro concentrazione a livello cerebrale e la conseguente tossicità possono essere influenzati dalla P-gp stessa. [39; 40].

La co-somministrazione di un farmaco antiparkinson ed un modulatore o un inibitore di questo trasportatore può dunque essere uno strumento utile per migliorare l'efficacia della terapia antiparkinson o per ridurre la tossicità spesso associata all'uso di tali farmaci, come la bromocriptina. [28]

#### Altre patologie: le malattie di Huntington e Creutzfeldt-Jakob e la P-gp

La malattia di Huntington è una condizione neurodegenerativa caratterizzata da discinesia, declino cognitivo e disturbi psichiatrici.

Scaturisce da una disfunzione molecolare e cellulare indotta da proteine anomale di huntington (htt), che danno luogo ad aggregazioni e dispiegamenti, anche se il meccanismo non è ancora chiarito. [41]

La malattia di Creutzfeldt-Jakob è la forma più comune di encefalopatia spongiforme trasmissibile nell'uomo, e nell'ultimo stadio conduce alla morte; è caratterizzata dall'accumulo di un'isoforma anomala di proteina prionica (PrP), che forma aggregati responsabili della progressione della malattia.

Entrambe le patologie sembrano associate ad un'ipoespressione della P-gp cerebrovascolare, come dimostrato da studi condotti da Vogelgesang e colleghi. [42]

Un recente studio ha evidenziato la neuroprotezione indotta dalla simvastatina su modelli murini di Huntington, e l'ipotesi più avvalorata sembrerebbe l'induzione dell'espressione di P-gp da parte del farmaco. [43]

Un'efficace terapia per trattare o prevenire queste patologie neurodegenerative potrebbe essere quindi rappresentata dall'utilizzo di induttori dell'espressione di P-gp, o di adeguati modulatori in grado di migliorarne la funzionalità a livello cerebrale.

### La sclerosi laterale amiotrofica e la P-gp

La sclerosi laterale amiotrofica è una patologia a lenta insorgenza, caratterizzata da una perdita progressiva dei neuroni motori nel cervello e nel midollo spinale, che porta alla paralisi e infine alla morte. [44]

Nonostante i meccanismi molecolari non siano ancora chiariti, anche questa malattia neurodegenerativa sembra essere dovuta al dispiegamento e al successivo accumulo di aggregati proteici dell'enzima Superossido dismutasi 1, dotata di spiccata tossicità nei confronti dei motoneuroni. [45]

Attualmente il riluzolo è l'unico agente terapeutico, testato su pazienti affetti da SLA, in grado di ritardare la degenerazione indotta dalla patologia.[46]

Recenti test clinici hanno dimostrato che la co-somministrazione di riluzolo e minociclina, antibiotico ad ampio spettro, ritarda l'insorgenza della SLA, riduce il deficit di motoneuroni e prolunga la sopravvivenza dei pazienti. La combinazione dei due farmaci sembra infatti aumentare la concentrazione di riluzolo nel cervello a causa dell'inibizione della P-gp esercitata dalla minociclina. [47]

### L'epilessia e la P-gp

L'epilessia è un disordine neurologico caratterizzato da crisi generalizzate ricorrenti; anche se i numerosi farmaci antiepilettici agiscono secondo diversi meccanismi d'azione, l'insorgenza di farmacoresistenza è un tratto in comune. [48]

Uno dei principali meccanismi di resistenza è il blocco dell'accesso dei farmaci antiepilettici, come il fenobarbital, ai focus epilettici, causato da un'iperespressione delle pompe di efflusso, come la P-gp, a livello della barriera emato-encefalica. [49]

Uno studio condotto su ratti resistenti al fenobarbital ha dimostrato che la co-somministrazione di tariquidar, un inibitore selettivo della P-gp, e lo stesso fenobarbital è in grado di superare la resistenza farmacologica instaurata, evidenziando il coinvolgimento della P-gp nell'espulsione dell'antiepilettico dalla barriera emato-encefalica. [50]

In conclusione, la possibilità di disporre di ligandi selettivi per la P-gp potrebbe portare ad uno sviluppo di nuove terapie per il trattamento di patologie del SNC o ad un potenziamento e un miglioramento di terapie già esistenti.

## MODULATORI DELLA P-GP

I substrati trasportati dalla P-gp sono un gruppo eterogeneo di molecole, che possono essere neutre o cariche positivamente, ad esempio farmaci antitumorali con strutture chimiche non correlate, come gli alcaloidi della vinca (vinblastina, vincristina), le antracicline (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina), i taxani (paclitaxel, docetaxel), oppure farmaci antiaritmici e antiistaminici. [51]

Agenti terapeutici substrati della P-gp

Substrati		Inibitori	
<b>Antiacidi</b>	<b><math>\beta</math>-antagonisti</b>	<b>Oppioidi</b>	<b>Diversi inibitori</b>
Cimetidina	Carvedilolo	Loperamide	Verapamil
Ranitidina	Talinololo	Domperidone	Chinidina
	Reserpina	Morfina	Valspodar
<b>Antibiotici</b>		Metadone	Ciclosporina
Eritromicina	<b>Bloccanti dei canali Ca<sup>++</sup></b>	Fentanile	Ketoconazolo
Rifampicina	Diltiazem		
Levofloxacina	Mibefradil	<b>Steroidi</b>	
Tetraciclina		Desametasone	
<b>Antitumorali</b>	<b>Antiaritmici</b>	Metilprednisolone	
Paclitaxel	Digossina	Aldosterone	
Docetaxel	Digitossina	Progesterone	
Vinblastina		Idrocortisone	
Vincristina	<b>Antiistaminici</b>	Cortisolo	
Doxorubicina	Fexofenadina	Corticosterone	
Daunorubicina	Terfenadina		
Epirubicina			

**Figura 9:** farmaci substrati della glicoproteina P

La P-gp è inoltre coinvolta nel trasporto dei fosfolipidi attraverso la membrana, dal momento che questi, dotati di una porzione polare, non sono in grado di attraversare lo strato interno idrofobico della membrana stessa.

L'inibizione competitiva del legame col substrato, l'alterazione della fluidità della membrana e l'inibizione dell'attività ATP-asi della pompa di efflusso sono stati proposti come possibili meccanismi di modulazione della P-gp.

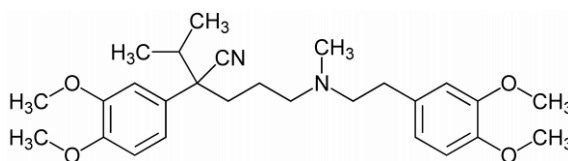
I modelli *in vitro* degli inibitori specifici per la P-gp si sono dimostrati insoddisfacenti a livello clinico a causa degli effetti collaterali dovuti all'inibizione della funzionalità fisiologica della glicoproteina nei tessuti sani. Il risultato è un'elevata tossicità che limita l'applicazione di questi composti. [52]

### Modulatori di prima generazione

Il primo inibitore della P-gp ad essere identificato è stato il verapamile, bloccante dei canali al calcio, seguito dall'immunosoppressore ciclosporina A, da antibiotici come l'eritromicina, dall'agente antimalarico chinina e da alcuni antagonisti della calmodulina, usati negli anni '80. [53]

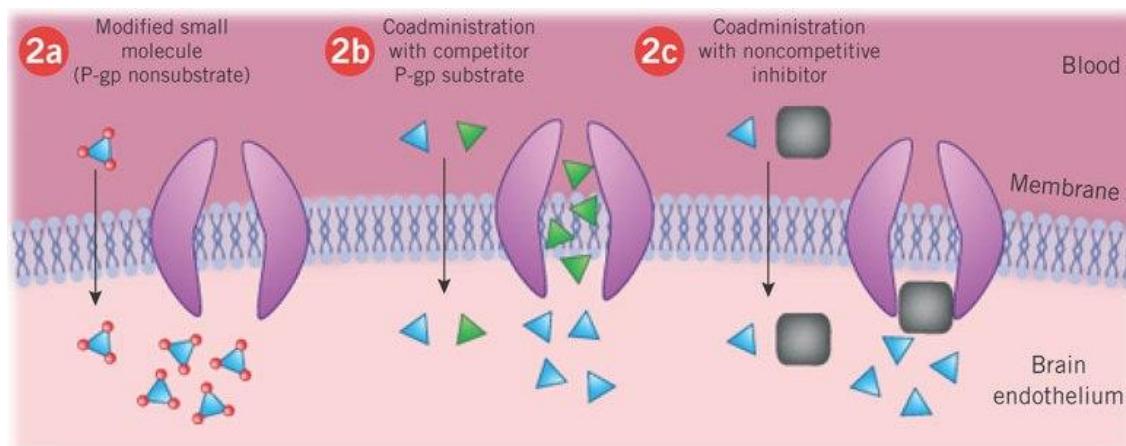
Il problema principale di questi composti è che, non essendo stati specificamente sintetizzati con l'intento di inibire la P-gp, sono intrinsecamente tossici per la loro originaria attività farmacologica.

