

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA



FACOLTA' DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di laurea

***SINTESI DI NUOVI LIGANDI DUALI
AD ATTIVITÀ P-GP MODULATORIA E NO-RILASCIANTE
UTILI PER LA PREVENZIONE E/O LA TERAPIA DI PATOLOGIE
NEURODEGENERATIVE***

Candidata

Erica Bertini

Relatori

Dott.ssa Simona Rapposelli

Prof.ssa Annalina Lapucci

Correlatori

Dott.ssa Giulia Nesi

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Alla mia famiglia

INTRODUZIONE
GENERALE

I TRASPORTATORI ABC (ATP-BINDING CASSETTE)

La superfamiglia di proteine transmembranalì ATP-dipendenti, detta ATP-binding cassette (ABC), rappresenta la piú ampia famiglia di trasportatori presenti a livello umano.

Attualmente sono noti 49 geni per i trasportatori ABC, raggruppati in 7 sottofamiglie: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG che differiscono per l'organizzazione dei domini aminoacidici.

Questi trasportatori sono coinvolti nella farmaco-resistenza caratteristica di alcune malattie, come ad esempio tumori resistenti ai farmaci, fibrosi cistica, la malattia di Stargardt, la sindrome di Dubin-Johnson, la malattia di Byler, l'atassia ed altre patologie .

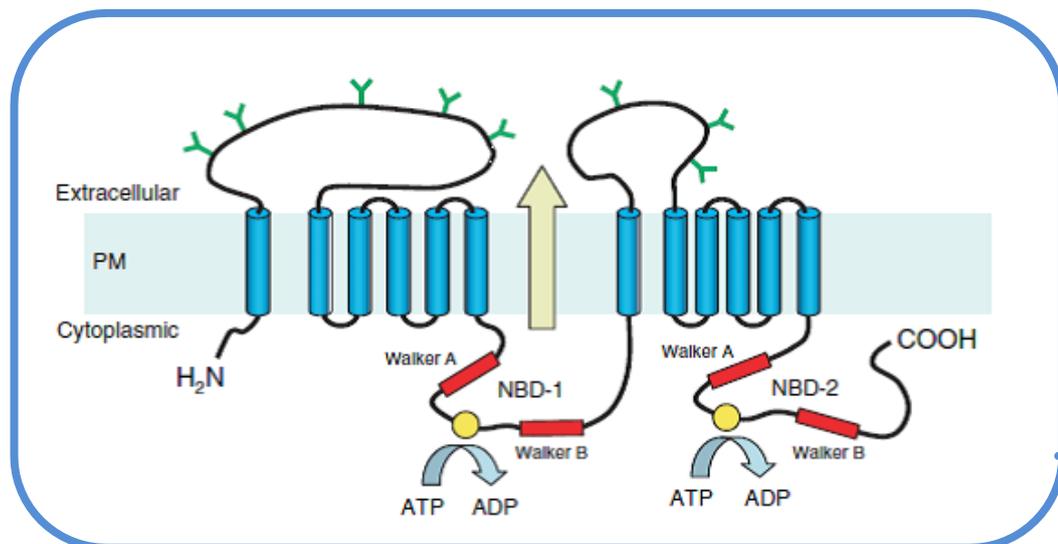


Fig. 1: Struttura generale dei trasportatori ABC.

I trasportatori ABC possiedono alcune regioni intracellulari altamente conservate in tutte le specie viventi, che possono essere organizzate in due domini: domini leganti nucleotidi (NBDs), che sono responsabili dell'idrolisi dell'ATP, richiesto per trasportare i substrati contro gradiente di concentrazione; e domini idrofobici transmembranalì (TMDs) che sono coinvolti nel riconoscimento e nel legame di diverse sostanze .

Il ruolo fisiologico delle proteine ABC consiste nel proteggere l'organismo dall'accumulo di sostanze dannose, trasferendole dal citoplasma delle cellule al compartimento extracellulare per facilitarne l'escrezione tramite urina o bile. Questi trasportatori regolano il passaggio di xenobiotici attraverso numerose barriere fisiologiche: la barriera emato encefalica, la placenta, lo stomaco, l'intestino, il fegato. In particolare li troviamo sia sulla membrana plasmatica delle cellule, sia sulle membrane intracellulari di endosomi, lisosomi, mitocondri, reticolo endoplasmatico e apparato del Golgi ¹.

Tra i molteplici substrati che queste proteine possono trasportare vi sono, metalli, ioni organici, peptidi, steroidi, polisaccaridi, amminoacidi, vitamine, acidi biliari, farmaci e xenobiotici .

Dei numerosi trasportatori ABC, il trasportatore ABCB1, noto anche come glicoproteina P (P-gp) ha suscitato grande interesse in campo farmacologico.

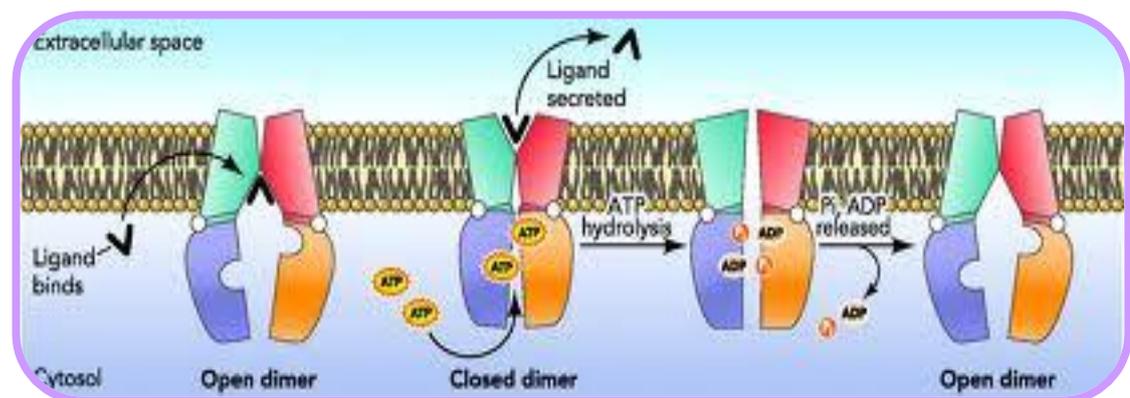


Fig. 2: Meccanismo d'azione dei trasportatori ABC1.

LA GLICOPROTEINA P

La glicoproteina P (P-gp) viene codificata dal gene ABCB1 o MDR1 (multidrug resistance 1), dislocato sul cromosoma 7, ha peso molecolare di circa 170 KD, e la sua struttura principale è composta da 1280 amminoacidi organizzati in due regioni ripetute di 610 aa, ciascuna legata da un linker di 60 aa².

La P-gp è una proteina transmembranale specifica che ha un'ampia distribuzione nella barriera emato-encefalica, in particolare sulla superficie luminale dell'endotelio vascolare cerebrale e nel plesso corioideo e limita o previene l'azione di molti xenobiotici, agenti chemioterapici, piccoli peptidi, antibiotici, inibitori della proteasi dell'HIV e farmaci antidepressivi nel sistema nervoso centrale³.

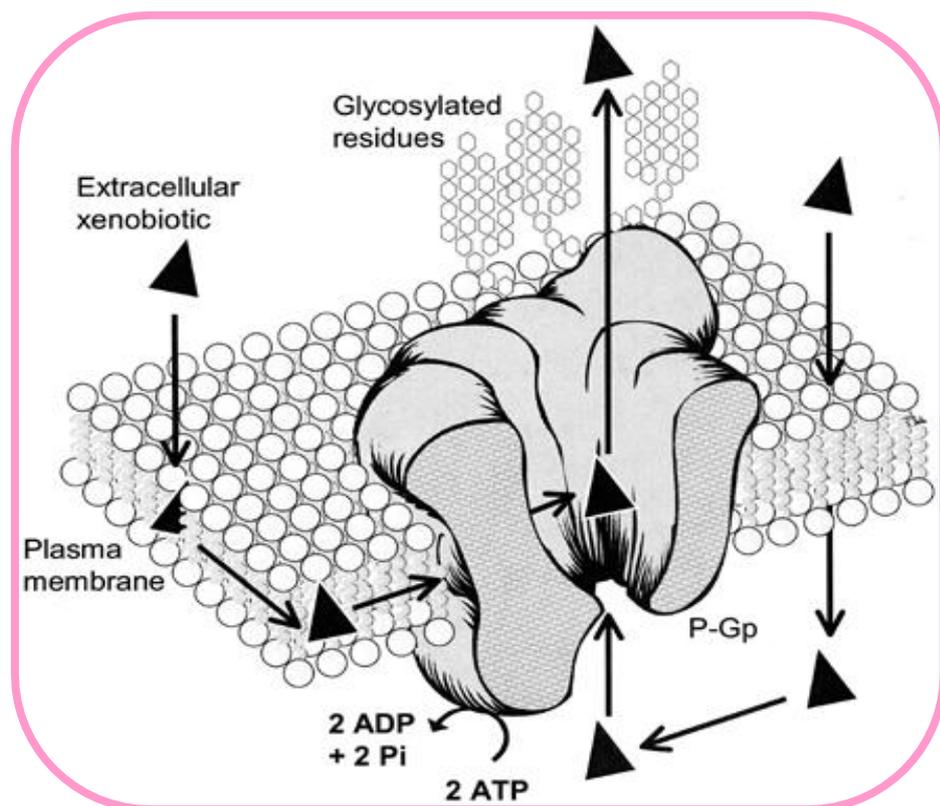


Fig. 3a: Struttura tridimensionale della P-gp.

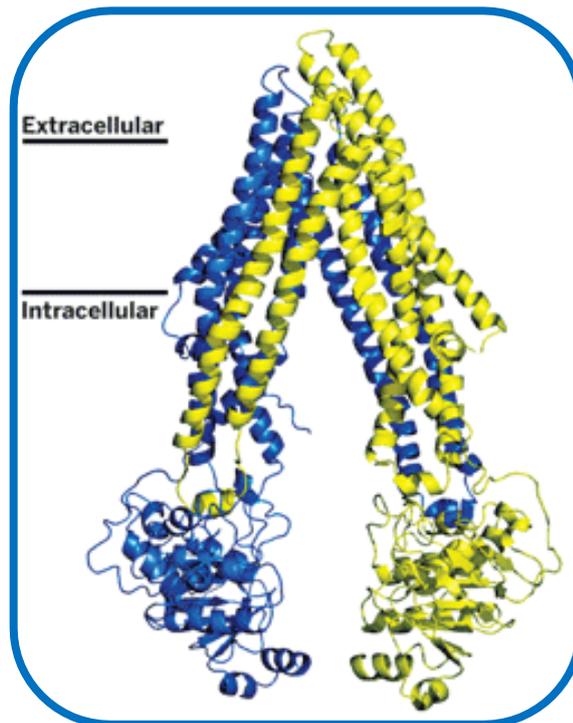


Fig. 3b: Struttura cristallina della P-gp.

Struttura della P-gp

Studi biochimici dimostrano che le due metà di cui è costituita sono strutturalmente omologhe, entrambe sono formate da:

- un dominio transmembrana detto TMD, caratterizzato da 6 α -eliche e una porzione N-terminale idrofila (il TMD rappresenta il principale sito di interazione per i farmaci);
- un dominio di legame per l'ATP chiamato NBD (Nucleotide Binding Domain),
- tre porzioni C-terminali intracellulari idrofile, che collegano i TMD agli NBD.

I TMD della glicoproteina sono costituiti da 12 α -eliche transmembrana che attraversano il doppio strato lipidico sei volte e sono responsabili della formazione del canale che permette il passaggio di un substrato, a seguito di un cambiamento conformazionale.

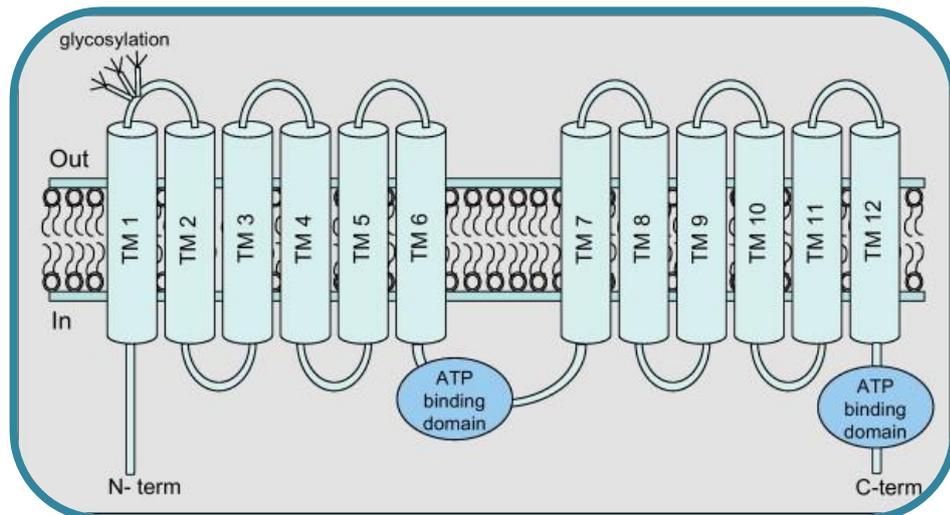


Fig. 4: Struttura glicoproteina P.

La conformazione dei segmenti TMD (TMD1 segmenti da 1 a 6, TMD2 segmenti da 7 a 12) e del sito di legame è variabile perché le sequenze amminoacidiche, nella porzione intramembranaria, sono poco conservate, ed è questa caratteristica che consente il legame di substrati strutturalmente diversi.

I domini NBD sono localizzati nella parte citoplasmatica della membrana, hanno sequenze amminoacidiche altamente conservate e presentano due siti di legame per l'ATP.

Meccanismo d'azione della P-gp

La P-gp è una pompa di efflusso ATP-dipendente per molte sostanze esogene ed endogene aventi un peso molecolare superiore a 500 Dalton, un'elevata idrofobicità ed eventualmente un azoto basico.

Riveste un ruolo importante nella protezione dei tessuti con funzioni escretorie e/o di barriera come ad esempio intestino, rene e fegato ⁴.

Il meccanismo attraverso il quale la glicoproteina P estrude le molecole dalla cellula può essere descritto in due stadi che sono associati a diverse conformazioni della proteina:

- conformazione con un orientamento prevalentemente verso il lume della cellula, dove si ha il sito di legame per i substrati libero e accessibile;
- conformazione con un orientamento prevalentemente verso l'ambiente extracellulare con esposizione di una tasca di estrusione.

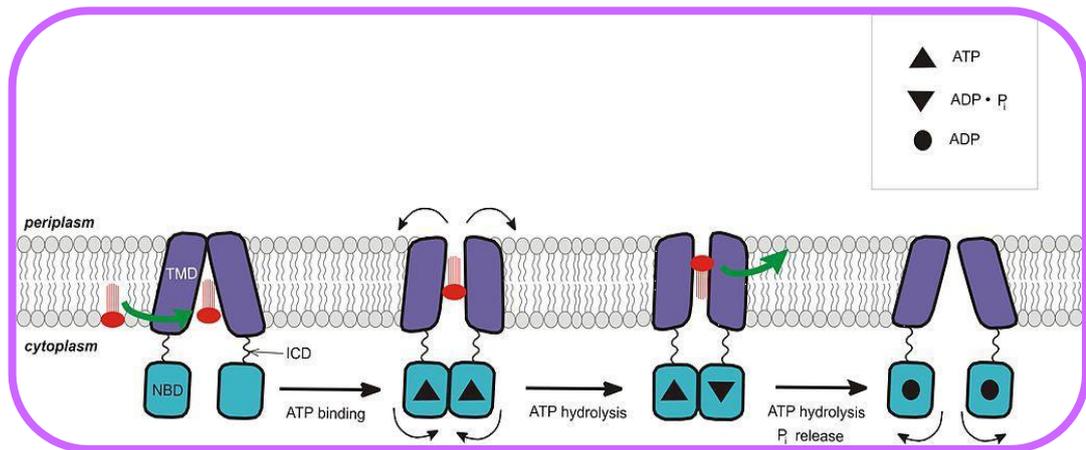


Fig. 5: Meccanismo d'azione generale della P-gp.