Alcuni di essi sono substrati per altri trasportatori e sistemi enzimatici, fattore che espone a rischi di imprevedibili interazioni farmacocinetiche; inoltre, la maggior parte di questi inibitori presenta una bassa affinità per la P-gp, quindi si dovrebbero somministrare ad alte dosi, causando gravi effetti collaterali per la tossicità associata. [54]



**Figura 10:** Verapamile

Il meccanismo d'azione del verapamile è un esempio di inibizione competitiva (*Figura 11, meccanismo 2b*), in cui substrato e inibitore competono per lo stesso sito sul trasportatore; si basa sulla saturabilità della P-gp, per cui un'azione efficace richiede un alto dosaggio e provoca, di conseguenza, marcata tossicità. [55]



**Figura 11:** modulazione competitiva e non-competitiva della glicoproteina P

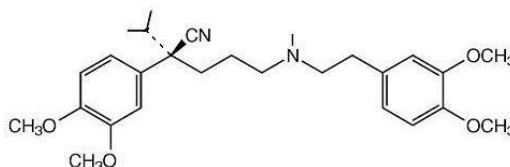
### Modulatori di seconda generazione

La seconda generazione di P-gp modulatori include i derivati del verapamile, analoghi dei bloccanti dei canali al calcio con una ridotta attività farmacologica, i cui esponenti principali sono il dexverapamile ((+)-verapamile) e il biricodar.

Questi composti hanno un'attività più potente come P-gp inibitori e una minore tossicità grazie alla rimozione della loro azione farmacologica originaria [53]; il dexverapamile, ad esempio, è circa 10 volte meno attivo dell'S-enantiomero come calcio-antagonista ma è equipotente come modulatore della P-gp. [56]

Purtroppo si è osservato che la somministrazione di questi farmaci influisce significativamente sul metabolismo (soprattutto mediato dal sistema del citocromo P450) e sull'escrezione (ad esempio per via biliare) degli agenti antitumorali, portando ad elevata tossicità ed inattesi effetti collaterali. [57]

Inoltre molti di questi composti interferiscono con altri sistemi di trasporto ABC, comportandosi da substrati, quindi possono aumentare la citotossicità dei farmaci chemioterapici impedendo alle cellule sane di difendersi da questi. [58]

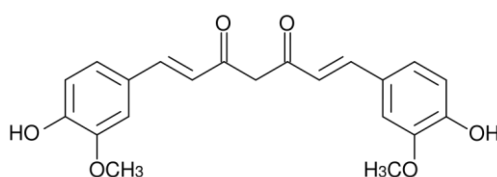


**Figura 12:** Dexverapamile

Modulatori di terza generazione

Questi composti, attualmente in sviluppo clinico, sono sintetizzati con l'intento di superare i limiti di tossicità e biodisponibilità dei predecessori, e rispetto a questi ultimi presentano una maggiore selettività nei confronti della P-gp.

Recenti studi su colture cellulari sperimentali hanno dimostrato che la curcumina e i suoi analoghi contrastano il fenotipo MDR inibendo fortemente l'espressione e la funzionalità della P-gp. [59]



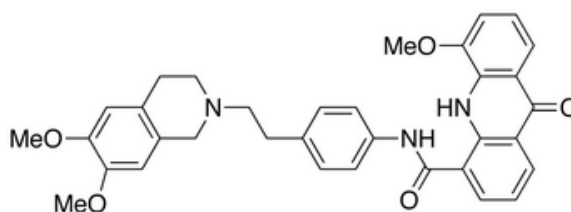
**Figura 13:** Curcumina

I derivati antranilamidici rappresentano un'importante classe di farmaci in grado di modulare l'attività della glicoproteina P.

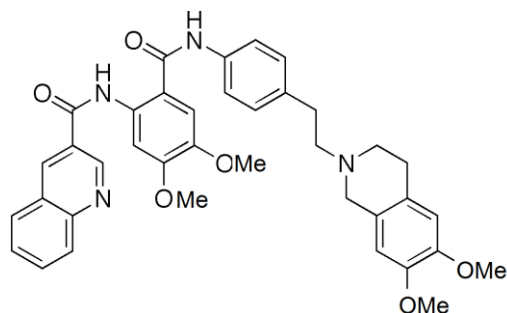
L'elacridar è uno tra i più potenti modulatori MDR conosciuti [60]; studi clinici hanno evidenziato che questo composto presenta un'elevata affinità per la glicoproteina P e un'attività inibitoria sul trasportatore BCRP, mentre interferisce in modo assai modesto con i sistemi enzimatici del citocromo P-450, come il 3A4. [61]

Il tariquidar è un inibitore P-gp molto potente, selettivo ed efficace, come dimostrato da studi *in vitro* ed *in vivo*; è ben tollerato ed opera un'inibizione di tipo non competitivo (*Figura, meccanismo 2c*) con farmaci antitumorali come la vinblastina e il paclitaxel, quindi non è un substrato della P-gp stessa. Permette di ottenere un completo contrasto della MDR a basse concentrazioni (25-80 nM) ed è caratterizzato da una lunga durata d'azione. [62]

Questo composto agisce inibendo l'attività ATP-asi basale della pompa, per cui impedisce il legame del substrato e l'azione idrolitica sull'ATP. [63]



**Figura 14:** Elacridar

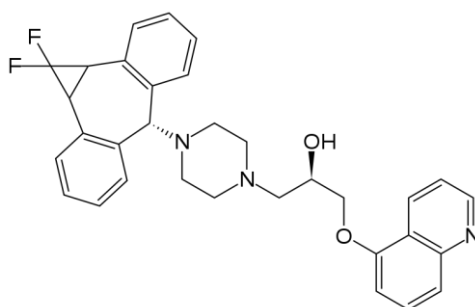


**Figura 15:** Tariquidar

Lo zosuquidar è un composto ad elevata specificità per la P-gp, privo di ulteriori attività farmacologiche; non modula l'attività di trasportatori BCRP o MRP ed è dotato di una scarsa affinità per i citocromi P-450, fattore che implica minori interazioni farmacocinetiche con altri farmaci. [64]

Nelle fasi cliniche I/II, lo zosuquidar ha mostrato bassa tossicità e non ha interferito con la farmacocinetica della doxorubicina, mentre la clearance di vincristina e vinorelbina ne hanno risentito moderatamente. [65]

La fase III sperimentale riguardante la combinazione tra zosuquidar e daunorubicina e citarabina nella leucemia mielogena acuta è attualmente in corso.



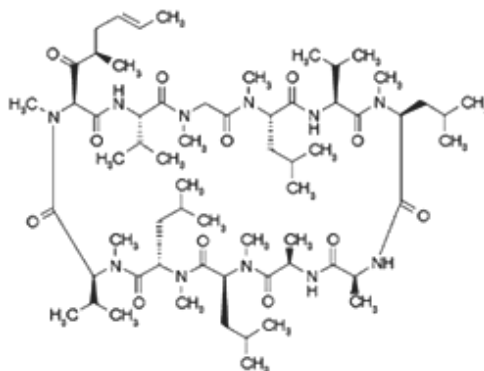
**Figura 16:** Zosuquidar

Il valsopodar, PSC833, è un P-gp inibitore analogo della ciclosporina A ma privo di attività immunosoppressiva, che può quindi essere somministrato ai pazienti in dosi più elevate. [66]

L'utilizzo in terapia del valsopodar, attualmente sperimentato in fase clinica III, è al momento limitato dalla sua attività inibitoria nei confronti del citocromo P-450 3A4. [67] Dal momento che molti agenti antitumorali, come la doxorubicina, sono metabolizzati ad



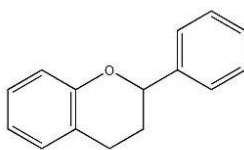
opera di questo sistema enzimatico, la loro co-somministrazione con il valsopodar determina un aumento degli effetti tossici dei chemioterapici stessi, per cui risulta necessaria una riduzione della loro dose. [66]



**Figura 17:** Valsopodar

### Flavonoidi

I flavonoidi sono una grande famiglia di composti polifenolici ritrovati come metaboliti secondari nelle piante, e possono essere raggruppati in sottoclassi. [68]



**Figura 18:** Struttura generale dei Flavonoidi

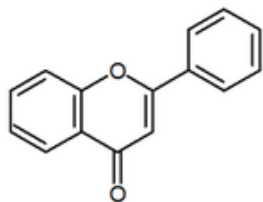
Recentemente è stato infatti evidenziato che i polifenoli inibiscono la funzionalità di alcuni trasportatori ABC, tra cui P-gp, proteine MRP e BCRP, e di conseguenza sono considerati promettenti P-gp modulatori. [69]

E' stato ipotizzato che i flavonoidi hanno un'azione modulatrice legata ad interazioni bifunzionali nei confronti dei siti vicinali di legame con l'ATP e delle regioni di interazione con gli steroidi, localizzate in prossimità del sito di legame per l'ATP.

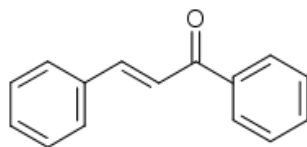
Dal momento che questi composti sono in grado di mimare la porzione adeninica dell'ATP, legano la P-gp con elevata affinità a livello del sito NBD2; allo stesso tempo sembra che la restante porzione idrofobica dei polifenoli sia importante per l'interazione con l'analogica sequenza idrofobica legante gli steroidi della P-gp. [70]

Una serie di studi condotti con l'intento di determinare l'influenza di elementi strutturali nei confronti dell'attività MDR inibitoria, ha evidenziato come alcuni flavonoidi, ad

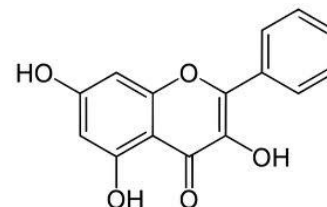
esempio flavone, calcone e galangina, siano più attivi di altri nell'inibizione di tale trasportatore. [71]



**Figura 19:** flavone



**Figura 20:** calcone



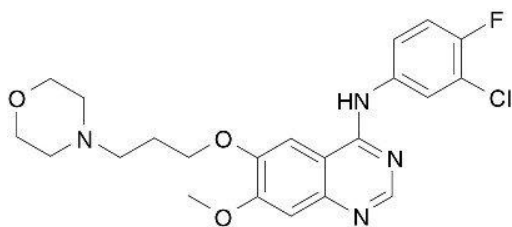
**Figura 21:** galangina

Secondo studi di SAR, due caratteristiche molto importanti ai fini dell'attività P-gp modulatoria sono l'idrofobicità e la planarità dei flavonoidi, che ne permettono l'interazione con i sopracitati siti della glicoproteina. [72]

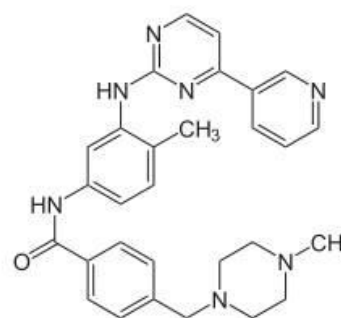
Nonostante questi composti abbiano una bassa tossicità, il loro limite è l'ampio spettro d'azione, che comprende attività antiestrogenica e inibizione di altre pompe ATP-asiche. [73]

#### Derivati pirimidin-2-amminici

Il gefitinib e l'imatinib, clinicamente utilizzati come inibitori del recettore tirosin-chinasico, hanno dimostrato la capacità di modulare i profili farmacocinetici di substrati della P-gp e della BCRP, permettendo di ottenere un aumento del loro assorbimento gastrointestinale e della loro penetrazione a livello del SNC. [74]



**Figura 22:** gefitinib

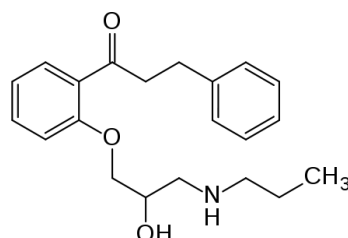


**Figura 23:** imatinib

Ricerca di un farmacoforo

Il propafenone, antiaritmico bloccante dei canali al sodio, ha rappresentato il punto di partenza per l'identificazione di un farmacoforo per gli inibitori della glicoproteina P.

[75]

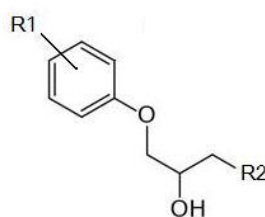


**Figura 24:** Propafenone

Analizzando la struttura di questo composto si possono individuare tre tasche idrofobiche adibite all'interazione del farmaco con la P-gp tramite legami  $\pi$ - $\pi$  (stabiliti dai due anelli benzilici) o mediante interazione sterica (operata dalla catena alifatica legata all'azoto).

[76]

Semplificando la molecola del propafenone si è giunti alla rappresentazione di un farmacoforo, caratterizzato da due porzioni idrofobiche, ovvero un anello aromatico e un sostituente sull'azoto. E' altresì importante che la distanza tra gli atomi di ossigeno e di azoto sia compresa tra i 3 e i 4 gruppi metilenici, a causa della forte interazione con la P-gp.



**Figura 25:** Farmacoforo ottenuto dal propafenone

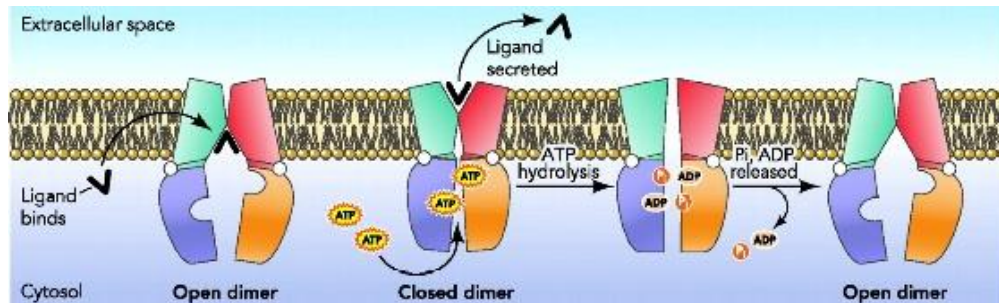
I flavonoidi, ad esempio, si adattano perfettamente al modello del farmacoforo, dal momento che sono costituiti da due anelli aromatici, porzioni idrofobiche che formano legami  $\pi$ - $\pi$  con la P-gp; gli anelli sono inoltre separati tra loro da una catena alifatica a 3 atomi di carbonio con porzione carbonilica, quindi questi composti sono riconducibili alla struttura del propafenone.