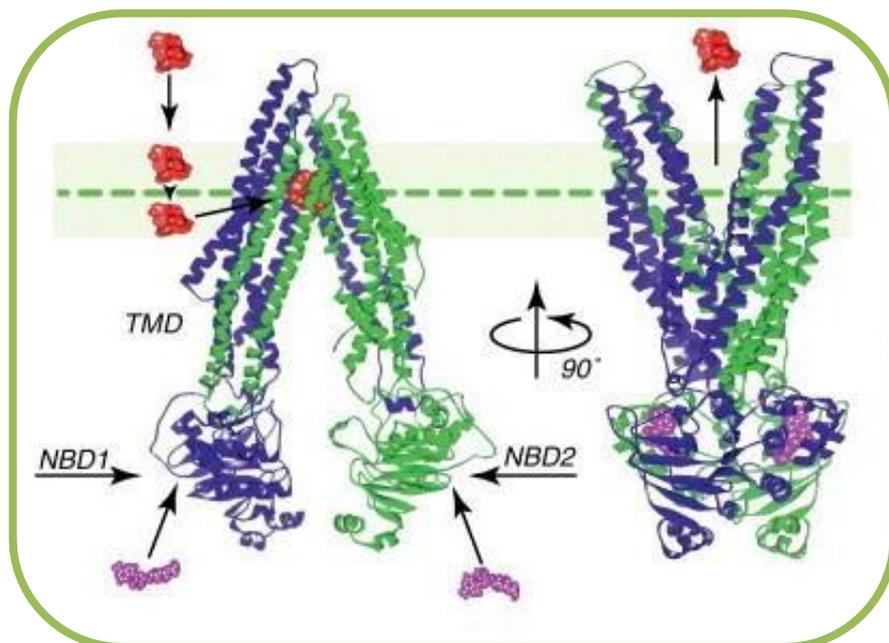


Fig. 6: Cambiamento conformazionale della P-gp.

Ciò che determina il cambiamento conformazionale è il legame con l'ATP; quando la proteina lega l'ATP provoca la formazione di strette interazioni fra gli NBDs, che a loro volta determinano un cambiamento a livello dei TMDs, che porta alla conformazione rivolta verso l'extracellulare. Una volta che si è verificata l'idrolisi da ATP in ADP si ha un ritorno alla conformazione con orientamento verso l'interno della cellula, consentendo alla proteina di legarsi ad un altro substrato.

La glicoproteina P può comportarsi in modi diversi nell'estrudere il farmaco dalla cellula; ad oggi sono stati individuati due meccanismi:

- modello a flippasi: la P-gp conduce i farmaci dal compartimento interno citoplasmatico a quello esterno, contro gradiente di concentrazione. Il legame di un substrato con i domini TMD attiva uno dei domini di legame con l'ATP (NBD), e l'idrolisi determina un cambiamento conformazionale nella struttura della P-gp, che porta all'estrusione del substrato stesso dalla cellula. L'idrolisi della seconda molecola di ATP è necessaria per ristabilire la conformazione del trasportatore al suo stato originario⁵;
- 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, e da questo diffondono nel mezzo extracellulare.

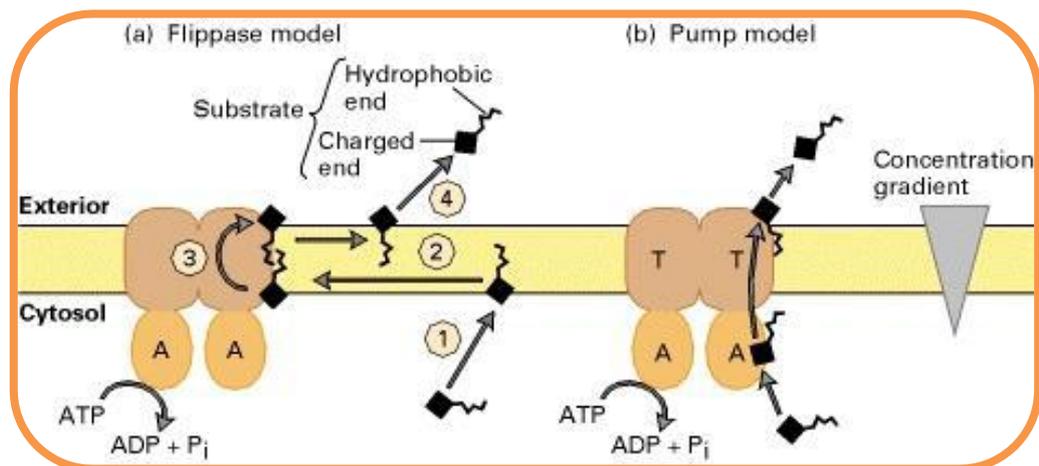


Fig. 7: Modello a flippasi della P-gp (a), modello a pompa della P-gp (b).

LOCALIZZAZIONE E RUOLO DELLA P-gp

La P-gp viene espressa sulla superficie luminale degli organi adibiti all'assorbimento, alla distribuzione, al metabolismo e all'eliminazione dei farmaci. La sua funzione principale in tutti questi siti è di protezione dei tessuti nei confronti di sostanze tossiche.

L'attività della P-gp viene espressa tramite tre vie:

- limitazione dell'assorbimento del farmaco: per trasferimento del substrato dagli enterociti al lume intestinale e la sua successiva eliminazione con le feci;
- eliminazione attiva: per trasferimento del substrato dalle cellule del tubulo prossimale al lume tubulare e la sua successiva eliminazione con le urine o per trasferimento del substrato dagli epatociti alla bile;
- limitazione della distribuzione del farmaco 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 da qui al sangue materno ⁶.

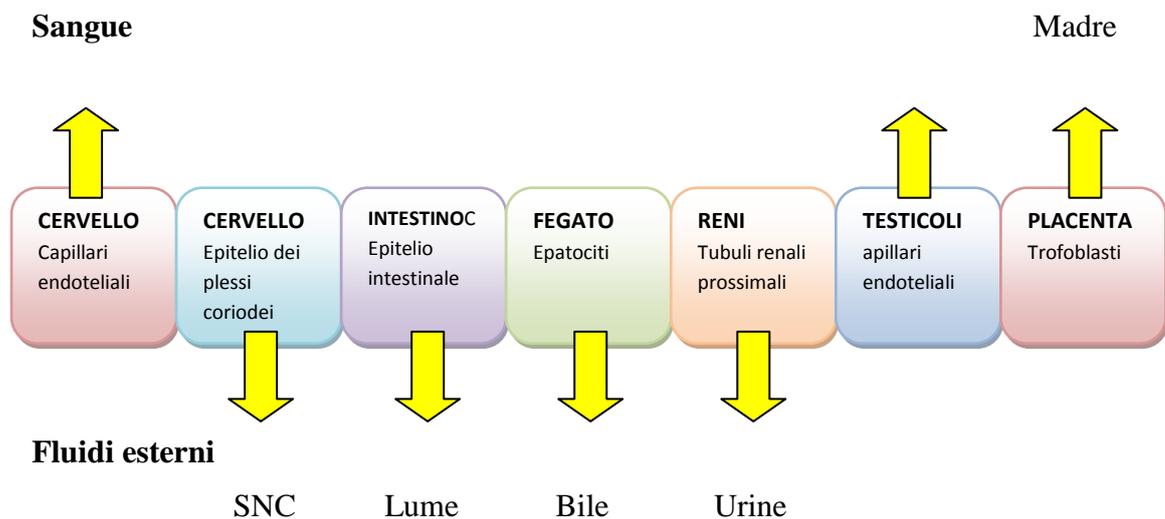


Fig. 8: Tessuti dove è espressa la glicoproteina-P.

P-gp e le barriere cerebrali

La barriera ematoencefalica (BEE) è una barriera fisica e metabolica tra la materia cerebrale e la circolazione sistemica, ed è adibita alla regolazione ed alla protezione del cervello dalle sostanze inquinanti ⁷.

E' composta da cellule endoteliali localizzate a livello dei capillari (Fig. 9) che sono circondate da una matrice extracellulare (membrana vasale), da periciti e da astrociti fondamentali per la struttura della barriera.

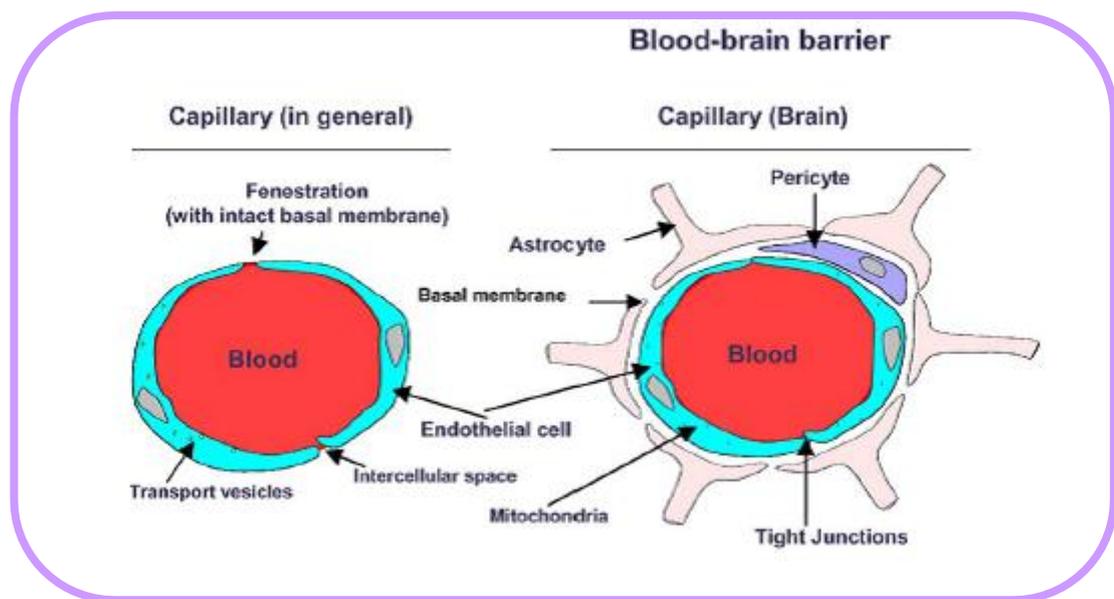


Fig. 9: Struttura dei capillari cerebrali.

La limitazione dell'assorbimento cerebrale attraverso la BEE nasce dalla presenza di giunzioni strette tra le cellule endoteliali adiacenti e una relativa scarsità di fenestrature nell'endotelio delle arteriole e delle venule cerebrali.

Le molecole che circolano nel sangue possono accedere al cervello solo tramite trasporto lipidico-mediato, se si tratta di piccole molecole non polari, per diffusione passiva o per trasporto catalizzato.

I farmaci sono trasportati attraverso la BEE secondo le loro caratteristiche chimico-fisiche come lipofilia, peso molecolare e stato ionico, ma alcuni nonostante le loro proprietà hanno una permeabilità minore di quella ipotizzata.

Questo può essere spiegato con la presenza di numerose proteine trasportatrici, come la P-gp, presenti sulle membrane luminali delle cellule del rivestimento endoteliale dei capillari, che estrudono i farmaci dal SNC ⁷.

E' stato dimostrato che la P-gp è espressa in quattro differenti tipi cellulari: le cellule endoteliali dei capillari cerebrali, gli astrociti perivascolari e parenchimali, e i neuroni; ciò suggerisce che le funzioni della P-gp nel cervello sono molto complesse.

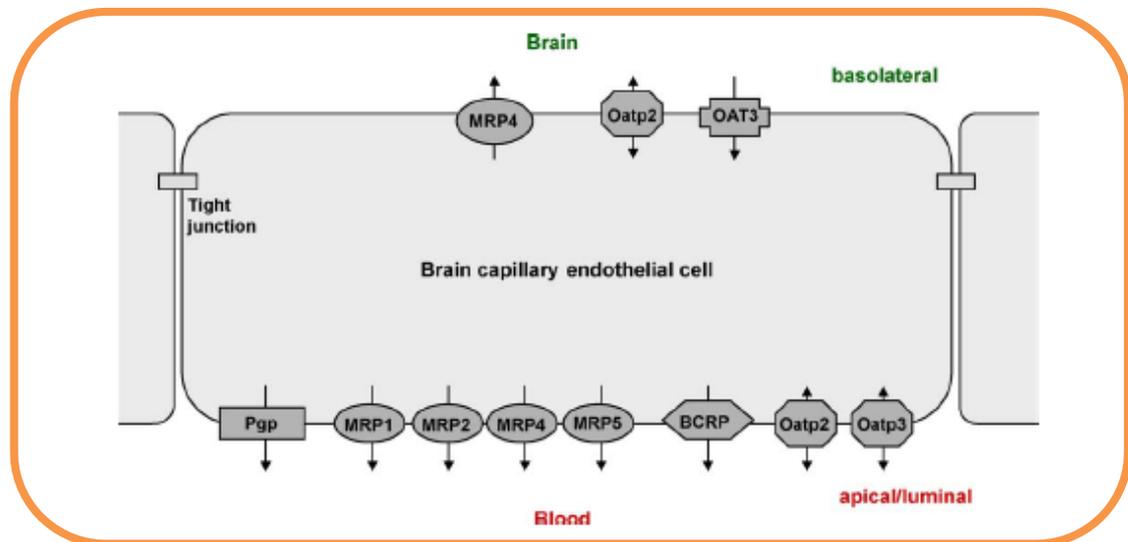


Fig. 10: Collocazione della P-gp ed altre proteine MDR sulla membrana cellulare delle cellule endoteliali cerebrali.

La seconda barriera è quella tra sangue e liquido cefalorachidiano; è costituita dai plessi corioidi, dalla membrana arachnoide e dagli organi periventricolari.

La P-gp è localizzata sulla membrana apicale dell'epitelio dei plessi corioidi, e trasporta le sostanze verso il liquido cefalorachidiano (LCR). Poiché il LCR refluisce nel sangue venoso, i farmaci possono venire restituiti al circolo ematico prima ancora che facciano in tempo ad equilibrarsi con il liquido interstiziale cerebrale e a diffondere in esso.

Il limitato passaggio attraverso le barriere cerebrali può rappresentare un ostacolo ad un'adeguata terapia farmacologica, per questo numerose ricerche suggeriscono che il blocco dell'attività della P-gp nel tessuto cerebrale, attraverso l'utilizzo di P-gp inibitori, potrebbe aumentare la concentrazione di molti farmaci all'interno delle cellule cerebrali, migliorando la loro biodisponibilità ⁷.

P-gp e la Placenta

Un'altra importante barriera sangue-tessuto è la membrana brush border (lato materno) delle cellule trofoblastiche.

Come altri organi, anche la placenta presenta espressioni di trasportatori di farmaci, inclusa la P-gp. Si ritiene ancora che questa glicoproteina contribuisca a proteggere il feto da involontarie esposizioni della madre a xenobiotici e ad eventuali terapie necessarie alla madre durante il periodo della gravidanza.

La proteina è presente per tutto il periodo della gravidanza, anche se sembra che la sua attività decresca progressivamente durante il corso della stessa, quindi la modulazione del farmacotrasportatore potrebbe contribuire ad ottimizzare terapie transplacentari, per esempio il trattamento con digossina di gravi tachiaritmie fetali.

P-gp E LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

La P-gp esercita una funzione protettiva nei confronti del sistema nervoso centrale, evitando l'accumulo di sostanze tossiche, accompagnata ad una riduzione dell'effetto terapeutico dei farmaci utilizzati nel trattamento di malattie neurodegenerative³ e di alcuni tumori cerebrali.

Recentemente è stato dimostrato che la funzione cerebrovascolare della P-gp diminuisce con l'avanzamento degli stadi delle malattie neurodegenerative come Parkinson e Alzheimer. Inizialmente in entrambe queste patologie si verifica una up-regulation dell'espressione della funzione della P-gp, conseguente al danneggiamento neuronale.

Quest'ultimo è indotto dall'incremento dell'accumulo di tossine, come succede nel morbo di Parkinson, o da una diminuita abilità della materia cerebrale ad espellere proteine che vi si sono accumulate, come nell'Alzheimer.

Un'iperpressione della P-gp è stata individuata anche nell'epilessia, in cui l'efflusso mediato dal trasportatore limita o riduce l'ingresso dei farmaci nel sistema nervoso centrale. Questo provoca una riduzione della risposta ai farmaci nei pazienti affetti da questa patologia³.

L'incremento dell'azione della P-gp negli stadi iniziali di queste malattie può quindi costituire un nuovo approccio terapeutico, utile per prevenire l'accumulo di componenti tossici e proteine responsabili dello sviluppo delle patologie ed aumentare l'efficacia di terapie già esistenti.