## **INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE**

Attualmente le proteine di trasporto ABC rappresentano uno stimolante settore di ricerca grazie alla loro ampia distribuzione in numerosi distretti critici implicati nella protezione dei tessuti, e in modo particolare del SNC. All'interno di questa classe di trasportatori, la glicoproteina P (P-gp) sembra svolgere un ruolo molto interessante, perché non solo costituisce un fattore limitante nella penetrazione di molte sostanze esogene attraverso la barriera emato-encefalica (BEE), ma risulta particolarmente coinvolta nell'eziologia di alcuni disordini neurologici quali malattie di Alzheimer, Parkinson, Huntington, Creutzfeldt-Jakob, Sclerosi Laterale Amiotrofica ed epilessia. [28].

Un'alterata funzionalità della P-gp risulta infatti essere implicata in numerose patologie neurodegenerative caratterizzate da un'aberrante polimerizzazione di proteine *misfolded* e dal loro accumulo nella materia cerebrale, come appunto le malattie di Alzheimer e di Parkinson.

La P-gp, detta anche ABCB1 o MDR1, è una flippasi, cioè favorisce il passaggio di molte sostanze dallo strato fosfolipidico interno a quello esterno attraverso il consumo di due molecole di ATP e un cambiamento conformazionale.



È una proteina trans-membrana specificamente espressa a livello di intestino tenue, placenta, barriera emato-testicolare, fegato, reni e superficie luminale dell'endotelio vascolare cerebrale, dove agisce come una pompa di efflusso trasferendo i suoi substrati verso il compartimento extracellulare. È inoltre espressa nelle cellule epiteliali del plesso coroideo, a livello del quale trasporta substrati attraverso la barriera che separa sangue e fluido cerebro-spinale.

L'ampia ed omogenea distribuzione della P-gp nel SNC mostra come questo trasportatore di membrana possa essere essenziale per la protezione da sostanze xenobiotiche.

Alcuni studi hanno dimostrato che in patologie quali AD e Parkinson la P-gp può risultare scarsamente attiva o espressa in modo inadeguato a livello cerebrale. Tale condizione

potrebbe aggravare il quadro patologico neurodegenerativo a causa di un aumentato accumulo di aggregati  $\beta$ -amiloidi nel SNC come nel soggetto affetto da AD o di tossine ambientali come nel malato di Parkinson.

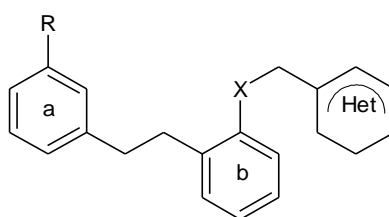
Alla luce di queste considerazioni la P-gp potrebbe rappresentare un bersaglio innovativo per lo sviluppo di strategie terapeutiche più efficaci e preventive per le patologie neurodegenerative.

E' necessario tenere comunque presente che, se da un lato l'azione della P-gp costituisce una protezione per il cervello contro molte sostanze tossiche, dall'altro la sua attività di efflusso potrebbe rappresentare il principale fattore limitante per alcune terapie finalizzate al trattamento delle malattie neurodegenerative: molti farmaci generalmente utilizzati in questo campo sono infatti dei substrati della P-gp, e quindi la loro biodisponibilità risulta essere limitata a causa di una ridotta permeabilità attraverso la BEE.

Presso il laboratorio in cui è stata svolta questa tesi di laurea erano stati sintetizzati alcuni derivati di tipo **A** come potenziali inibitori della P-gp.

Questi composti hanno mostrato una buona attività inibitoria nei confronti della glicoproteina P in test preliminari condotti su linee cellulari che sovraesprimono la P-gp (cellule Caco-2, carcinoma umano del colon, e MCF7/Adr, carcinoma umano della mammella resistente all'adriamicina). [77]

Studi di SAR condotti per valutare i requisiti strutturali utili a migliorare l'attività modulatoria nei confronti della P-gp hanno evidenziato l'importanza del sostituente metossilico sull'anello benzenico di tipo **a** e sul sistema eterociclico aromatico. [78]

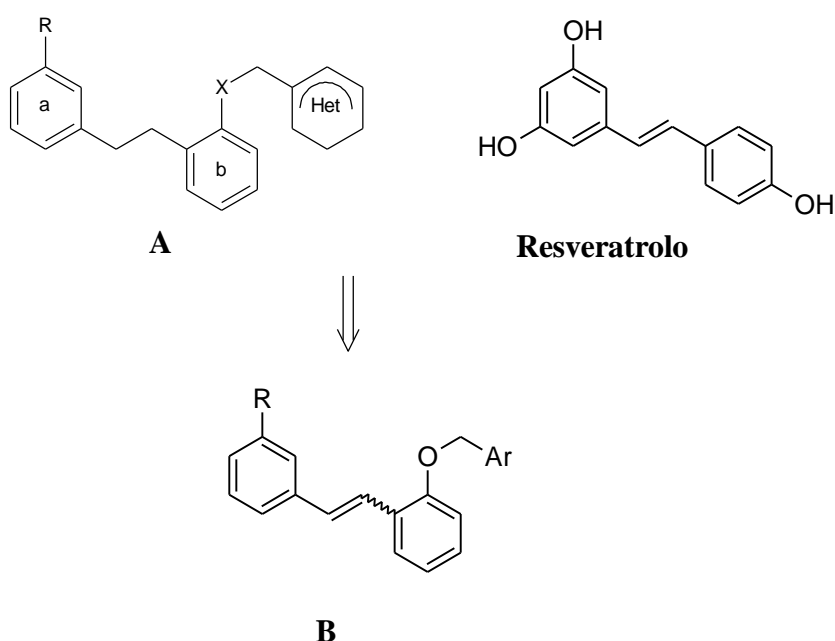


**A**

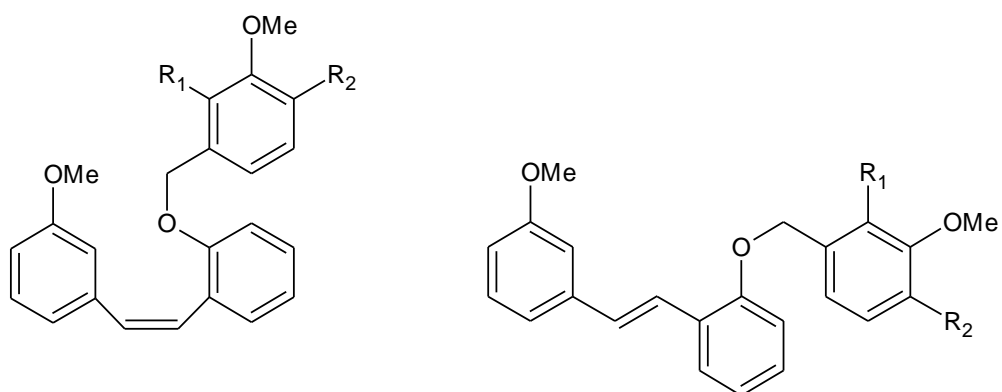
Recentemente numerosi studi biochimici hanno mostrato che il resveratrolo, un polifenolo di origine naturale, sembra essere efficace nel rallentare lo sviluppo dell'AD. [79] Questa attività neuroprotettiva sembra essere attribuibile alla sua capacità di inibire la formazione

di aggregati  $\beta$ -amiloidi, prevenendo la perossidazione dei lipidi di membrana ed esercitando un effetto antiinfiammatorio. [80]

Tenendo presente questi effetti biologici e considerata l'analogia strutturale tra gli inibitori della P-gp precedentemente sintetizzati e il resveratrolo, è stata progettata la sintesi di derivati di tipo **B**, che presentano la struttura stilbenica tipica del resveratrolo, con l'intento di ottenere composti dotati di effetto P-gp inibitore e di attività antiossidante.



In particolare sono stati sintetizzati i composti **1a-3a** e **1b-3b** rispettivamente nella configurazione Z ed E.