P-gp e Alzheimer

L'alzheimer (AD) è una malattia neurodegenerativa multifattoriale ed eterogenea caratterizzata da una progressiva perdita delle funzioni cognitive, che conduce alla demenza e talvolta alla morte. Le sue maggiori peculiarità sono:

- l'accumulo di aggregati di peptide β -amiloide ($A\beta$) nella materia cerebrale, che formano placche amiloidi insolubili nel cervello;
- formazione di grovigli di neurofibrille (NFTs), che sono composti da filamenti appaiati ad elica di τ -proteine fosforilate.

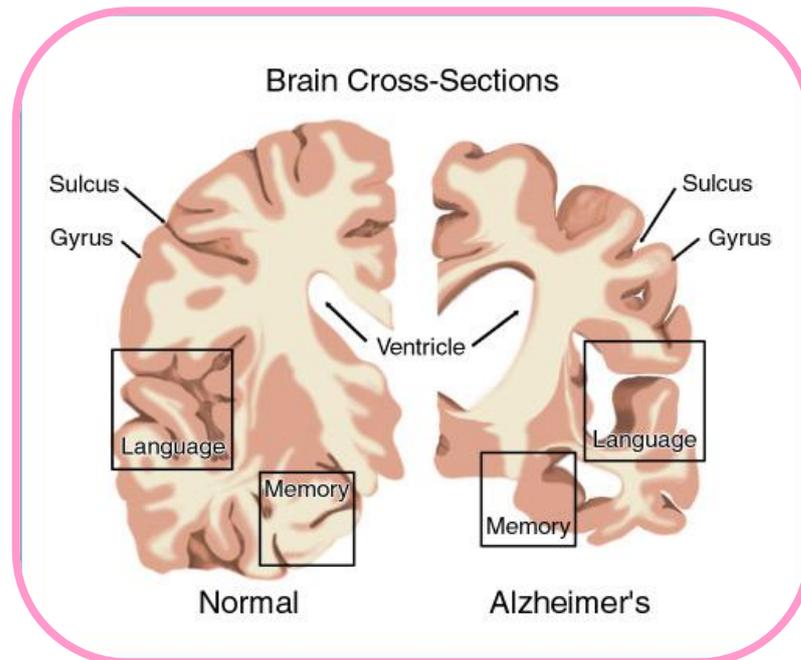


Fig. 11: Sezione di un cervello sano (sinistra) e sezione di un cervello affetto da AD (destra).

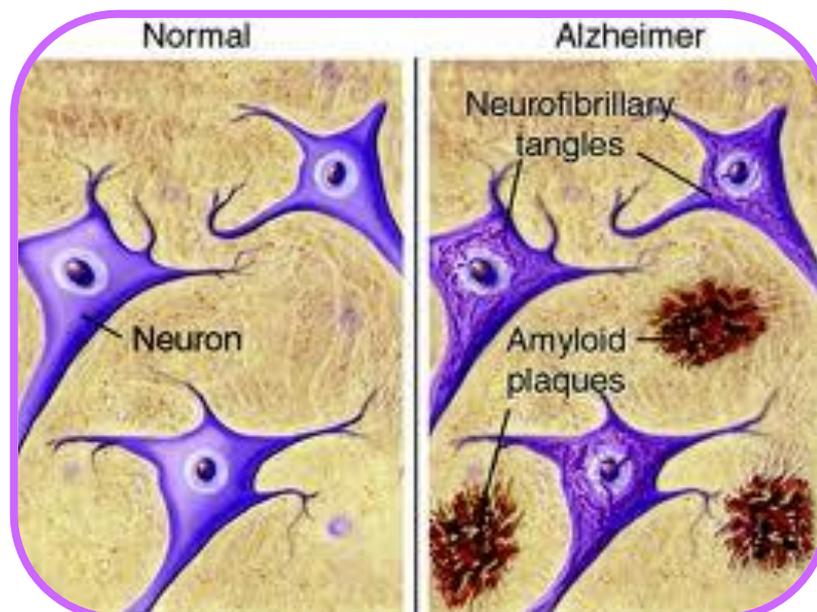


Fig. 12: Placche β -amiloidi caratterizzanti il AD.

Oggi sappiamo che la secrezione di β -amiloide è l'evento scatenante nella patogenesi dell'Alzheimer, mentre l'aggregazione delle τ -proteine può essere considerato un importante fattore secondario implicato nella neuro degenerazione^{8,9}.

La P-gp sembra essere direttamente coinvolta nella genesi delle placche β -amiloidi ($A\beta$). Per la precisione, vi è una correlazione inversamente proporzionale fra

l'attività e l'espressione della P-gp e la loro formazione. La glicoproteina, infatti, esercita un ruolo protettivo poiché facilita l'eliminazione delle A β dai neuroni. Ovviamente, una riduzione della sua espressione o della sua funzione aumentano esponenzialmente la possibilità che tali placche possano formarsi.

A sostegno di questa tesi, dati sperimentali indicano che, negli stadi iniziali dell'AD, vi è un up-regulation della P-gp mentre, negli stadi avanzati, la sua espressione è notevolmente ridotta³.

P-gp e Parkinson

Il Parkinson è una malattia neurodegenerativa incurabile caratterizzata dalla morte delle cellule dopaminergiche nella *substantia nigra* del mesencefalo e dal deterioramento dei neuroni catecolaminergici¹⁰. I sintomi caratteristici della malattia sono tremori, lentezza nei movimenti, rigidità e negli stadi più avanzati demenza e discinesia.

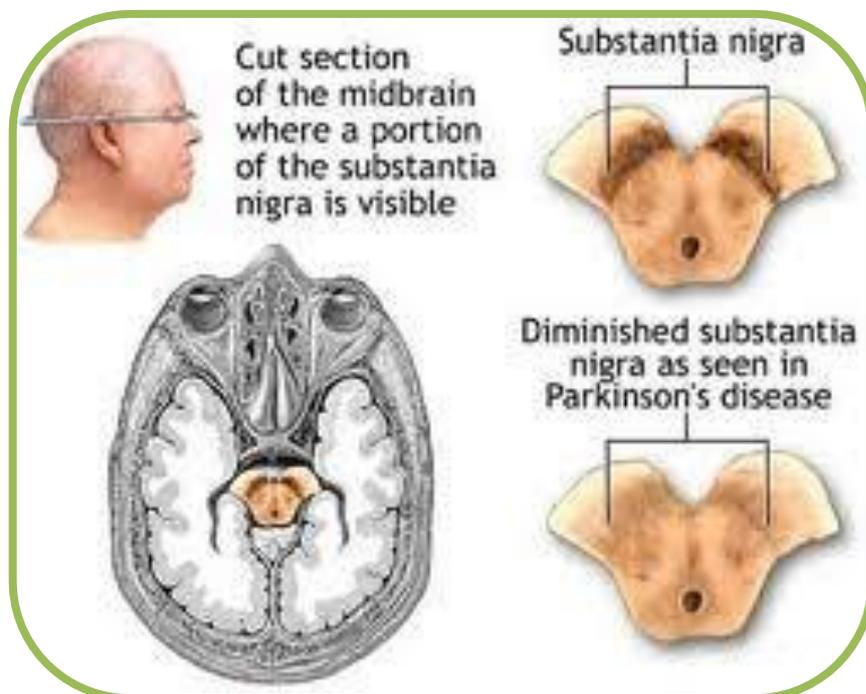


Fig. 13: Differenze relative alla sostanza "nigra" in un cervello sano (sopra) e in uno malato (sotto).

La patologia, è caratterizzata da una riduzione della formazione e dell'attività della dopamina.

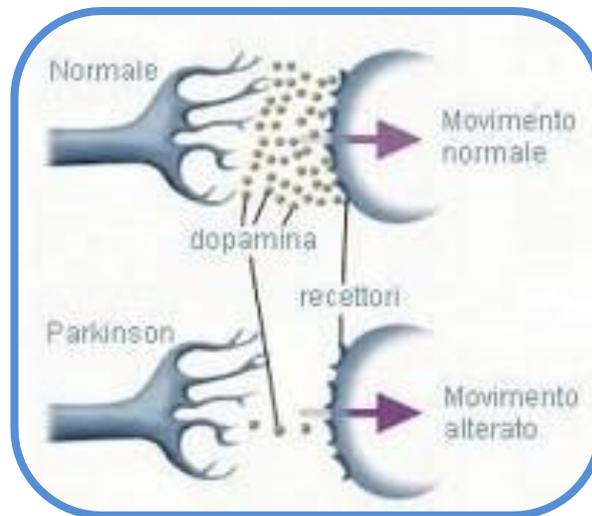


Fig. 14: Livelli di dopamina in un neurone normale e uno affetto da Parkinson.

Contemporaneamente, si verifica la formazione di aggregati di α -Sinucleina a livello dei neuroni definiti Corpi di Lewy. I Corpi di Lewy sono segni caratteristici della malattia e la loro distribuzione nel cervello affetto da morbo di Parkinson varia da individuo ad individuo. Alcuni studi hanno messo in relazione la comparsa di patologie neurodegenerative con alterazioni riguardanti l'espressione e/o l'attività della P-gp a livello cerebrale. Ad esempio, un decremento funzionale della glicoproteina, dovuto anche a fenomeni di polimorfismo sul C3435T del gene MDR1, potrebbero aumentare notevolmente la percentuale di incidenza del Parkinson, in quanto verrebbe meno l'azione di filtro della P-gp. In questo modo si verificherebbe un eccessivo accumulo di sostanze tossiche o degli stessi xenobiotici a livello cerebrale con conseguente comparsa della patologia.

P-gp ed Epilessia

L'Epilessia è un disordine neurologico caratterizzato da ricorrenti convulsioni generalizzate, derivanti da un'anormale ed eccessiva attività neuronale della sostanza grigia dell'encefalo. L'insieme dei neuroni dai quali partono le convulsioni è definito focolaio epilettogeno.

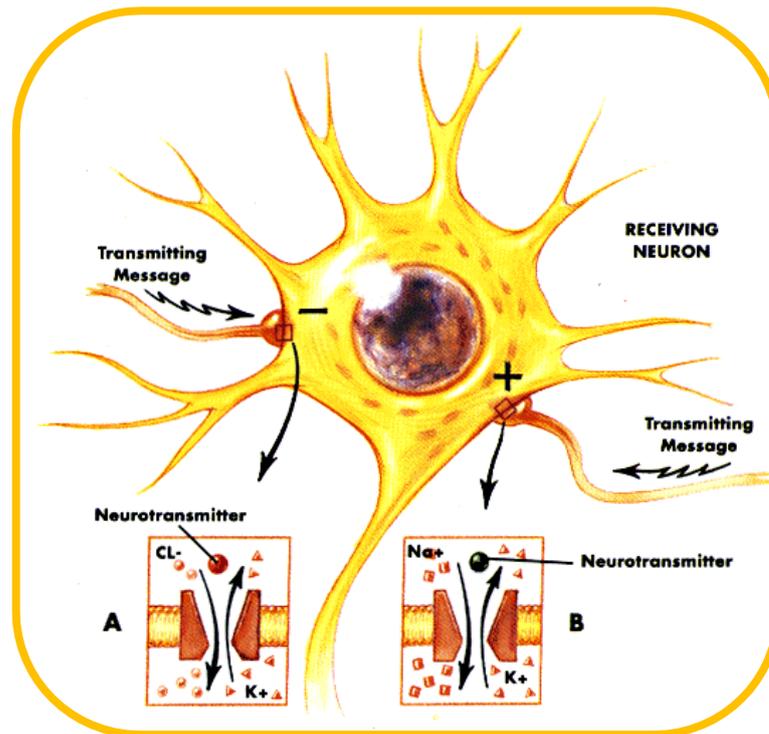


Fig. 15: Stimolazione di un neurone durante un fenomeno epilettico.

L'importanza del ruolo della P-gp in questa patologia non riguarda la sua eziologia, come avviene invece nel Parkinson e nell'Alzheimer, ma il suo trattamento farmacologico. Infatti, nel 20-30% dei casi, i pazienti affetti da epilessia cronica, manifestano fenomeni di resistenza nei confronti dei farmaci antiepilettici. Sono stati suggeriti diversi meccanismi, fra i quali, uno, riguarderebbe un'iperespressione della glicoproteina a livello della BEE con conseguente drastica riduzione della biodisponibilità cerebrale dei farmaci ¹¹.

Molti farmaci usati come antiepilettici sono substrati del trasportatore. A sostegno di questa tesi vi sono 3 riscontri:

- primo, l'iperespressione della P-gp è circoscritta esclusivamente al focus epilettogeno;
- secondo, l'iperespressione si verifica solo in quei soggetti che hanno manifestato farmaco resistenza che può essere dovuta a fenomeni di polimorfismo sul gene ABCB1;
- terzo, alcuni farmaci antiepilettici sono substrati della P-gp.

Recentemente è emerso che la P-gp è coinvolta nel trasporto del fenobarbital, un farmaco di prima scelta per l'epilessia generalizzata ¹², ed è stato dimostrato che la

cosomministrazione di tale farmaco con un inibitore selettivo della P-gp è in grado di superare la farmaco-resistenza ¹³.

Tali risultati confermano che la cosomministrazione di inibitori della P-gp insieme a fenobarbital o fenitoina possono aumentarne le proprietà anti-epilettiche e anti-convulsivanti ¹⁴.

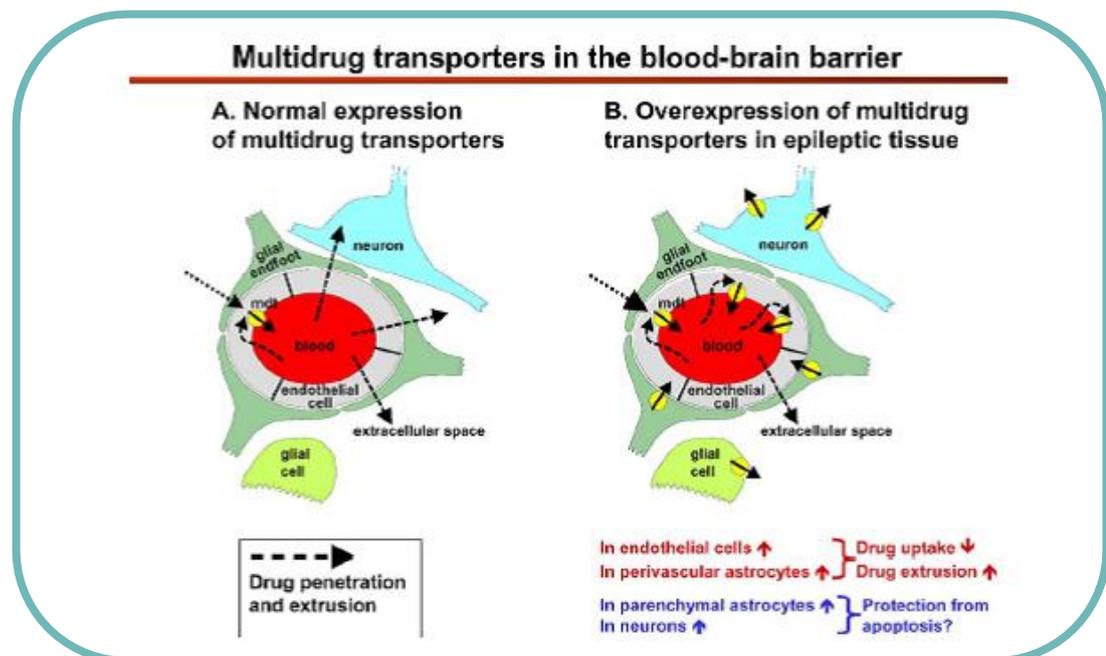


Fig. 16: Espressione normale delle MDR e sovraespressione delle MDR nel tessuto epilettico.

MULTIDRUG RESISTANCE (MDR)

Il principale ostacolo nel trattamento del cancro è rappresentato dalla “multidrug resistance” (MDR), ovvero resistenza a molteplici agenti antitumorali non correlati tra loro per struttura chimica e bersaglio molecolare.

L'MDR può manifestarsi nelle cellule sane, nelle cellule alterate, in seguito ad una patologia, o nelle cellule neoplastiche; esplica la propria azione attraverso differenti meccanismi:

- estrusione del farmaco dalla cellula (P-gp e altre proteine);
- riduzione della permeabilità;
- disattivazione enzimatica;
- alterazione dei siti di legame del farmaco;
- vie metaboliche alternative.