**1a:**  $R_1=R_2=H$

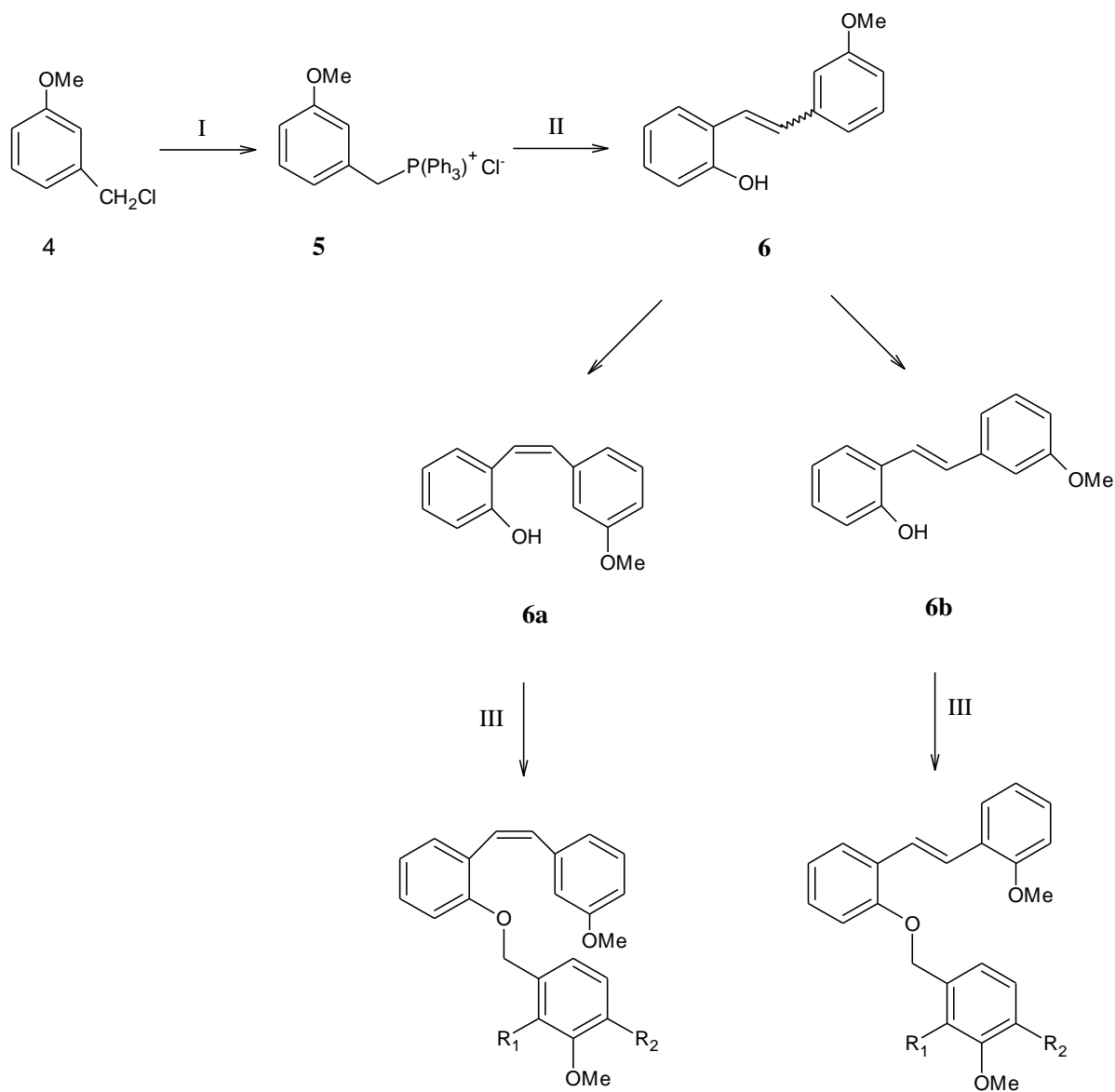
**2a:**  $R_1=OMe; R_2=H$

**3a:**  $R_1=R_2=OMe$

**1b:**  $R_1=R_2=H$

**2b:**  $R_1=OMe; R_2=H$

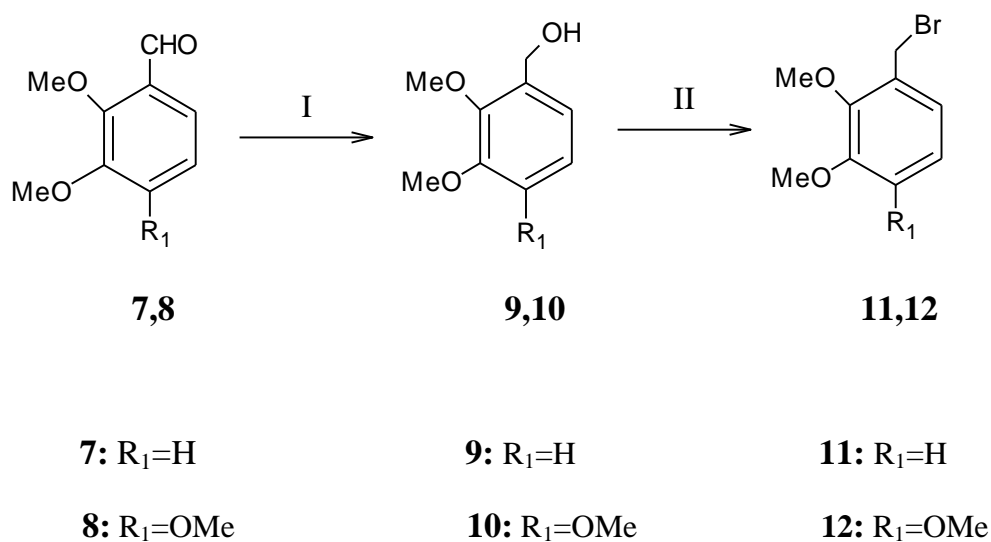
**3b:**  $R_1=R_2=OMe$

**SCHEMA 1****1a:**  $R_1=R_2=H$ **2a:**  $R_1=OMe; R_2=H$ **3a:**  $R_1=R_2=OMe$ **1b:**  $R_1=R_2=H$ **2b:**  $R_1=OMe; R_2=H$ **3b:**  $R_1=R_2=OMe$ **Reagenti e condizioni: I :**  $PPh_3$ ,  $CH_3CN$ , riflusso, 12h;**II :** Salicilaldeide, DBU,  $CH_3CN$ , riflusso, 12h;**III :** Opportuno metossibenzilbromuro, KOH, DMSO,  $40^\circ C$ , 19h.



I composti **1-3 a,b** sono stati ottenuti seguendo la procedura descritta nello **schema 1**.

Il composto **5** è stato ottenuto a partire dal 3-metossibenzilcloruro **4** per reazione con  $\text{PPh}_3$  in  $\text{CH}_3\text{CN}$  e, successivamente, è stato sottoposto ad una reazione di Wittig con la salicilaldeide per ottenere la miscela di cis/trans stilbene **6**. I due isomeri sono stati separati tramite cromatografia per dare l'isomero (*Z*) **6a** e l'isomero (*E*) **6b**. La successiva reazione con gli opportuni metossibenzilbromuri ha condotto ai prodotti finali **1-3 a,b**.

**SCHEMA 2**

**Reagenti e condizioni: I :** MeOH, NaBH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, t.a., 2h;

**II :** CBr<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, DMF, t.a., 21h.

I composti **11,12** sono stati ottenuti seguendo la procedura descritta nello **schema 2**.

L'opportuna metossibenzaldeide **7,8** è stata sottoposta a reazione di riduzione con NaBH<sub>4</sub> per dare i corrispondenti metossibenzilalcoli **9,10**. La successiva reazione di bromurazione con CBr<sub>4</sub> ha permesso di ottenere i metossibenzilbromuri **11,12**.

## **PARTE SPERIMENTALE**

## **MATERIALI E METODI**

La struttura dei composti è stata controllata per mezzo della spettrometria  $^1\text{H-NMR}$  e di massa. Degli spettri  $^1\text{H-NMR}$  e di massa sono stati riportati i particolari più significativi. Tutti i composti sintetizzati presentano dati spettrali in accordo con le strutture assegnate.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati eseguiti con uno spettro Varian Gemini 200 MHz; le soluzioni sono circa al 5% in  $\text{CDCl}_3$ . I chemical shift sono stati espressi in ppm (scala  $\delta$ ).

Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettro Hewlett Packard 5988° per introduzione diretta di un'energia nominale di 70 eV ad una temperatura di 350°C.

I punti di fusione sono stati determinati al microscopio di Kolfler e non sono stati corretti.

Le analisi elementari sono state eseguite nel nostro laboratorio di Chimica Analitica; la differenza tra i valori teorici e quelli ottenuti è risultata essere compresa in un intervallo di  $\pm 0.4\%$ .

Le evaporazioni sono state eseguite in evaporatore rotante e le disidratazioni delle fasi organiche sono state eseguite usando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Le TLC analitiche sono state effettuate utilizzando lastre MERCK di gel di silice (G60) con indicatore di fluorescenza 20 x 20.2 mm. Le macchie sono state evidenziate per mezzo di lampada UV (256 nm).

Per le FLASH cromatografie su colonna è stato usato gel di silice 70-230 mesh.

**SCHEMA 1****SINTESI DEL 3-METOSSIBENZIL(CLORO)TRIFENILFOSFORANO 5**

Ad una soluzione di 3-metossibenzilcloruro commerciale **4** (5.00 g; 32.00 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (20 ml) è stata addizionata PPh<sub>3</sub> (9.20 g; 33.93 mmoli). La miscela così ottenuta è stata posta sotto agitazione, a riflusso, per 12 h. Trascorso tale periodo, il solvente è stato evaporato a pressione ridotta. Il grezzo così ottenuto è stato purificato tramite cristallizzazione da CHCl<sub>3</sub>/Et<sub>2</sub>O fornendo il composto desiderato **5**.

**Resa:** 98%

**MS(m/z):** 383 (M<sup>+</sup>-Cl, 28%)

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.53 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.44 (d, 2H, *J* = 16 Hz, CH<sub>2</sub>); 6.60 – 6.77 (m, 3H, Ar); 7.02 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.11-7.21 (m, 15H, Ph) ppm.

**SCHEMA 1****SINTESI DEL 2-[(E/Z)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]FENOLO 6**

Ad una soluzione del composto **5** (2.00 g; 4.78 mmoli) in CH<sub>3</sub>CN (15 ml) è stata aggiunta DBU (1.17 g; 7.70 mmoli) e salicilaldeide commerciale (0.60 g; 7.48 mmoli). La miscela così ottenuta è stata lasciata sotto agitazione, a riflusso per 12 h. Trascorso tale periodo il solvente è stato evaporato e il residuo è stato ripreso con CHCl<sub>3</sub> e lavato con H<sub>2</sub>O, HCl 1N e NaCl. La fase organica è stata essiccata ed evaporata a p.r. fornendo il grezzo **6** contenente la miscela dei due isomeri *cis/trans*. I due isomeri sono stati isolati tramite cromatografia su colonna, utilizzando come fase eluente CHCl<sub>3</sub>.

**2-[(Z)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]FENOLO 6a**

**Resa:** 39%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.58 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.01 (br s, 1H, OH); 6.59 (d, 1H, *J* = 12.3 Hz, CH); 6.73-6.93 (m, 6H, Ar + CH); 7.11-7.21(m, 3H, Ar) ppm.

**2-[(E)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]FENOLO 6b**

**Resa:** 60%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.85 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.04 (br s, 1H, OH); 6.79-6.85 (m, 2H, Ar); 6.91-6.99 (m, 1H, Ar); 7.05-7.24 (m, 4H, Ar + CH); 7.28-7.41 (m, 2H, Ar + CH); 7.37 (d, 1H, *J* = 16.5 Hz, CH); 7.52 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar) ppm.

**SCHEMA 1****SINTESI DEI DERIVATI 1a,b-3a,b**

Una soluzione dell'opportuno derivato fenolico di tipo **6** (0.36 g; 1.60 mmoli) in DMSO (2 ml) è stata addizionata di KOH (0.32 g; 8.89 mmoli) e scaldata a 40°C per 15 min.. Quindi è stato aggiunto l'opportuno benzilbromuro (1.60 mmoli) e la miscela così ottenuta è stata lasciata sotto agitazione a 40°C per altre 18 ore. Trascorso tale periodo, il residuo è stato ripreso con AcOEt e lavato con soluzione di KOH 1N, una soluzione satura di NaCl e ghiaccio. La fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata a p.r.

➤ **1-[(3-METOSSIBENZIL)OSSO]-2-[(Z)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]  
BENZENE 1a**

Il grezzo è stato purificato tramite cristallizzazione da EtOH, ottenendo un solido cristallino.

**Resa:** 80%

**P.f.:** 79-81°C

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.61 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.10 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.60 (d, 1H, *J* = 14.0 Hz, CH); 6.70-6.99 (m, 8H, Ar + CH); 7.08-7.28 (m, 5H, Ar) ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b>C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>
<b>Calc. %</b>	79.74	6.40
<b>Trov. %</b>	79.61	6.27

➤ **1-[(2,3-DIMETOSSIBENZIL)OSSO]-2-[(Z)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]  
BENZENE 2a**

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come fase eluente CHCl<sub>3</sub>/n-Esano 8:2, ottenendo un olio giallo.

**Resa:** 30%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.88 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.57 (d, 1H, *J* = 12.3 Hz, CH); 6.68-6.94 (m, 6H, Ar + CH); 6.98-7.07 (m, 3H, Ar); 7.11-7.24 (m, 3H, Ar) ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b>C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>
<b>Calc. %</b>	76.57	6.43
<b>Trov. %</b>	76.44	6.30

➤ **1-[(2,3,4-TRIMETOSSIBENZIL)OSSO]-2-[(Z)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]  
BENZENE 3a**

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando come fase eluente AcOEt/n-Esano 2:8, ottenendo un olio giallo.



**Resa:** 58%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.60 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.84 (s, 9H, OCH<sub>3</sub>); 5.04 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.60 (d, 1H, *J* = 12.6 Hz, CH); 6.65-6.85 (m, 7H, Ar + CH); 6.95 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz, Ar); 7.07-7.27 (m, 3H, Ar) ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b>C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>
<b>Calc. %</b>	73.87	6.45
<b>Trov. %</b>	73.75	6.33

➤ **1-[(3-METOSSIBENZIL)OSSI]-2-[(*E*)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]  
BENZENE 1b**

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando come fase eluente AcOEt/n-Esano 1:9, ottenendo un solido cristallino.

**Resa:** 30%

**P.f.:** 100-102°C

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.84 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 5.89 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.79-6.84 (m, 1H, Ar); 6.99-7.12 (m, 7H, Ar); 7.22-7.31 (m, 4H, Ar + CH); 7.42 (d, 1H, *J* = 16.5 Hz, CH); 7.63 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, Ar) ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b>C<sub>23</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>
<b>Calc. %</b>	79.74	6.40
<b>Trov. %</b>	79.61	6.27

➤ **1-[(2,3-DIMETOSSIBENZIL)OSSI]-2-[(E)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]  
BENZENE 2b**

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando come fase eluente CHCl<sub>3</sub>/n-Esano 7:3, ottenendo un olio giallo.

**Resa:** 40%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.89 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 5.21 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.79 (dd, 1H, *J* = 2.6, 8.1 Hz, Ar); 6.89-7.15 (m, 8H, Ar); 7.19-7.29 (m, 2H, Ar + CH); 7.53 (d, 1H, *J* = 16.7, CH); 7.58-7.63 (m, 1H, Ar) ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b>C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>
<b>Calc. %</b>	76.57	6.43
<b>Trov. %</b>	76.44	6.30

➤ **1-[(2,3,4-TRIMETOSSIBENZIL)OSSI]-2-[(E)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL]  
BENZENE 3b**

Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia su colonna utilizzando come fase eluente CHCl<sub>3</sub>/n-Esano 7:3, ottenendo un solido di colore marrone-chiaro.