La P-gp, è di particolare rilevanza clinica in quanto questo trasportatore possiede un substrato esterno specifico da cui deriva il termine “multidrug transporter”, capace di legare una varietà di farmaci aventi struttura e meccanismo d'azione diversi ¹⁵.

La P-gp, essendo espressa dai tessuti con funzioni escretorie (intestino, fegato e rene) e dalle barriere sangue-tessuto (barriera emato-encefalica, barriera sangue-testicolo e placenta), è in grado di limitare l'entrata dei farmaci all'interno del corpo dopo somministrazione orale e di promuoverne l'eliminazione attraverso la bile e le urine ¹⁵.

Questo fenomeno di resistenza, quindi, risulta essere il maggior ostacolo quando vengono effettuate terapie indirizzate verso il sistema nervoso centrale, inclusa la chemioterapia per il cancro.

La MDR mediata dalla P-gp gioca un ruolo clinico importante in molti tumori umani, ed è per questo che l'iperespressione di questa glicoproteina nelle cellule tumorali rappresenta un bersaglio terapeutico importante al fine del superamento della resistenza.

SUBSTRATI E MODULATORI DELLA P-gp

La P-gp interagisce con un'ampia varietà di composti, nonostante vi siano numerose diversità strutturali. La glicoproteina può trasportare un gran numero di composti molto diversi tra loro per funzione e struttura, ma accomunati da alcune caratteristiche quali alto grado di idrofobicità, un basso peso molecolare (250-900 Da), una carica positiva a pH neutro e la capacità di attraversare la membrana citoplasmatica per diffusione passiva.

Fra i substrati della P-gp troviamo farmaci appartenenti a molte categorie terapeutiche, come antineoplastici quali gli alcaloidi della vinca (vinblastina, vincristina), le antracicline (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina), i taxani (paclitaxel, docetaxel) ¹⁶ ed anche antiaritmici, antistaminici, immunosoppressori, antivirali e farmaci utilizzati nella terapia del Parkinson, dell'Alzheimer, e di altre malattie.

Agenti terapeutici substrati della P-gp			
Substrati			Inibitori
Bloccanti dei canali al Ca⁺⁺ Diltiazem Mibefradil	Antibiotici Eritromicina Rifampicina Levofloxacina Tetraciclina	Antitumorali Paclitaxel Docetaxel Vinblastina Vincristina Doxorubicina Daunorubicina Epirubicina	Diversi inibitori Verapamil Valspodar Chinidina Ciclosporina Ketoconazolo
β- antagonisti Carvedilolo Talinolo Reserpina	Steroidi Desametasone Metilprednisolone Aldosterone Progesterone Idrocortisone Cortisolo Corticosterone	Oppioidi Loperamide Domperidone Morfina Metadone Fentanile	
Antistaminici Fexofenadina Terfenadina	Antiaritmici Digossina Digitossina	Antiacidi Cimetidina Ranitidina	

Tabella 1: Farmaci substrati della glicoproteina P.

Queste molecole, dopo essere penetrate nella cellula, vengono riportate nella regione extracellulare dalla proteina mediante trasporto attivo, e quindi contro gradiente di concentrazione^{17,18}.

I modulatori, attraverso un'interazione allosterica negativa, riducono la capacità della proteina di formare legami con i substrati.

E' stato dimostrato, attraverso l'utilizzo di radioligandi, che queste molecole alterano il legame della P-gp con il substrato in maniera non competitiva; in questo modo viene ridotta la massima densità recettoriale (Bmax) per il legame con il substrato, ma non cambia la costante di equilibrio di associazione (Kd), perché interagiscono con un sito diverso della P-gp.

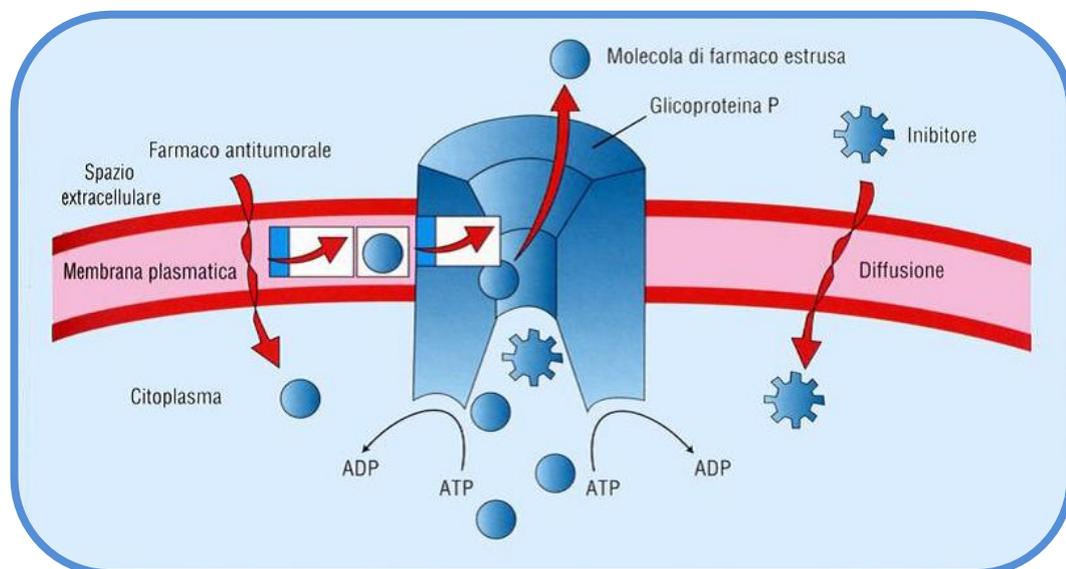


Fig. 17: Interazione di un inibitore con la P-gp.

INIBITORI DELLA P-gp

Gli inibitori interferiscono con la fase di legame con il substrato o con il nucleotide, bloccando così il trasporto da parte della P-gp.

L'attività degli inibitori ha perfezionato la comprensione del meccanismo di trasporto della P-gp.

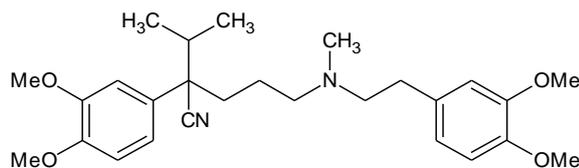
L'ampio numero dei composti che interagiscono con la glicoproteina ha portato ad ipotizzare la presenza di diversi siti di legame^{18,19}. Attualmente sono stati individuati 4 distinti siti di interazione sulla proteina: tre sono stati riconosciuti essere quelli adibiti al trasporto in quanto interagiscono sia con i substrati che con i modulatori. Il quarto sito è di regolazione, sul quale alcune molecole come elacridar e nicardipina sembrano interagire come modulatori.

La formazione di un legame in uno di questi siti provoca sugli altri un cambiamento conformazionale¹⁸.

Attraverso studi SAR si è dimostrato come gli aspetti strutturali sono strettamente correlati con la capacità inibitoria delle molecole, questo ha permesso di sintetizzare diverse classi di inibitori: prima, seconda e terza generazione.

Inibitori di prima generazione

In una pubblicazione di Tsuruo del 1981²⁰, per la prima volta, emerge che il verapamile, bloccante del calcio, potesse invertire la MDR inibendo l'efflusso di farmaco mediato dalla pompa. Tuttavia l'inversione della MDR da parte del verapamile era associata ad effetti collaterali cardiovascolari²¹ che ne hanno, quindi, limitato l'impiego come P-gp inibitore.

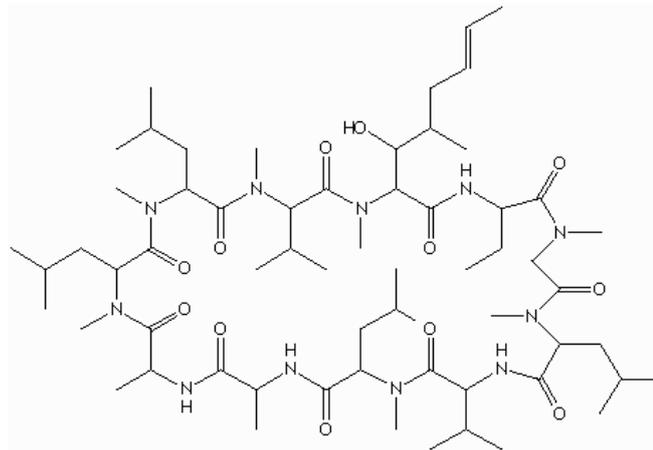


Verapamile

Un altro agente di prima generazione di inibitori non-specifici della P-gp è il farmaco ad azione immunosoppressiva ciclosporina A. Tale derivato risulta essere un potente modulatore della MDR, ma interferisce con l'attività di metabolizzazione dell'enzima CYP3A4²².

Anche antibiotici come l'eritromicina e farmaci inibitori della calmodulina, le chinine antimalariche, il tamoxifene, appartengono alla prima generazione degli inibitori della P-gp^{23,24}.

Questi composti sono caratterizzati da una bassa affinità e, quindi, necessitano di alte dosi di farmaco per raggiungere la concentrazione plasmatica necessaria per bloccare la P-gp^{25,26}. Molti di questi agenti, inoltre, mancano di selettività nei confronti dei trasportatori ABC e di altri sistemi enzimatici (CYP450) perciò risulta impossibile prevedere le loro interazioni farmacocinetiche²⁷.

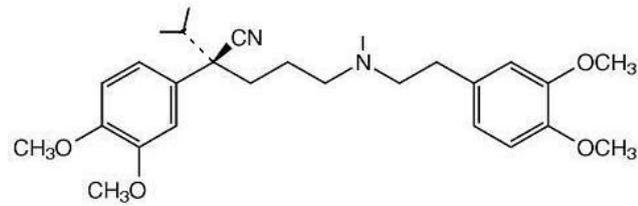
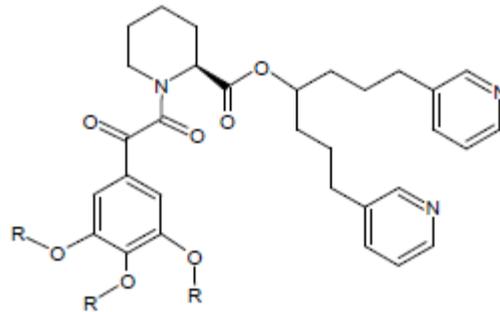


Ciclosporina A

Inibitori di seconda generazione

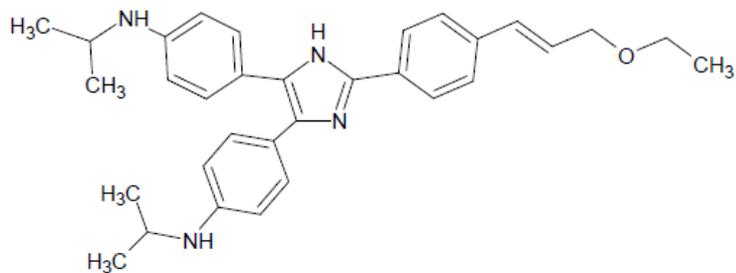
La seconda generazione di inibitori include analoghi del verapamil (dexverapamil e dexinigidipine) che mostrano una minore attività cardiovascolare, il valspodar derivato della ciclosporina ed il biricodar derivato del tacrolimus²⁵.

Questi inibitori sono più potenti di quelli di prima generazione sebbene continuino a presentare interazioni farmacocinetiche critiche dovute all'inibizione del citocromo P450 e riduzione dell'escrezione biliare con conseguente aumento della tossicità^{28,29}.

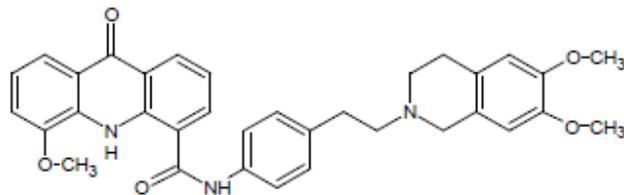
**Dexverapamile****Biricodar****Inibitori di terza generazione**

L'ultima generazione di inibitori della P-gp è stata sviluppata attraverso studi di SAR e di chimica combinatoriale per superare le limitazioni dei modulatori di seconda generazione.

Farmaci come acridonecarboxamide, antranilammide, ciclopropildibenzosuberano, l'inibitore della farnesil transferasi e diarilimidazolo, sono alcuni inibitori di terza generazione ²¹.

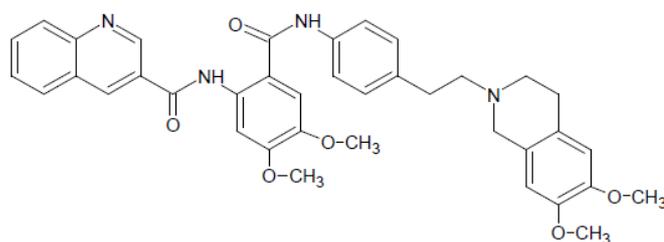
**Diarilimidazolo**

L'elacridar (Acridonecarboxammide) è uno dei più potenti modulatori MDR conosciuti. Studi clinici hanno dimostrato che questo composto presenta un'elevata affinità per la P-gp e un'attività inibitoria sul trasportatore BCRP, accompagnata ad una modesta interazione con i sistemi enzimatici del citocromo P450, ad esempio il 3A4³⁰.



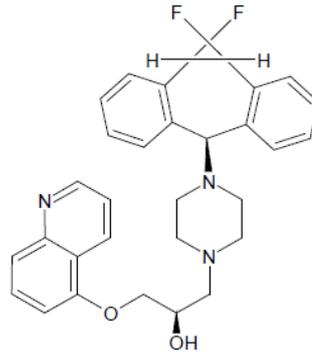
Acridonecarboxammide (elacridar)

Il tariquidar (antranilammide) è un'altro inibitore della P-gp molto potente, selettivo ed efficace, inoltre è molto ben tollerato ed opera un'inibizione di tipo non competitivo con farmaci antitumorali come la vinblastina ed il paclitaxel. Ha attività inibitoria sulla glicoproteina a basse concentrazioni ed è caratterizzato da una lunga durata d'azione³¹. Questo composto agisce inibendo l'attività ATP-asi basale della pompa, per cui impedisce il legame del substrato e l'azione idrolitica sull'ATP¹⁷.



Antranilammide (tariquidar)

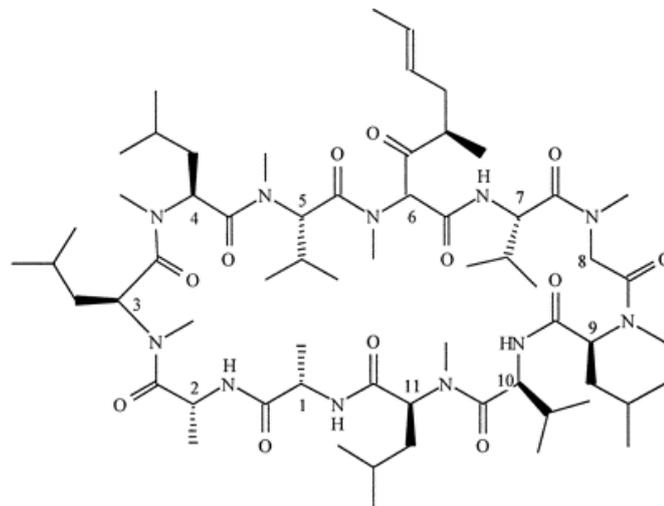
Lo zosuquidar è un composto ad elevata specificità per la P-gp ed è dotato di scarsa affinità per il citocromo P450 per cui l'interazione con altri farmaci risulta minima³⁰.



Ciclopropildibenzosuberano (zosuquidar)

Il valsopodar, PSC833, è un inibitore, analogo della ciclosporina A, ma non ha attività immunosoppressiva, per cui può essere somministrato anche a dosi elevate ³².

L'utilizzo del valsopodar in terapia, però, è limitato dalla sua attività inibitoria nei confronti del citocromo P450 3A4 ³³. Dato che molti agenti antitumorali, come la doxorubicina, sono metabolizzati da questo sistema enzimatico, la loro co-somministrazione con il valsopodar determina un aumento degli effetti tossici dei chemioterapici stessi e costringe ad una conseguente riduzione dei dosaggi del P-gp inibitore ³².



Valsopodar

L'OSSIDO NITRICO

L'ossido nitrico, NO, si è rivelata una delle molecole più interessanti degli ultimi vent'anni, in grado di regolare funzioni fisiologiche e fisiopatologiche di tipo cardiovascolare, immuno-infiammatorio e neuronale.

L'NO è una piccola molecola idrofobica che attraversa le membrane cellulari senza canali o recettori, ed è liberamente permeabile attraverso le membrane. L'NO è capace di provocare rilassamento delle cellule muscolari lisce dei vasi vicini ed è prodotto dall'endotelio con una breve emivita.

Nella cellula endoteliale, l'ossido nitrico (NO) è biosintetizzato a partire dall'L-arginina ad opera dell'enzima costitutivo endoteliale Ca^{++} -dipendente NOS (ossido nitrico sintasi).

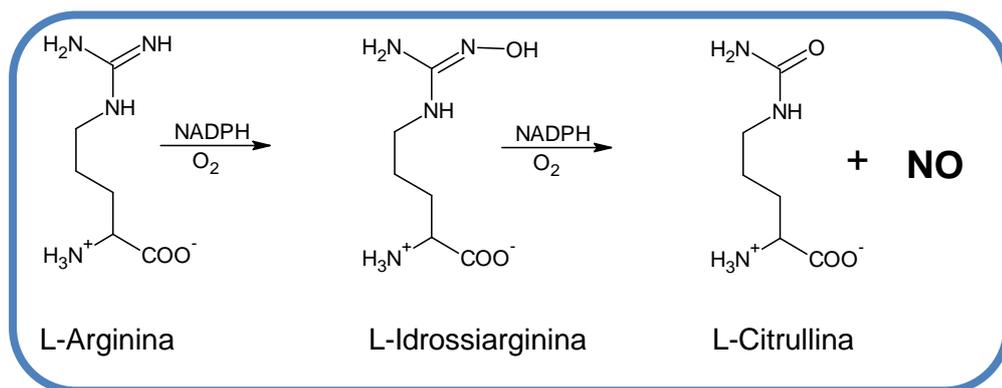


Figura 18: Sintesi dell'ossido nitrico.

L'NOS si divide in NOS neuronale (nNOS) e NOS delle cellule endoteliali (eNOS), entrambi gli enzimi producono quantità nanomolari di NO per brevi periodi, in risposta all'incremento transitorio di Ca^{++} intracellulare.

L'ossido nitrico prodotto dalla e-NOS è il più importante vasodilatatore endogeno. Il meccanismo attraverso cui esplica la sua azione è l'attivazione della guanilato ciclasi solubile (GC_s) e il conseguente accumulo della guanosin-monofosfato ciclico (GMP_c). La guanilato ciclasi, come l'emoglobina, contiene un dominio recettoriale che lega l'NO con grande affinità. La formazione di tale complesso induce un cambiamento conformazionale dell'enzima tale da attivarlo e portare all'accumulo di

GMP_C , un noto secondo messaggero, in grado di stimolare la protein-chinasi G (PKG) ed i canali ionici GMP_C -dipendenti, coinvolti nel rilassamento muscolare.

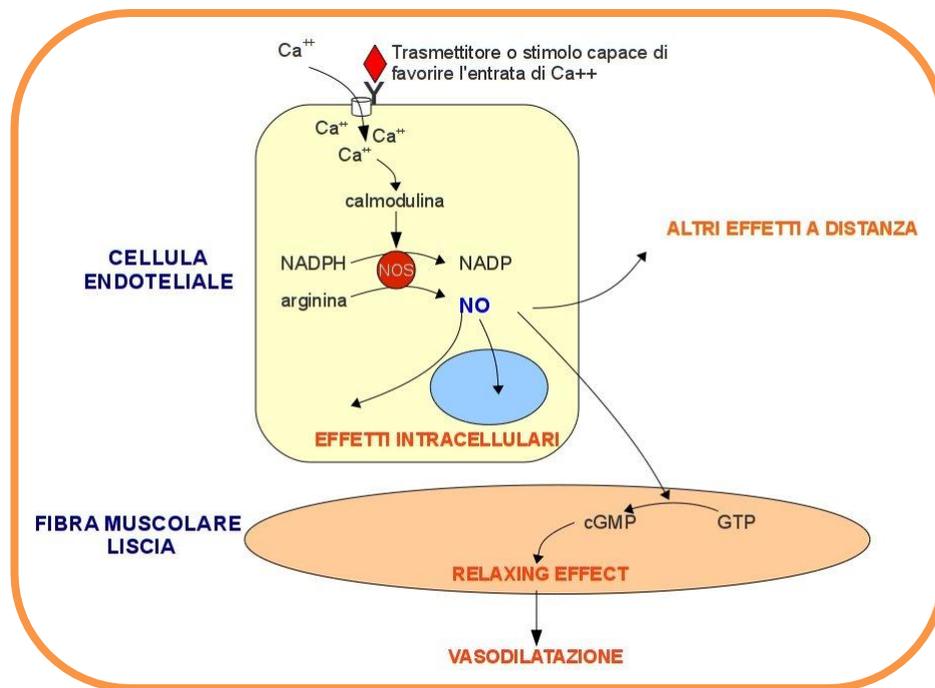


Fig. 19: Effetti dell'NO sulla guanilato ciclasi.

In seguito ad una adeguata stimolazione, le cellule endoteliali producono NO che in parte raggiunge la muscolatura liscia, causando vasodilatazione e in parte diffonde nel compartimento ematico, riducendo l'aggregazione delle piastrine e l'adesività dei leucociti alle pareti dei vasi sanguigni.

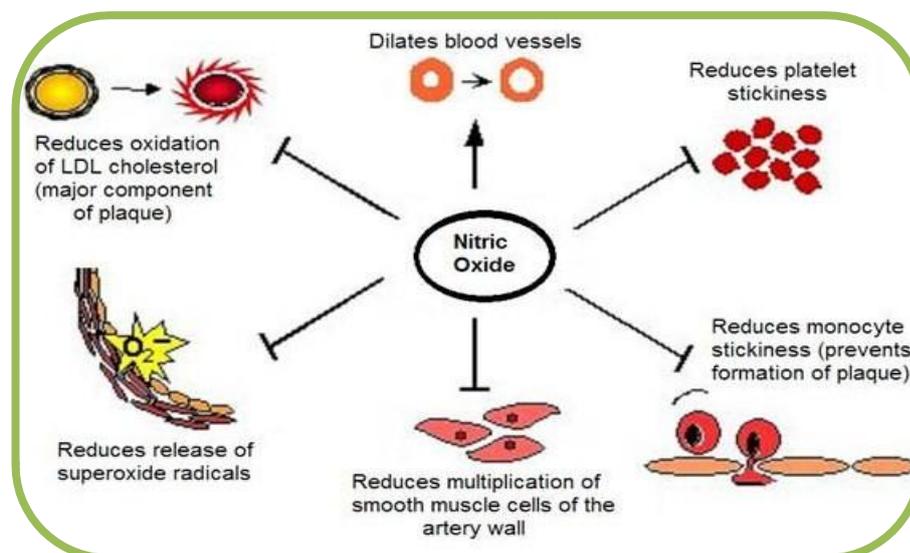


Fig. 20: Conseguenze della produzione dell'NO.

L'NO ha le caratteristiche di un *radicale libero*, ossia una specie chimica molto reattiva. Si tratta di molecole composte da atomi instabili, che presentano un elettrone in meno negli orbitali più esterni. L'elettrone mancante spinge l'atomo ad attirare elettroni da altri atomi in modo da raggiungere la configurazione assoluta; il processo di trasferimento di elettroni è alla base della produzione di energia nelle cellule.

L'interazione dell'NO con le specie reattive dell'ossigeno, in particolare l'interazione dell'NO con l'anione superossido (O_2^-), porta alla formazione di un composto molto tossico, il perossinitrito ($ONOO^-$): $O_2^- + NO \rightarrow ONOO^-$.

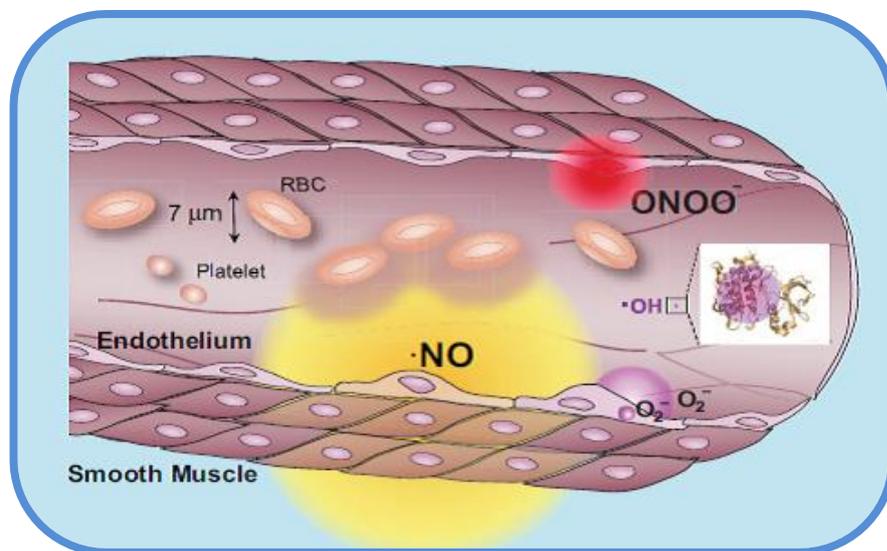


Fig. 21: Diffusione cellulare del superossido, perossinitrito, e NO.

I radicali liberi, specialmente il O_2^- e il $ONOO^-$ e i non-radicali come H_2O_2 , possono essere generati in quantità tali da soffocare i sistemi enzimatici endogeni, come il superossido dismutasi (SOD) e il glutathione ridotto (GSH). Una superproduzione di RNS (reacting nitrogen species) prende il nome di stress nitrosativo; tale effetto induce una condizione patologica causata dallo squilibrio fisiologico fra la produzione e l'eliminazione, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti, di specie chimiche ossidanti. E' un processo deleterio per tutte le funzioni cellulari, compresi il DNA, lipidi, membrana e proteine, inducendo la morte cellulare tramite la necrosi o l'apoptosi.

L'effetto citotossico dell'NO può essere mediato dall'interazione delle specie reattive con i mitocondri con conseguente inibizione reversibile della respirazione

mitocondriale dove il principale bersaglio dell'NO è l'enzima citocromo c ossidasi, o attraverso l'inattivazione irreversibile degli enzimi mitocondriali (complessi I, II, III della catena respiratoria).

NO E PEROSSINITRITO E LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

L'NO è prodotto da tutte le cellule cerebrali inclusi i neuroni, le cellule endoteliali, le cellule gliali (astrociti, oligodendrociti, e microglia) attraverso varie isoforme dell'enzima NOS, Ca⁺⁺/calmodulina-dipendente. La NOS provvede alla biosintesi dell'ossido nitrico a partire dalla L-arginina, che viene trasformata in citrullina. La NOS utilizza per questo processo ossigeno e cofattori come FAD, FMN, NADPH e tetraidrobiopterina. La reazione è quindi multifasica e molto complessa.

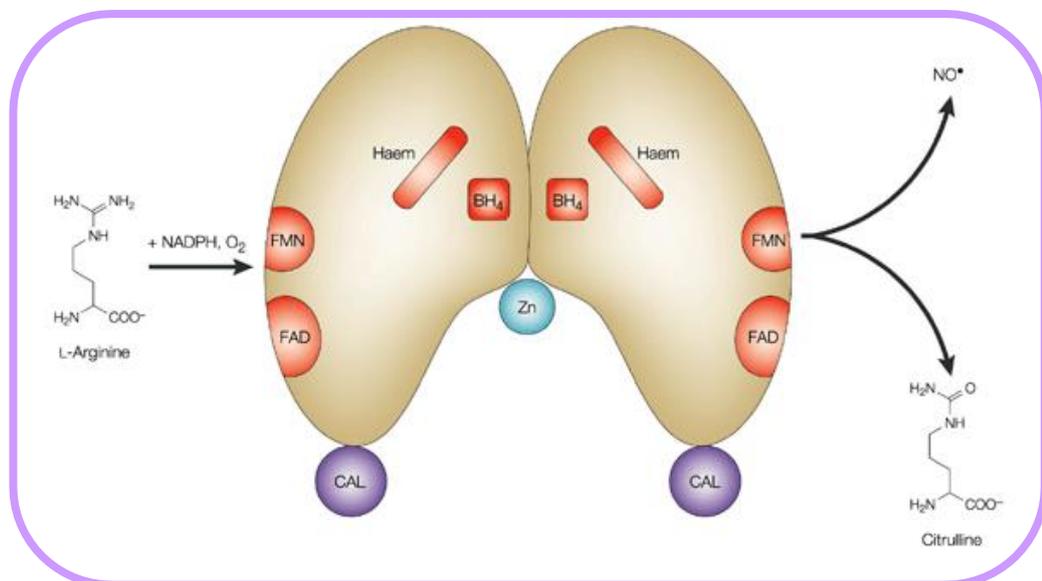


Fig. 22: Meccanismo della NO sintasi.

L'NO può avere una doppia attività: una protettiva attraverso la modulazione di numerosi processi fisiologici e funzioni immunologiche nel SNC, e una di mediatore del danneggiamento tissutale ³⁴.

Il ruolo dell'NO risulta quindi importante nella patofisiologia di varie malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson, Alzheimer, Huntington, sclerosi multipla e sclerosi amiotrofica laterale.

Implicazioni dell'NO nel Parkinson

Il Parkinson è caratterizzato da una perdita progressiva dei neuroni dopaminergici della substantia nigra. Questo interferisce con l'attività della ganglia basale ed è critico per la funzione motoria e la coordinazione. Inoltre lo stress ossidativo, l'infiammazione, disfunzioni mitocondriali e fattori ereditari o inquinanti sono implicati nella patogenesi del Parkinson anche se tutt'ora, rimane oscura la causa della perdita dei neuroni dopaminergici.

Recentemente è emerso che il danneggiamento ossidativo e/o nitrosante, nel morbo di Parkinson, è mediato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dal perossinitrito e che l'aumento di proteine che contengono nitrotirosina è accompagnato da una sovraespressione dell'NOS³⁵.

Il perossinitrito può indurre nitratura della tirosina idrossilasi, enzima che produce e regola la biosintesi della dopamina, portando all'inibizione dell'attività dell'enzima e alla conseguente riduzione di dopamina³⁶.

Implicazioni dell'NO nell'Alzheimer

L'Alzheimer è caratterizzato dalla formazione di placche nevritiche, ricche di peptide β -amiloide ($A\beta$), ammassi di neurofibrille ricche di τ proteine iperfosforilate, gliosi, e da una risposta neuroinfiammatoria che coinvolge astrociti e microglia, che porta inevitabilmente al progressivo declino cognitivo globale e nella maggior parte dei casi alla demenza.

Fin dai primi stadi del processo neurodegenerativo è stato evidenziato un aumento dello stress ossidativo; entrambe le isoforme della NOS giocano un ruolo chiave nella patogenesi della malattia e nella formazione del perossinitrito.

Nei tessuti cerebrali di pazienti affetti da Alzheimer si può riscontrare un accumulo di placche senili contenente la proteina $A\beta$ (beta amiloide) e ammassi neuro fibrillari, principalmente costituiti da filamenti elicoidali appaiati. Meno del 5% dei casi della malattia ha un esordio precoce ed è legato a mutazioni genetiche. Il restante 95% dei casi riguarda una forma tardiva della malattia, dove l'invecchiamento e, quindi, una maggior produzione di radicali liberi, sono i fattori principali di rischio³⁷.

FARMACI NO-DONOR

Il prototipo dei farmaci NO-donor è rappresentato dai *nitriti e nitrati organici*, come l'isosorbide dinitrato o mononitrato, il gliceril trinitrato e l'amilnitrato che rilasciano NO dopo biotrasformazione metabolica; altre molecole, come ad esempio il sodio nitroprussiato, rilasciano invece NO spontaneamente.

Questi composti si possono considerare dei pro-farmaci, che attraverso il rilascio di NO esogeno, attivano le stesse risposte metaboliche dell'NO endogeno dando il via a tutte le funzioni biologiche. Tuttavia, a causa della loro breve emivita, il loro uso è limitato sostanzialmente alle situazioni patologiche che richiedono un rapido ed efficace effetto vasorilasciante.