**Resa:** 67%

**P.f.:** 70-72°C

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.85 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.08 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.71 (s, 2H, Ar); 6.78-6.83 (m, 1H, Ar); 6.95-7.12 (m, 4H, Ar); 7.17-7.29 (m, 3H, Ar, CH); 7.55 (d, 1H, *J* = 16.8 Hz, CH); 7.62 (dd, 1H, *J* = 1.5, 7.5 Hz, Ar) ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b>C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>
<b>Calc. %</b>	73.87	6.45
<b>Trov. %</b>	73.75	6.33

**SCHEMA 2****SINTESI DEI DI- E TRI-METOSSIBENZILALCOL 9,10**

Ad una soluzione dell'opportuna benzaldeide **7** o **8** (3.57 mmoli) in MeOH (9 ml), raffreddata a -10°C, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di NaBH<sub>4</sub> (0.13 g; 3.57 mmoli) in H<sub>2</sub>O (3ml). La miscela risultante è stata posta sotto agitazione e a temperatura ambiente per 18 ore. Trascorso tale periodo il solvente è stato evaporato a p.r. e la fase acquosa risultante è stata estratta con CHCl<sub>3</sub>. La fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata ottenendo i grezzi **9,10** che sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

**2,3-DIMETOSSIBENZILALCOL 9**

**Resa:** 68%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.89 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.70 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.86-6.94 (m, 2H, Ar); 7.02-7.09 (m, 1H, Ar) ppm.

**3,4,5-TRIMETOSSIBENZILALCOL 10**

**Resa:** 60%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.87 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 4.63 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.60 (s, 2H, Ar) ppm.

**SCHEMA 2****SINTESI DEI DI- E TRI-METOSSIBENZILBROMURI 11,12**

Ad una soluzione dell'opportuno metossibenzilalcol **9** o **10** (15.24 mmoli) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) raffreddata a 0°C, sono stati aggiunti CBr<sub>4</sub> (7.57 g; 22.83 mmoli) e PPh<sub>3</sub> (5.99 g; 2.83 mmoli). La soluzione risultante è stata posta a temperatura ambiente per 24 ore, quindi è stata lavata con H<sub>2</sub>O, HCl 1N. La fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata ottenendo un grezzo che è stato triturato in Et<sub>2</sub>O.

**2,3-DIMETOSSIBENZILBROMURO 11**

**Resa:** 85%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.57 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.85-7.07 (m, 3H, Ar) ppm.

**3,4,5-TRIMETOSSIBENZILBROMURO 12**

**Resa:** 85%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.86 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 4.46 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.61 (s, 2H, Ar) ppm.

---

## BIBLIOGRAFIA

- [1]: Dean M., Hamon Y., Chimini G., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *J. Lipid Res.* 42 (2001), 1007-1017
- [2]: Gottesman M., Ambudkar S., Overview: ABC transporters and human disease, *J. Bioenerg. Biomemb.* 33 (2001), 453-458
- [3]: Wang R.B., Kuo C.L., Lien L.L., Lien E.J., *J. Clin. Pharm. Ther.* 28 (2003) 203-228
- [4]: Lacombe P.S., Vicente J.A.G., Pagès J.G., Morselli P.L., *Drugs* (1996), 51, 552-570
- [5]: Fromm M.F. et al., The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans, *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2002), 54, 1295-1310
- [6]: Buchler M., König J., Brom M., Kartenbeck J., Spring H., Hone T., Keppler D., cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15091-15098
- [7]: Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V., Krogmann T., Gao Y., Rishi A.K., Ross D.D., A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 15665-15670
- [8]: Loo W., Barlett M.C., Clarke D.M., *J. Biol. Chem.*, (2003), 278, 20449-20452
- [9]: Pérez-Tomás R., Multidrug Resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment, 2006, 1859
- [10]: Jones P.M., Gorge A.M., (2000) *Eur. J. Biochem.*, 267, 5928-5305

- [11]: Ambudkar S.V., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1999, 361
- [12]: Ramachandra M., *Biochemistry*, 1998, 5010
- [13]: Sauna Z.E., *Biol. Chem.*, 2001, 11653
- [14]: Bradshaw D.M., Arceci R.J., Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance, *J. Clin. Oncol.*, 1998, 3674-3690
- [15]: Lin J.H. et al., Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications, *Clin. Pharmacokinet.* (2003) 42, 59-98
- [16]: Mouly S., P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine, *Pharm. Res.* (2003) 20, 1595-1599
- [17]: Mayer U. et al., Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the MDR 1a P-glycoprotein, *Br. J. Pharmacol.* 1996; 119: 1038-44; Mayer U. et al., Full blockade of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC833, *J. Clin. Invest.* 1997; 100: 2430-36
- [18]: Chico I., Kang M.H., Bergan R., Abraham J., Bakke S., Meadows B., Rutt A., Robey R., Choyke P., Merino M., Goldspied B., Smith T., Steinberg S., Figg W.D., Fpjo T., Bates S., Phase I study of infusional paclitaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist PSC833, *J. Clin. Oncol.* (2001) 19, 832-842
- [19]: De Boer A.G. et al., The role of drug transporters at the blood-brain barrier, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2003; 43: 629-56
- [20]: Tsuji A. et al., Blood-brain barrier function of P-glycoprotein, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 25: 287-98

- [21]: Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., Rittman-Grauer L., Biedler J.L., Melamed M.R., Bertino J.R., Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at bloodbrain barrier sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 695-698
- [22]: Sadeque A.J. et al., Increased drug delivery to the brain by P-glycoprotein inhibition, *Clin. Pharmacol. Ther.* 2000; 68: 231-37
- [23]: Garberg P., In vitro models of the blood-brain barrier, *Atla Alternatives to Laboratory Animals* 26 (1998) 821-847
- [24]: van Asperen J., Mayer U., van Tellinger O., Beijnen J.H., The functional role of P-glycoprotein in the blood-brain barrier, *Pharm. Sci.* 86 (1997), 881-884
- [25]: van Asperen J., Mayer U., van Tellinger O., Beijnen J.H., The role of MDR-1a P-Glycoprotein in the biliary and intestinal secretion of doxorubicin and vinblastine in mice, *Drug Metab. Dispos.* 28 (2000), 264-267
- [26]: Nakamura Y., Ikeda S., Furukawa T., Sumizawa T., Tani A., Akiyama S., Nagata Y., Function of P-Glycoprotein espresse in placenta and mole, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235 (1997), 849-853]
- [27]: Meijer D.K.F., Smit J.W., Muller M., Hepatobiliary elimination of cationic drugs: the role of P-gp and other Atp-dependent transporters, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 25 (1997) 159-200
- [28]: Rapposelli S., Digiacomo M., Balsamo A., P-gp transporter and its role in neurodegenerative diseases, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2009, 9, 209-217
- [29]: Colabufo N.A., Berardi F., Cantore M., Contino M., Inglese C, Niso M., Perrone R., Perspectives of P-Glycoprotein Modulating Agents in Oncology and Neurodegenerative Diseases: Pharmaceutical, Biological, and Diagnostic Potentials, *J. Med. Chem.* 2010, 53, 1883-1897