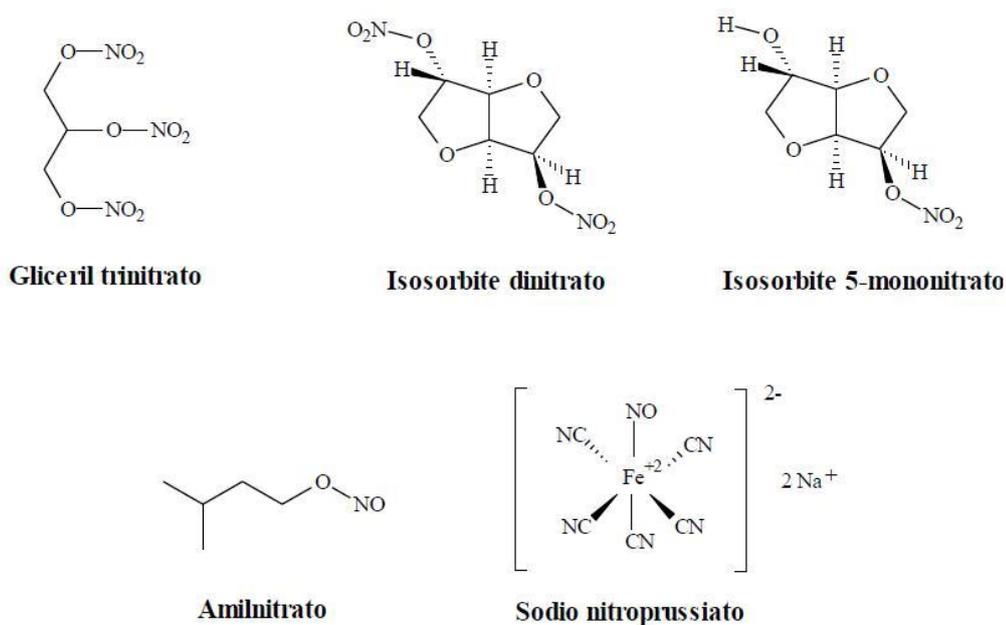


Fig. 23: Struttura chimica degli NO-donor classici.

Tra i donatori diretti di NO, possono essere menzionate due classi di NO-donor eterociclici, i furoxani e le sidnonimine, che richiedono co-fattori per il rilascio di NO; nei furoxani il co-fattore è rappresentato da derivati tiolici mentre per le sidnonimine è rappresentato da ossidanti.

La comparsa della tolleranza sembra essere uno dei più importanti problemi connessi con la somministrazione a lungo termine dei farmaci donatori di NO.

Più in generale la tolleranza di questo tipo di farmaci è un fenomeno complesso, che probabilmente implica diversi aspetti, che dipendono dalla natura chimica dei composti e dai meccanismi biologici coinvolti. Tra questi, i principali sono legati alla biotrasformazione del farmaco con conseguente rilascio di diversi mediatori tra i quali l'NO, ma anche quelli legati al destino metabolico dell'NO, e quelli direttamente legati alla riduzione dei livelli di c-GMP indotta da NO.

***INTRODUZIONE ALLA PARTE
SPERIMENTALE***

La glicoproteina P (P-gp) è una proteina di estrusione appartenente alla famiglia ABC e costituisce l'esponente più importante di questa famiglia espresso a livello della barriera emato-encefalica (BEE). Il suo ruolo principale consiste nel limitare o prevenire l'ingresso nel sistema nervoso centrale di svariati agenti quali chemoterapici, peptidi, antibiotici, inibitori delle HIV proteasi e farmaci antidepressivi. E' una proteina transmembranale specifica, altamente espressa sulla superficie luminale dell'endotelio vascolare cerebrale e nel plesso coroideo dove è implicata nel trasporto di numerosi substrati ^{7,1,11}.

L'ampia ed omogenea distribuzione della P-gp a livello del SNC indica che questa proteina di estrusione svolge un ruolo chiave sia nella detossificazione che nella protezione del sistema nervoso centrale da xenobiotici. La P-gp estrude dalle cellule endoteliali dei capillari cerebrali numerosi farmaci limitandone così l'accumulo all'interno delle cellule endoteliali e conseguentemente riducendone l'efficacia.

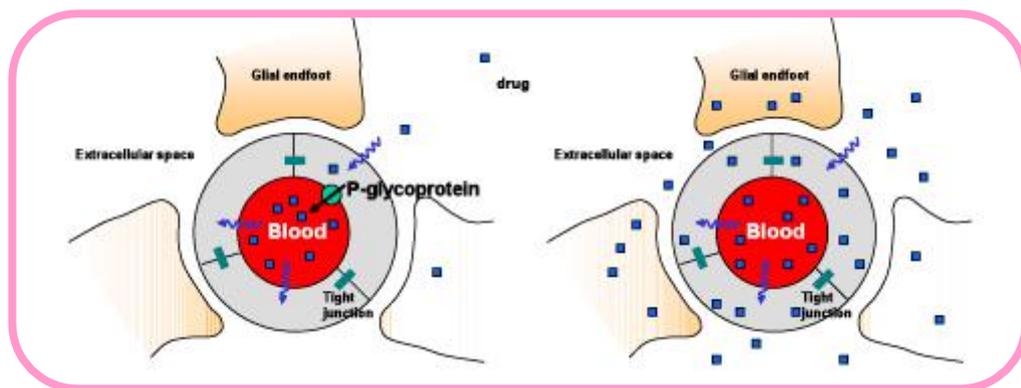


Fig. 24: Funzioni della P-gp a livello della barriera ematoencefalica.

Se da un lato questo effetto costituisce una protezione del SNC contro la tossicità di sostanze xenobiotiche, dall'altro questo stesso effetto rappresenta il principale fattore limitante l'efficacia di numerose terapie farmacologiche impiegate per il trattamento di patologie quali l'Alzheimer e il Parkinson ³, ma anche per il trattamento di differenti tipi di tumori cerebrali.

Recentemente è stata osservata una ridotta funzionalità della P-gp nella fase iniziale di molte patologie neurodegenerative come il Parkinson o l'Alzheimer ^{38,39}. Questa ridotta attività potrebbe contribuire al danno neuronale indotto dall'accumulo di tossine a livello cerebrale, come accade nel Parkinson, o potrebbe ridurre la capacità

di espellere dal cervello alcune proteine che invece si accumulano con il progredire della patologia (come avviene nell'Alzheimer).

Contrariamente a quanto avviene nella fase di sviluppo iniziale di tali patologie, nello stadio più avanzato è stata osservata una iperespressione della P-gp che presumibilmente costituisce il principale ostacolo alla buona efficacia delle terapie farmacologiche esistenti.

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.

Le patologie neurodegenerative così come il cancro coinvolgono un sistema complesso di bersagli farmacologici e per questo sono considerate ad eziologia complessa o multigenica. In questo tipo di patologie multifattoriali lo sviluppo di molecole altamente selettive verso uno specifico target farmacologico è risultato poco efficace.

Su questa base, la progettazione razionale e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche che si basano su molecole “promiscue” e quindi capaci di interagire con differenti bersagli implicati nella complessità dei sistemi biologici coinvolti sembra rappresentare una migliore strategia terapeutica .

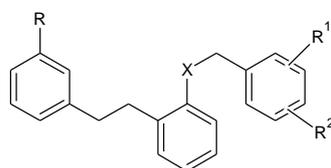
L'ossido di azoto (NO) è un importante messaggero molecolare dotato di numerose funzioni biologiche, alcune delle quali sembrano potenzialmente sfruttabili nell'ambito della terapia neuroprotettiva ma anche in quella antitumorale.

Per quanto riguarda il ruolo dell' NO come potenziale agente neuroprotettivo, numerose evidenze sperimentali ⁴⁰ hanno mostrato che tale mediatore può contribuire alla sopravvivenza cellulare, e al mantenimento dei corretti livelli di agenti antiossidanti e trofici che generalmente, si riducono con l'avanzare dell'età e che sono implicati nell'apprendimento e nella memoria.

Piccole molecole capaci di potenziare l'attività biologica dell' NO fisiologico, quali ad esempio raggruppamenti NO-donor, potrebbero quindi migliorare le capacità cognitive ed esplicare un ruolo protettivo nella patologia dell'Alzheimer.

Presso il laboratorio dove è stata svolta questa tesi di laurea erano già stati progettati e sintetizzati modulatori della P-gp a struttura “ariletifenilica” di tipo A che hanno mostrato di possedere sia una buona attività modulatoria sia una buona selettività d'azione sulla P-gp rispetto ad altre pompe di estrusione. In particolare, lo studio preliminare di un numero limitato di questi derivati in cui la struttura ariletifenilica

risultava sostituita con differenti gruppi lipofili aromatici, ha indicato per alcuni di questi composti una buona capacità di inibire il trasporto di [3H]-vinblastina (substrato della P-gp) in cellule Caco-2 che iperesprimono la P-gp⁴¹.



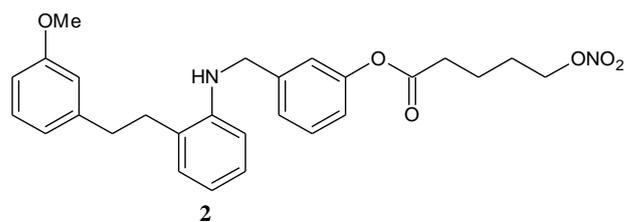
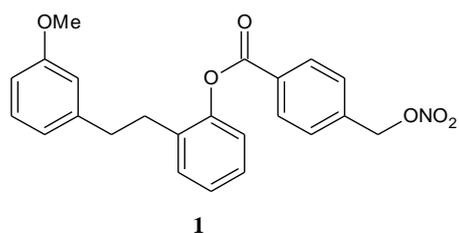
Tipo A

Tenendo presente questi effetti biologici in questa tesi di laurea sono state sintetizzate nuove molecole promiscue ottenute dalla combinazione di porzioni farmacoforiche dei P-gp modulatori e di gruppi NO-donor con lo scopo di ottenere nuovi agenti utili per migliorare l'efficacia delle terapie farmacologiche per l'Alzheimer già esistenti limitando la farmaco-resistenza correlata alla iper-espressione della P-gp e, allo stesso tempo, migliorando le proprietà cognitive e la neuroprotezione attraverso l'inserimento di gruppi capaci di rilasciare NO.

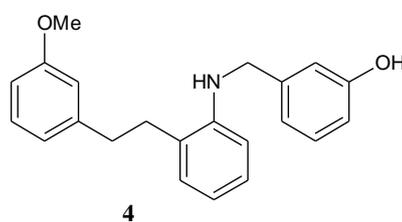
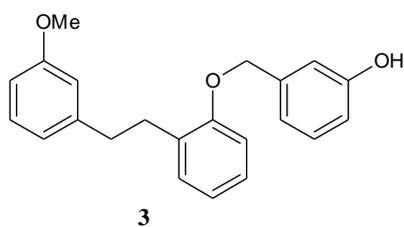


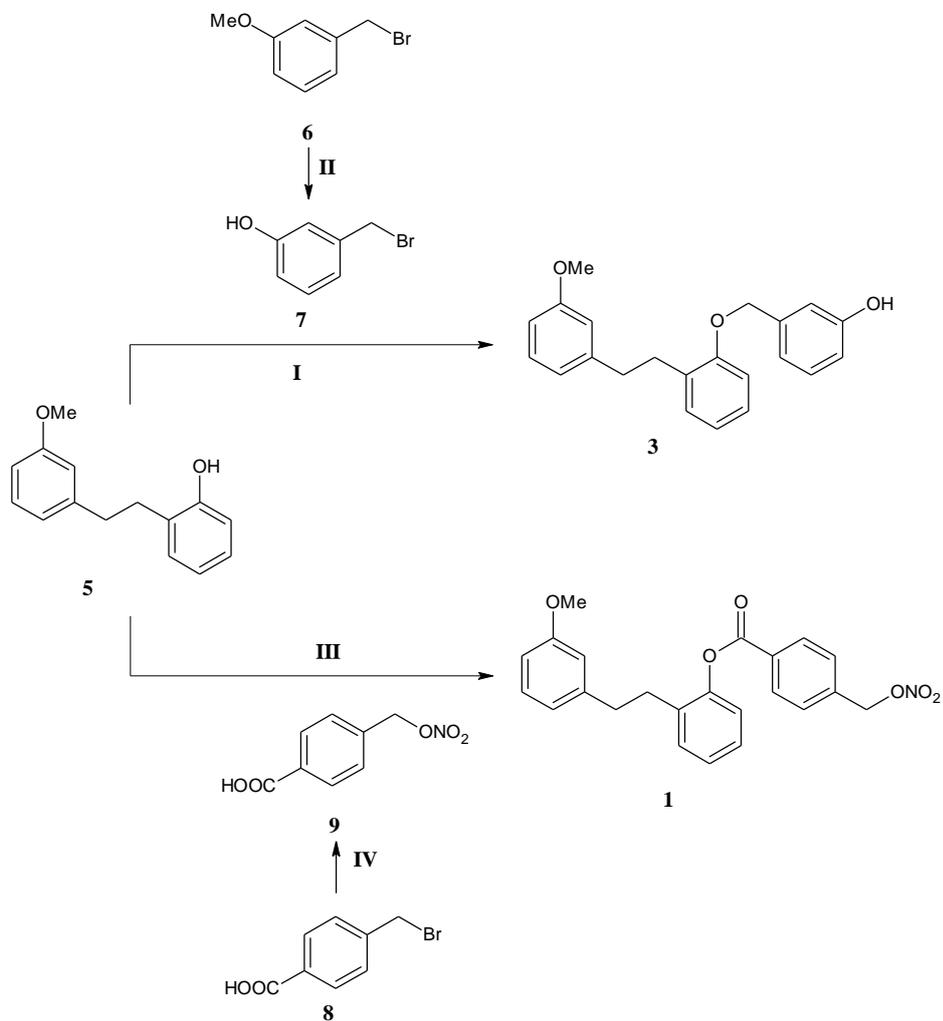
In particolare sono stati sintetizzati due derivati ibridi **1**, **2** in cui la funzione dell'estere nitrico è stata legata per mezzo di un raggruppamento aromatico **1** (acido 3-nitrossimetil benzoico) e alifatico **2** (acido 5-nitrossipentanoico) alla funzione P-gp inibitrice, rispettivamente.

Queste due catene NO-donor sono state selezionate ipotizzando una diversa stabilità nei confronti della scissione del legame estereo in relazione alla natura alifatica o aromatica del composto.



Inoltre sono stati sintetizzati gli analoghi **3** e **4** con lo scopo di valutare se l'inserimento del sostituente idrofilico (OH) porta ad una maggiore attività inibitoria sulla P-gp .



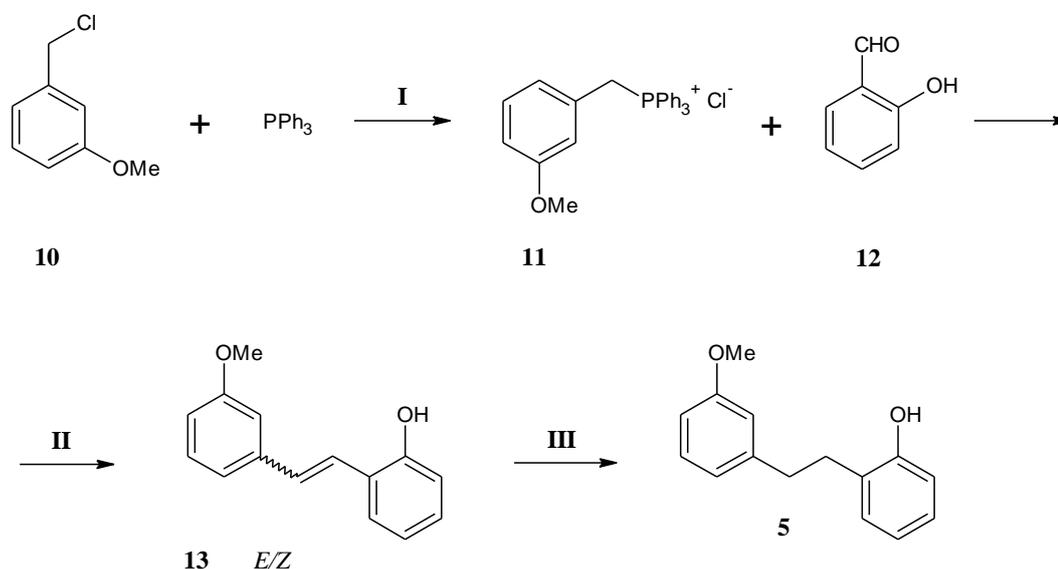
SCHEMA 1**Reagenti e condizioni****I** : KOH, DMSO, 12h, 50°C;**II** : BBr₃, CH₂Cl₂, 1h., 0°C;**III** : CH₂Cl₂, DCC, DMAP, 24h, t. a.;**IV** : AgNO₃, CH₃CN, 0,5h, t. a.