- [30]: Fernandez C., Buyse M., German-Fattal M., Gimenez F., Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2004, 7, 359-371
- [31]: Alafuzoff I., Iqbal K., Friden H., Adolfsson R., Winblad B., Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis, *Acta Neuropathol.* 1987, 74, 209-225
- [32]: Arriagada P.V., Marzloff K., Hyman B.T., Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease, *Neurology* 1992, 42, 1681-1688
- [33]: Vogelgesang S., Cascorbi I., Schroeder E., Pahnke J., Kroemer H.K., Siegmund W., Kunert-Keil C., Walker L.C., Deposition of amyloid is inversely correlated with the expression of P-glycoprotein-implications on the possibility of prevention of Alzheimer's disease, *Acta Neuropathol.* 2001, 102, 545
- [34]: Lam F.C., Liu R., Lu P., Saphiro A.B., Renoir J.M., Sharom F.J., Reiner P.B., Beta-amyloid efflux mediated by p-glycoprotein, *J. Neurochem.* 2001, 76, 1121-1128
- [35]: Cirrito J.R., Deane R., Fagan A.M., Spinner M.L., Parsadanian M., Finn M.B., Jiang H., Prior L., Sagare A., Bales K.R., Paul S.M., Zlokovic B.V., Pivnicka-Worms D., Holtzman D.M., P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in Alzheimer disease mouse model, *J. Clin. Invest.* 2005, 115, 3285-3290
- [36]: Wood-Kaczmar A., Gandhi S., Wood N.W., Understanding the molecular causes of Parkinson's disease, *Trends Mol. Med.* 2006, 12, 521-528
- [37]: Bain L.J., LeBlanc G.A., Interaction of structurally diverse pesticides with the human MDR1 gene product P-glycoprotein, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996, 141, 288-298
- [38]: Rajput A.H., Environmental toxins accelerate Parkinson's disease onset, *Neurology* 2001, 56, 4-5

- [39]: Soares-Da-Silva P., Serrao M.P., Vieira-Coelho M.A., Pestana M., Evidence for the involvement of P-glycoprotein on the extrusion of taken L-Dopa in cyclosporine A treated LLC-PK1 cells, *Br. J. Pharmacol.* 1998, 123, 13-22
- [40]: Vautier S., Lacomblez L., Chacun H., Picard V., Gimenez F., Farinotti R., Fernandez C., Interactions between the dopamine agonist, bromocriptine and the efflux protein, P-glycoprotein at the blood-brain barrier in the mouse, *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006, 27, 167-74
- [41]: van Dellen A., Grote H.E., Hannan A.J., Gene-environment interactions, neuronal dysfunction and pathological plasticity in Huntington's disease, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005, 32, 1007-1019
- [42]: Vogelgesan S., Glatzel M., Cerebrovascular P-glycoprotein expression is decreased in Creutzfeldt-Jacob disease, 2006, *III*, 436-443
- [43]: Patassini S., Giampà C., Effects of simvastatin on neuroprotection and modulation of Bcl-2 and BAX in the rat quinolinic acid model of Huntington's disease, *Neurosci. Lett.* , 2008, 448, 166-169
- [44]: Mulder D.W., Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis, *Adv. Neurol.*, 1982, 36, 15-22
- [45]: Cleveland D.W., Rothstein J.D., From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001, 2, 806-819
- [46]: Bruijn L.I. Cudkovicz M., Therapeutic targets for amyotrophic lateral sclerosis: current treatments and prospects for more effective therapies, *Expert. Rev. Neurother.*, 2006, 6, 417-428
- [47]: Milane A. Fernandez C., Minocycline and riluzole brain disposition: interaction with P-glycoprotein at the blood-brain barrier, *J. Neurochem.*, 2007, 106, 164-173

- [48]: Regesta G. Tanganelli P., Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies, *Epilepsy Res.*, 1999, 34, 109-122
- [49]: Yang, Z.H. Liu X.D., P-glycoprotein mediated efflux of phenobarbital at the blood-brain barrier evidence from transport experiments *in vitro*, *Epilepsy Res.*, 2008, 78, 40-49
- [50]: Brandt C., Bethmann K., The multidrug transporter hypothesis of drug resistance in epilepsy: proof-of-principle in a rat model of temporal lobe epilepsy, *Neurobiol. Dis.*, 2006, 24, 202-211
- [51]: Bogman K., *Pharmacol.*, 2001, 1183
- [52]: Colabufo N., Multidrug resistance: biological and pharmaceutical advances in antitumour treatment, 2008, 68
- [53]: Krishna R., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2000, 265
- [54]: Thomas H., *Cancer control*, 2003, 159
- [55]: Krishna R., Multidrug resistance (MDR) in cancer, 2000, 265
- [56]: Haussermann K., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 1991, 53
- [57]: Wandel C., *Cancer Res.*, 1999, 3944
- [58]: Bunting K.D., *Stem cells*, 2002, 11
- [59]: Limtrakul P., *BMC Cancer*, 2004, 13
- [60]: Nobili S., *Curr. Drug. Targets.*, 2006, 861

- 
- [61]: Dantzig A.H., Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities, 1999, 854
- [62]: Mistry P., *Cancer Res.*, 2001, 749
- [63]: Martin C., *Br. J. Pharmacol.*, 1999, 403
- [64]: Dantzig A.H., *Curr. Med. Chem.*, 2001, 39
- [65]: Morschhauser F., *Leuk. Lymphoma*, 2007, 708
- [66]: Sikic B.J., Modulation of multidrug resistance: a paradigm for translational clinical research, 1999, 183
- [67]: Fischer V., The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A4, 1998, 802]
- [68]: Harbone J.B., *Phytochemistry*, 2000, 481
- [69]: Zhang S., *Mol. Pharmacol.*, 2004, 1208
- [70]: Kitagawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, 1
- [71]: Conseil G., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 9831
- [72]: Kitagawa S., *Biol. Pharm. Bull.*, 2005, 2274
- [73]: Boumendjel A., *Med. Res. Rev.*, 2002, 512
- [74]: Thompsonm A.M., *J. Med. Chem.*, 2000, 4200

[75]: Ecker G.F., Intramolecular distribution of hydrophobicity influences pharmacological activity of propafenone-type MDR modulators, 2004, 328

[76]: Ecker G.F., Recent Res. Devel. Medicinal Chem., 2001, 121; Pajeva I.K., Quant. Struct.-Act. Relat., 1998, 301

[77]: Colabufo N. A., Berardi F., Perrone R., Rapposelli S., Digiacomio M., Vanni M., Balsamo A.; J. Med. Chem., 2008, 51 (23), 7602-761

[78]: Colabufo, Multidrug Resistance: biological and pharmaceutical advances in antitumour treatment, 2008, 210

[79]: Baur J.A., Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence, 2006, 493

[80]: Riviere C., New polyphenols active on beta-amyloid aggregation, 2008, 828

---

## INDICE

<b>INTRODUZIONE GENERALE</b> .....	3
• IL TRASPORTO DI FARMACI PER MEZZO DEI TRASPORTATORI ABC.....	4
• STRUTTURA DELLA GLICOPROTEINA P.....	7
• CARATTERISTICHE FARMACOLOGICHE DELLA P-GP.....	11
• P-GP E MALATTIE NEURODEGENERATIVE.....	16
• MODULATORI DELLA P-GP.....	20
<b>INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE</b> .....	28
<b>PARTE SPERIMENTALE</b> .....	35
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	46

## **RINGRAZIAMENTI**

*A mio marito Simone, per non avere mai dubitato di me ed essermi stato accanto con amore nei momenti belli e in quelli brutti.*

*A mia madre Marina e mio padre Damiano, per avermi dato tutto l'affetto e il sostegno che mi hanno permesso di diventare ciò che sono oggi.*

*A mio nonno Domenico, che anche se oggi non potrà essere tra noi materialmente sarà orgoglioso di me, ovunque sia.*

*A mia nonna Lucia, mia zia Loredana e mia cugina Sara, per aver atteso questo momento con tanto entusiasmo ed avermi incoraggiata.*

*Ai miei suoceri Laura e Lorianò, mio cognato Andrea e i miei nonni adottivi Marilena e Adriano, per aver sempre creduto in me ed avermi spronato ad arrivare fino in fondo.*

*A tutta la mia famiglia, in particolare mia zia Ornella e mio zio Umberto, che non vedevano l'ora di avere la loro dottoressa.*

*A tutti i miei amici, in particolare Nausicaa, Erica, Arianna e Simone, per avermi aiutato a superare i momenti difficili con un sorriso.*

*A Giulia e alla dottoressa Rapposelli, per tutta la pazienza con cui mi hanno aiutata a terminare il mio percorso universitario.*