I composti finali **1** e **3** sono stati ottenuti secondo lo **schema sintetico 1**.

Il composto **5** è stato sottoposto a reazione, in ambiente fortemente alcalino, con il composto **7** in DMSO fornendo il prodotto finale **3**. Per reazione del 3-metossi-benzil bromuro commerciale **6** con BBr_3 è stato ottenuto il derivato fenolico **7**.

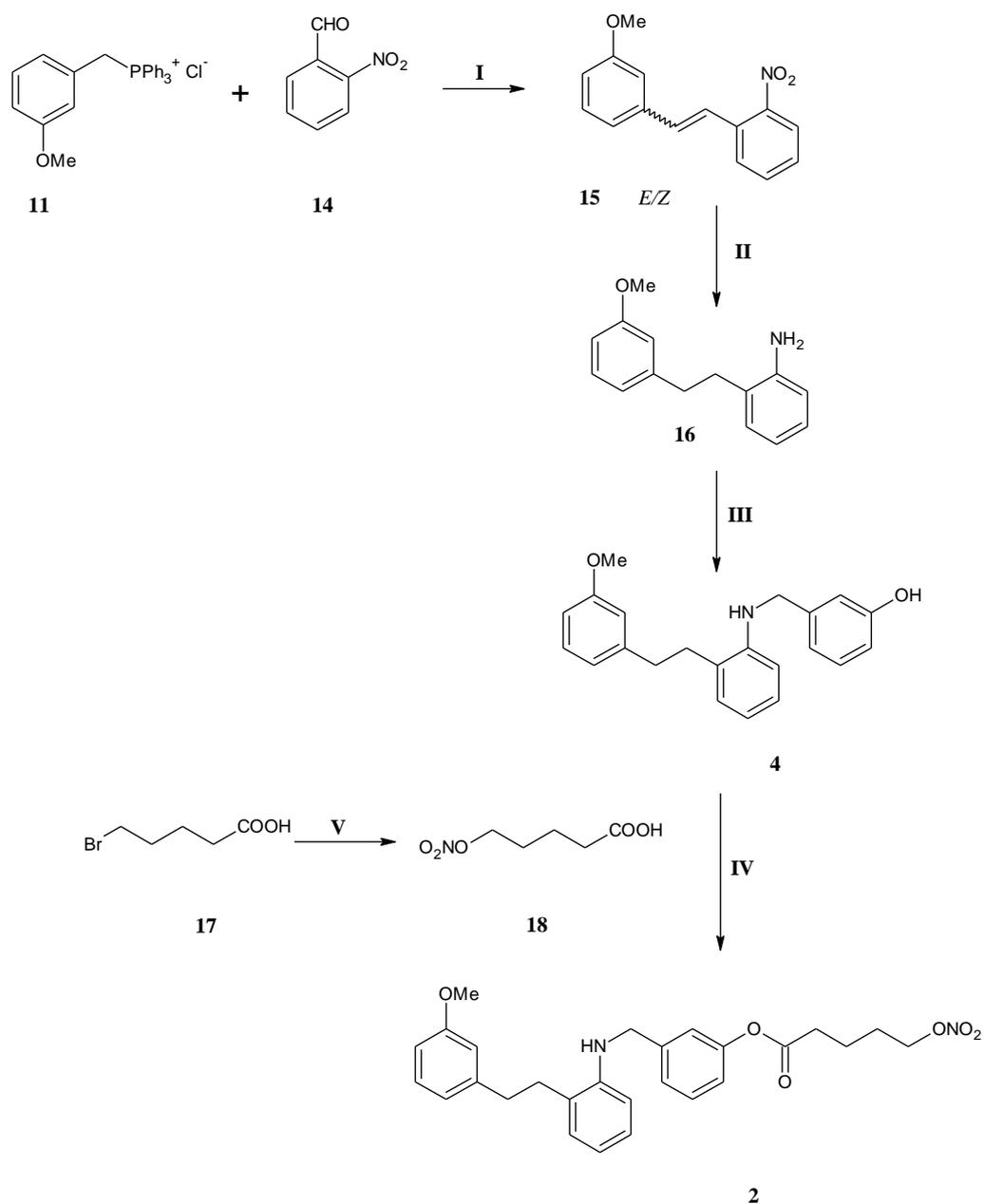
La reazione di esterificazione del derivato **5** con l'acido-4-nitrossi-metil benzoico **9**, in presenza di DCC e di DMAP, ha condotto al composto finale **1**.

L'acido 4-bromo-metil benzoico commerciale **8** sottoposto a reazione di nitratura con AgNO_3 ha fornito il derivato **9**.

SCHEMA 2**Reagenti e condizioni****I** : CH_3CN , refluxo, 12h;**II** : CH_3CN , DBU, refluxo, 12h;**III** : EtOH_{ass.}, H_2 , Pd/C, 24h.

Il composto **5** è stato ottenuto seguendo la procedura descritta nello **schema 2**.

Il sale di fosfonio **11** è stato ottenuto dal 3-metossibenzilcloruro **10** per reazione con PPh_3 in CH_3CN ; la reazione di Wittig con la salicilaldeide **12** ha fornito la miscela *E/Z* del derivato stilbenico **13** che è stato utilizzato come tale nella reazione di idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C 10% per dare il corrispondente fenolo saturo **5**.

SCHEMA 3

Reagenti e condizioni **I** : CH₃CN, DBU, refluxo, 12h;

II : EtOHass., H₂, PD/C, 24h.

III : EtOH, NaBH₄, 3-idrossibenzaldeide, refluxo, 12h, 0°C;

IV : CH₂Cl₂, DCC, DMAP, 4h, t. a.

V : AgNO₃, CH₃CN, 0,5h, t. a.

I composti **2** e **4** sono stati sintetizzati secondo lo **schema sintetico 3**.

Il metossibenzil(cloro)trifenilfosforano **11** è stato sottoposto ad una reazione di Wittig con la 2-nitro-benzaldeide **14** ottenendo la miscela *E/Z* stilbene **15**. Tale derivato è stato ridotto per idrogenazione catalitica in presenza di Pd/C 10% per dare la corrispondente ammina satura **16**. Il prodotto finale **4** è stato ottenuto sottoponendo ad amminazione riduttiva l'anilina **16** e la 3-idrossi-benzaldeide in presenza di NaBH₄. La successiva reazione tra il derivato **4** e l'acido-5-nitrossi-pentanoico **18** ha condotto al composto finale **2**. Il derivato **18** è stato sintetizzato tramite una reazione di nitratura dell'acido-5-bromo-pentanoico.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

La struttura dei vari composti è stata controllata tramite spettrometria di massa ed $^1\text{H-NMR}$. Degli spettri $^1\text{H-NMR}$ e MS abbiamo riportato i particolari più rilevanti.

I dati spettrali di tutti i composti sono in accordo con le strutture assegnate.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati ricavati utilizzando uno spettro Varian Gemini 200 MHz. Le soluzioni sono al 5% circa in CDCl_3 e $\text{CD}_3\text{OD-}d_4$.

I chemical shift sono stati espressi in ppm (scala di δ).

Gli spettri di massa sono stati ricavati per mezzo di uno spettro Hewlett Packard 5988° introducendo direttamente un'energia nominale di 70 eV ad una temperatura di 350°C.

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

Nel nostro laboratorio di Chimica Analitica sono state eseguite le analisi elementari: la differenza, tra i valori teorici e quelli ottenuti, è compresa in un intervallo di $\pm 0.4\%$.

Le evaporazioni sono state eseguite in un evaporatore rotante. Le disidratazioni delle fasi organiche sono state portate a termine utilizzando Na_2SO_4 .

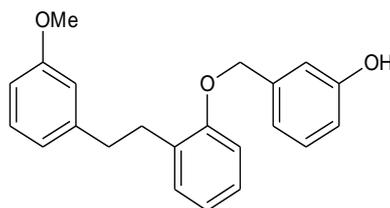
Le TLC analitiche sono state eseguite per mezzo di lastre MERCK di gel di silice (G60) con indicatore di fluorescenza 20 x 20.2 mm. Le macchie sono state rilevate grazie ad una lampada UV (256nm).

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

Per la filtrazione su celite è stata utilizzata celite[®] 521.

SCHEMA 1**SINTESI DELLA 3-((2-(2-(3-METOSSIFENIL)ETIL)-FENOSSID)METIL)FENOLO 3**

Ad una soluzione del derivato **5** (95.6 mg; 0.41 mmoli) in una piccola quantità di DMSO (2 ml) è stata aggiunta una soluzione di KOH (70.7 mg; 0.41 mmoli) in DMSO (2 ml). La miscela risultante è stata lasciata in agitazione a t.a. per 15 min.. Dopo è stata aggiunta una soluzione del composto **7** (76.7 mg; 0.41 mmoli) in DMSO (2 ml). La miscela è stata lasciata in agitazione per altre 12h a t.a. Trascorso tale periodo, la soluzione è stata diluita con AcOEt e lavata con H₂O e ghiaccio. La fase organica è stata filtrata, essiccata ed evaporata a p.r.; il grezzo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente n-esano/AcOEt in rapporto 8:2.



Resa: 54%

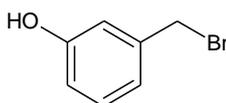
¹H NMR CDCl₃: δ 2.85–3.04 (m, 4H, CH₂CH₂); 3.77 (s, 3H, OCH₃); 5.02 (s, 2H, CH₂); 6.72–6.82 (m, 4H, Ar); 6.87–6.98 (m, 4H, Ar); 7.14–7.26 (m, 4H, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

C₂₂H₂₂O₃	C	H
Calc. %	79.02	6.63
Trov. %	79.17	6.47

SCHEMA 1**SINTESI DEL 3-(BROMOMETIL)FENOLO 7**

Ad una soluzione di 3-metossi-benzil-bromuro commerciale **6** (500 mg; 2.49 mmoli) in CH₂Cl₂ anidro (20 ml), raffreddata a -78°C e posta in condizioni anidre, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di BBr₃. La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione a 0°C per 1h. Trascorso tale periodo è stata aggiunta H₂O e la fase acquosa è stata estratta con CHCl₃. La fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata fornendo il grezzo **7** che non è stato ulteriormente purificato.



Resa: 70%

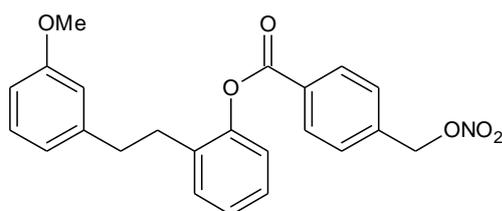
¹H NMR (CDCl₃): δ 4.46 (s, 2H, CH₂); 6.78 (dd, 1H, *J* = 2.4; 8.0 Hz, Ar.); 6.88 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz, Ar); 6.95-6.98 (m, 1H, Ar); 7.18-7.27 (m, 1H, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

C₇H₇BrO	C	H
Calc. %	44.95	3.77
Trov. %	48.45	3.34

SCHEMA 1**SINTESI DEL 2-(3-METOSSIFENETIL)FENIL)4-
(NITROSSI)METIL)BENZOATO 1**

Ad una soluzione del composto **5** (333 mg; 1.46 mmoli) in CH₂Cl₂ e del derivato **9** (287 mg; 1.46 mmoli) in THF (15 ml) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di DCC (0.31 g; 1.75 mmoli) in THF (11 ml) e DMAP (13 mg). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a t. a. per 10 h. La sospensione risultante è stata, poi, filtrata e la fase organica evaporata ottenendo un solido grezzo che è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente CHCl₃/n-Esano in rapporto 11:9 ottenendo il composto finale **2**.



Resa: 40%

¹H NMR(CDCl₃): δ 2.74-2.86 (m, 4H, CH₂CH₂); 3.67 (s, 3H, OCH₃); 5.52 (s, 2H, CH₂); 6.58-6.71 (m, 4H, Ar); 7.09-7.30 (m, 4H, Ar); 7.55 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Ar); 8.23 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

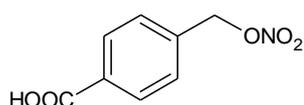
C₂₃H₂₁NO₆	C	H	N
Calc. %	67.80	5.20	3.44
Trov. %	67.89	5.08	3.58

SCHEMA 1**SINTESI DELL'ACIDO 4-NITROSSI-METIL-BENZOICO 9**

Il 4-bromo-metil-benzoico commerciale **8** (1.14 g; 5.29 mmoli) è stato addizionato ad AgNO₃ commerciale (8.27 g; 48.69 mmoli) precedentemente disciolto in CH₃CN (2.5 ml).

La miscela di reazione è stata lasciata al buio sotto agitazione a t. a. per 18h.

Trascorsi tale periodo i sali d'argento ottenuti sono stati filtrati su setto e il solvente evaporato a pressione ridotta ottenendo il grezzo **9** che non è stato ulteriormente purificato.



Resa: 54%

¹H NMR (CDCl₃): δ 5.50 (s, 2H, CH₂); 7.50 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar,); 8.15 (d, 2H, *J* = 8.2 Hz, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

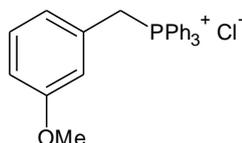
C₈H₇NO₅	C	H	N
Calc. %	48.74	3.58	7.10
Trov. %	48.45	3.34	7.42

SCHEMA 2

SINTESI DEL 3-METOSSIBENZIL(CLORO)TRIFENILFOSFORANO 11

Ad una soluzione del 3-metossibenzilcloruro **10** (5.00 g, 31.96 mmoli) in CH₃CN (25 ml) è a aggiunta la PPh₃ (9.02 g; 33.93 mmoli). La miscela è stata lasciata in agitazione a refluxo per 12 ore. Trascorso tale periodo, il solvente è stato evaporato ed il residuo purificato tramite cristallizzazione da CHCl₃/Et₂O.

Il composto è stato utilizzato nella reazione successiva senza ulteriori purificazioni.

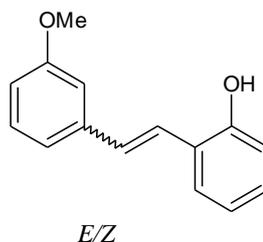


Resa: 89%

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.53 (s, 3H, OCH₃); 5.44 (d, 2H, *J* = 16 Hz, CH₂); 6.60-6.77 (m, 3H, Ar); 7.02 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar); 7.11-7.21 (m, 15H, Ar) ppm.

SCHEMA 2**SINTESI DEL 2-((E/Z)-2-(3-METOSSIFENIL)VINIL)FENOLO 13**

Ad una soluzione del composto **11** (2.00 g; 4.78 mmoli) in CH₃CN (15 ml) e DBU (1.17 g, 7.70 mmoli), è stata aggiunta la salicilaldeide commerciale **12** (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; il residuo è stato ripreso con CHCl₃, lavato con H₂O, HCl 1N e NaCl. La fase organica è stata essiccata ed evaporata a p.r. fornendo il grezzo **13** contenente la miscela dei due isomeri *E/Z*.



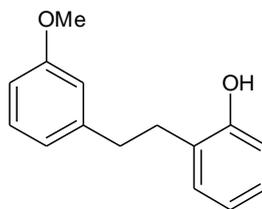
Resa: 89%

MS (m/z): 226 (M⁺, 48%), 195 (M⁺ - OCH₃, 12%)

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.81 (s, 3H, OCH₃); 6.55–7.23 (m, 10H, Ar, CH=CH) ppm.

SCHEMA 2**SINTESI DEL 2-(2-(3-METOSSIFENIL)ETIL)FENOLO 5**

La miscela di cis/trans stilbene **13** (1.30 g; 5.75 mmoli) in EtOH assoluto (30 ml) è stata sottoposta ad idrogenazione, utilizzando come catalizzatore Pd/C 10% (177.0 mg; 1.67 mmoli), per 12 h a temperatura ambiente. Trascorso tale periodo, il catalizzatore è stato filtrato su celite ed il filtrato è stato evaporato a pressione ridotta. Il grezzo è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente CHCl₃.



Resa: 45%

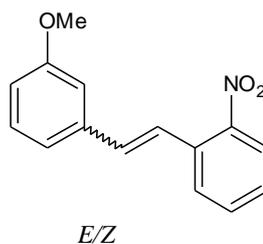
MS (m/z): 228 (M⁺, 28%)

¹H NMR (CDCl₃): δ 2.93 (s, 4H, CH₂CH₂); 3.79 (s, 3H, OCH₃); 4.76 (br s, OH); 6.73–6.92 (m, 4H, Ar); 7.06–7.28 (m, 4H, Ar) ppm.

SCHEMA 3**SINTESI DELL'1-((E/Z)-2-(3-METOSSIFENIL)ETENIL)-2-NITROBENZENE 15**

Ad una soluzione del sale **11** (8.00 g; 19.1 mmoli) in CH₃CN e (8 ml) sono stati aggiunti DBU (2 ml) ed il composto commerciale 2-nitrobenzaldeide **14** (2.88 g; 19,1 mmoli). La miscela è stata lasciata in agitazione a refluxo per 12 ore.

Trascorso tale periodo, il solvente è stato evaporato ed il residuo ripreso con AcOEt e lavato con H₂O, HCl e NaCl. La soluzione organica è stata essiccata ed il solvente evaporato a p.r., ottenendo il grezzo della miscela **15** degli isomeri *E/Z* che è stata utilizzata nella successiva reazione senza ulteriori purificazioni.



Resa: 95%

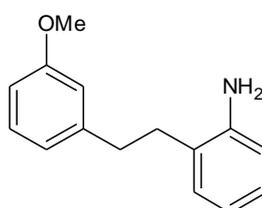
¹H NMR (CDCl₃): δ 3.60 e 3.85 (s, 3H, OCH₃, mix *E/Z*); 6.57- 7.15 (m, 3H, Ar, CH=CH); 7.26-7.78 (m, 6H, Ar); 7.94-8.10 (m, 1H, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

C₁₅H₁₃NO₃	C	H	N
Calc. %	70.58	5.13	5.49
Trov. %	70.39	5.03	5.18

SCHEMA 3**SINTESI 2-(2-(3-METOSSIFENIL)ETIL)ANILINA 16**

Una soluzione della miscela *E/Z* del composto **15** (4.64 mg; 18.2 mmoli) in EtOH (82 ml) è stata sottoposta ad idrogenazione, utilizzando come catalizzatore Pd/C (312 mg; 18.2 mmoli) a t.a per 12h. Trascorso tale periodo, la miscela viene filtrata su setto con celite e l'EtOH è evaporato a p.r., ottenendo il grezzo del composto **16**, il quale è stato purificato attraverso una cromatografia su colonna, utilizzando come eluente CHCl₃.



Resa: 0,53%

¹H NMR (CDCl₃): δ: 2.74- 2.97 (m, 4H, CH₂CH₂); 3.78 (s, 3H, OCH₃); 6.66-6.83 (m, 5H, Ar); 7.02-7.09 (m, 2H, Ar); 7.20 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, Ar) ppm.

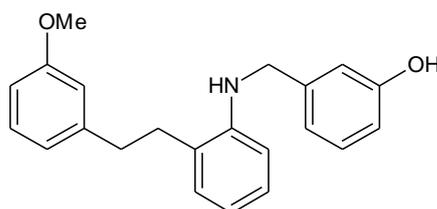
ANALISI ELEMENTARE:

C₁₅H₁₇NO	C	H	N
Calc. %	79.26	7.54	6.16
Trov. %	79.16	7.37	6.04

SCHEMA 3**SINTESI DELL'3-(((2-(2-(3-METOSSIFENIL)ETIL)FENIL)AMMINO)METIL)FENOLO 4**

Ad una soluzione del composto **16** (425 mg; 1.87 mmoli) in EtOH (11 ml) è stata aggiunta la 3-idrossi-benzaldeide commerciale (228 mg; 1.87 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a refluxo per 12 h.

Trascorso tale periodo, la soluzione viene portata a 0°C e addizionata di una soluzione acquosa di NaBH₄ (70.8 mg). La sospensione ottenuta è stata mantenuta a t. a. per circa 12h. Il solvente è stato poi evaporato, il residuo così ottenuto è stato ripreso con CHCl₃ e lavato con H₂O. La fase organica è stata essiccata ed evaporata e il grezzo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente n-Esano/AcOEt in rapporto 7:3.



Resa: 40%

¹H NMR(CDCl₃): δ 2.76-2.95 (m, 4H, CH₂CH₂); 3.74 (s, 3H, OCH₃); 4.23 (s, 2H, CH₂); 6.57 (d, 1H, *J* = 8.2Hz, Ar); 6.69-6.89 (m, 7H, Ar); 7.06-7.26 (m, 4H, Ar) ppm.

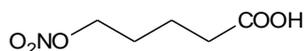
ANALISI ELEMENTARE:

C₂₂H₂₃NO₂	C	H	N
Calc. %	79.02	6.95	4.20
Trov. %	78.89	6.80	4.23

SCHEMA 3**SINTESI DELL'ACIDO 5-NITROSSIPENTANOICO 18**

Ad una soluzione di AgNO_3 (3.36 g; 19.8 mmoli) in CH_3CN (19 ml) è stato aggiunto all'acido 5-bromopentanoico commerciale **17** (1.00 g; 5.00 mmoli).

La miscela di reazione è stata lasciata, al buio per 1h, quindi il precipitato (AgBr e AgNO_3 non reagito) è stato filtrato e il solvente evaporato. Il grezzo ottenuto è stato triturato con CHCl_3 (20 ml) filtrato e il solvente evaporato per dare il composto desiderato come un olio giallo **18**.



Resa: 72%

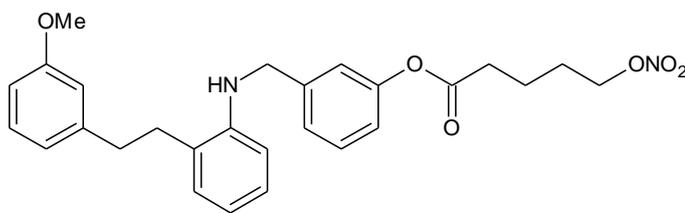
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 1.68-1.87 (m, 4H, CH_2); 2.42 (t, 2H, $J=6.8$ Hz, CH_2COOH); 4.47 (t, 2H, $J=6.8$ Hz, CH_2ONO_2) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_5$	C	H	N
Calc. %	36.81	5.56	8.59
Trov. %	36.57	5.65	8.32

SCHEMA 3**SINTESI DELL'3-((2-(3-METOSSIFENETIL)FENIL)AMMINO)FENIL 5-(NITROSSI)PENTANOATO 2**

Ad una soluzione dell'acido **18** (238 mg; 1.46 mmoli) e del derivato **3** (487 mg; 1.46 mmoli) in THF (15 ml) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di DCC (0.31 g; 1.75 mmoli) in THF (11 ml) e DMAP (13 mg). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a t. a. per 10 h. La sospensione risultante è stata, poi, filtrata e la fase organica evaporata ottenendo un solido grezzo che è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente $\text{CHCl}_3/\text{n-Esano}$ in rapporto 7:3.



Resa: 40%

$^1\text{H NMR}(\text{CDCl}_3)$: δ 1.83-1.87 (m, 4H, CH_2); 2.61 (t, 2H, $J=6.8$ Hz, CH_2COOH); 2.77-2.97 (m, 4H, CH_2CH_2); 3.75 (s, 3H, OCH_3); 4.31 (s, 2H, CH_2); 4.49 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz, CH_2ONO_2); 6.61 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, Ar); 6.71-6.80 (m, 7H, Ar); 6.97-7.01 (m, 1H, Ar); 7.07-7.26 (m, 5H, Ar); 7.30-7.38 (m, 2H, Ar) ppm.

ANALISI ELEMENTARE:

$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6$	C	H	N
Calc. %	67.77	6.32	5.85
Trov. %	67.89	6.08	5.78

BIGLIOGRAFIA

1. Kim, W.S.; Weickert, C.S.; Garner, B. Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J Neurochem.* (2008), 104, 1145-1166.
2. Loo W., Barlett M.C., Clarke D.M., *J. Biol. Chem.* (2003), 278, 20449-20452.
3. Rapposelli S., Digiacomo M. e Balsamo A., P-gp Transporter and its Role in Neurodegenerative Diseases, *Current Topics in Medicinal Chemistry* (2009), 9, 209-217.
4. Lacombe P.S., Vicente J.A.G., Pagès J.G., Morselli P.L., *Drugs* (1996), 51, 552-570.
5. Sauna Z.E., *Biol. Chem.* (2001), 11653.
6. Bradshaw D.M., Arceci R.J., Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance, *J. Clin. Oncol.* (1998), 3674-3690.
7. Wolfgang Löscher, Heidrun Potshka ,Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases, *Progress in Neurobiology* 76, (2005) , 22-76.
8. 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.

9. 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.
10. Shapira A.H., Biology of Parkinson's disease, *Neurobiol.* (2006), 66, S10-23.
11. Tishler, D. M.; Weinberg, K.I.; Hinton, D.R.; Barbaro, N.; Annett, G. M.; Raffel, C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* (1995), 36, 1-6.
12. 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.
13. Brandt, C.; Bethmann, K.; Gastens, A. M.; Löscher, W. 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.
14. Bauer, B.; Hartz, A. M.; Pekcec, A.; Toellner, K.; Miller, D. S.; Potschka, H. Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. *Mol. Pharmacol.* (2008), 73, 1444-1453.
15. 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.
16. Bogman K., *Pharmacol.*, (2001), 1183.
17. Martin C., Br. J., *Pharmacol.*, (1999), 403.
18. Martin, C.; Berridge, G.; Mistry, P.; Higgins, C.; Charlton, P.; Callaghan, R. Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* (2000), 39, 11901-11906.

19. Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* (2009), 323, 1718–1722.
20. Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* (1981), 41 (5), 1967-1972.
21. Nicola Antonio Colabufo, Francesco Berardi, Mariangela Cantore, Marialessandra Contino, Carmela Inglese, Mauro Niso, and Roberto Perrone, Perspectives of P-Glycoprotein Modulating Agents in Oncology and Neurodegenerative Diseases: Pharmaceutical, Biological, and Diagnostic Potentials - *J. Med. Chem.* (2010), 53, 1883–1897.
22. Foxwell, B. M.; Mackie, A.; Ling, V.; Ryffel, B. Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. *Mol. Pharmacol.* (1989), 36, 543–546.
23. Solary, E.; Velay, I.; Chauffert, B.; Caillot, D.; Bidan, J. M.; Dumas, M.; Casasnovas, O.; Guy, H. Quinine circumvents the doxorubicin resistance of a multidrug resistant human leukemic cell-line, K562/DXR. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* (1990), 32, 361–363.
24. Hu, X. F.; Nadalin, G.; De Luise, M.; Martin, T. J.; Wakeling, A.; Huggins, R.; Zalcborg, J. R. Circumvention of doxorubicin resistance in multi-drug resistant human leukaemia and lung cancer cells by the pure antioestrogen ICI 164384. *Eur. J. Cancer* (1991), 27, 773–777.
25. Krishna, R.; Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR

- modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2000), 11, 265–283.
26. Thomas, H.; Coley, H. M. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* (2003), 10, 159–165.
27. Modok, S.; Mellor, H. R.; Callaghan, R. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* (2006), 6, 350–354.
28. Stupp, R.; Bauer, J.; Pagani, O.; Gerard, B.; Cerny, T.; Sessa, C.; Bastian, G.; Sarkany, M.; Schlapfer, J.; Giroux, B.; Leyvraz, S. Ventricular arrhythmia and torsade de pointe: dose limiting toxicities of the MDR-modulator S9788 in a phase I trial. *Ann. Oncol.* (1998), 9, 1233–1242.
29. Wandel, C.; Kim, R. B.; Kajiji, S.; Guengerich, P.; Wilkinson, G. R.; Wood, A. J. P-glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res.* (1999), 59, 3944–3948.
30. Dantzig A.H., *Curr. Med. Chem.*, (2001), 39.
31. Mistry P., *Cancer Res.*, (2001), 749.
32. Sikic B.J., Modulation of multidrug resistance: a paradigm for translational clinical research, (1999), 183.
33. Fischer V., The multidrug resistance modulator valspodar (PSC 833) is metabolized by human cytochrome P450 3A4, (1998), 802.
34. Guix F.X., Uribealago I., Coma M., Munoz F.J., The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Prog Neurobiol* 76: 126–152, (2005).

35. Gatto E.M., Riobo N.A., Carreras M.C., Chernavsky A., Rubio A., Satz M.L., Poderoso J.J., Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* 4: 534–539, (2000).
36. Ara J., Przedborski S., Naini A.B., Jackson-Lewis V., Trifiletti R.R., Horwitz J., Ischiropoulos H., activation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7659–7663, (1998).
37. Pal Pacher, Joseph S. Beckman and Lucas Liaudet: Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* (2007); 87: 315-424.
38. Bartels, A.L.; Willemsen, A.T.M.; Kortekaas, R.; de Jong, B.M.; de Vries, R.; de Klerk, O.; van Oostrom, J.C.H.; Portman, A.; Leenders, K.L. Decreased blood-brain barrier P-glycoprotein function in the progression of Parkinson's disease, PSP and MSA. *J Neural Transm* (2008), 115, 1001.
39. Vogelgesang, S.; Cascorbi, I.; Kroemer, H.K.; Schroeder, E.; Pahnke, J.; Siegmund, W.; Keil, C.; Warzok, R.W.; 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.
40. Thatcher GR, Bennett BM, Reynolds JN. NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* (2006), 3(3), 237.
41. Colabufo, N.A.; Berardi, F.; Perrone, R.; Rapposelli, S.; Digiacomo, M.; Balsamo, A. Arylmethoxyphenyl Derivatives: Small Molecules Displaying P-Glycoprotein Inhibition. *Journal of Medicinal Chemistry* (2006), 49(22), 6607-6613.

INDICE

INTRODUZIONE GENERALE	3
- I TRASPORTATORI ABC (ATP-BINDING CASSETTE).....	4
- LA GLICOPROTEINA P.....	6
o <i>Struttura della P-gp</i>	7
o <i>Meccanismo d'azione della P-gp</i>	8
- LOCALIZZAZIONE E RUOLO DELLA P-gp.....	11
o <i>P-gp e le barriere cerebrali</i>	12
o <i>P-gp e la placenta</i>	14
- P-gp E LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE.....	15
o <i>P-gp e Alzheimer</i>	15
o <i>P-gp e Parkinson</i>	17
o <i>P-gp ed Epilessia</i>	18
- MULTIDRUG RESISTANCE (MDR).....	21
- SUBSTRATI E MODULATORI DELLA P-gp.....	22
- INIBITORI DELLA P-gp.....	24
o <i>Inibitori di prima generazione</i>	24
o <i>Inibitori di seconda generazione</i>	25
o <i>Inibitori di terza generazione</i>	26
- L'OSSIDO NITRICO.....	29
- NO E PEROSSINITRITO E LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE....	33
o <i>Implicazioni dell'NO nel Parkinson</i>	34

o <i>Implicazioni dell'NO nell'Alzheimer</i>	34
- FARMACI NO-DONOR.....	35
INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE	37
PARTE SPERIMENTALE	47
BIBLIOGRAFIA	61

RINGRAZIAMENTI

Ai Professori che mi hanno aiutata a terminare il mio percorso universitario, in particolare alla Dott.ssa Rapposelli per avermi permesso di svolgere la tesi in questo laboratorio.

Alla Dott.ssa Nesi per la sua pazienza, per avermi aiutato e consigliato durante il laboratorio e lo svolgimento della tesi.

A mia madre Elena e mio padre Lamberto per i loro sacrifici, per essermi stati sempre vicino ed avermi sostenuto nei momenti difficili.

A mio marito Leonardo per avermi aiutato e capito in questo periodo della mia vita e per essermi stato accanto in ogni momento.

A tutti i miei amici, in particolare Alice, Valentina ed Elena per avermi aiutato a non perdermi d'animo e ad arrivare fino in fondo .