



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA E
TOSSICOLOGIA SPERIMENTALI**

CICLO XXVII

**Ligandi dei siti recettoriali orto- e allosterici:
caratterizzazione in vitro e in vivo di nuovi
derivati dualsterici bisammonioalcanici**

Coordinatore e Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Elisabetta Barocelli

Tesi di dottorato di:

Valentina Vivo

TRIENNIO ACCADEMICO 2012-2014



Alla mia famiglia

INDICE

ABSTRACT	I
SOMMARIO	III
INTRODUZIONE	1
Ligandi ortosterici e allosterici	1
Ligandi dualsterici.....	2
Dolore.....	5
Fisiopatologia del dolore	6
Trasmissione del dolore	6
Modulazione del dolore	8
Dolore nocicettivo e dolore neuropatico	10
Terapie farmacologiche del dolore	11
Analgesia e recettori muscarinici.....	16
Livello spinale.....	17
Livello sovraspinale	19
Livello periferico	21
Agonisti muscarinici in terapia.....	22
OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	23
MATERIALI E METODI	30
Studi funzionali in vitro	30
Vasi deferenti di coniglio (M_1).....	30
Atrio sinistro di cavia (M_2).....	31
Ileo terminale di cavia (M_3)	31
Determinazione dell'attività anticolinesterasica	33
Preparazione dell'omogenato cerebrale.....	33

Studi in vivo	34
Determinazione dell'attività analgesica nel topo.....	34
Writhing test	34
Hot plate test	35
Determinazione dell'attività locomotoria nel topo	36
Open field test	36
Effetti sistemici nel topo.....	36
Effetti sistemici nel ratto anestetizzato	37
Protocollo sperimentale.....	37
Cardiocircolo	37
Analisi dei dati	38

RISULTATI 41

Caratterizzazione funzionale in vitro.....	41
Valutazione dell'attività analgesica: Writhing test.....	46
Valutazione dell'attività analgesica: Hot plate test.....	54
Valutazione dell'attività sedativa.....	57
Valutazione effetti indesiderati muscarinici.....	65
Effetti sul sistema cardiovascolare: composto 8b.....	68
Caratterizzazione attività analgesica	71
Composto 8b.....	71
Caratterizzazione attività analgesica	73
Composto P-6-ISOX.....	73

DISCUSSIONE 75

Derivati del Nafmetonio e del W84	75
Derivati ISOX	78

BIBLIOGRAFIA 81

ABSTRACT

In this study we characterized *in vitro* and *in vivo* three different groups of dualsteric compounds, which were synthesized as M₂ muscarinic agonists. These bitopic ligands, which incorporate in a unique molecule an orthosteric muscarinic agonist and a molecular fragment of different allosteric modulators, are expected to bind simultaneously to the orthosteric and the allosteric sites present in the M₂ receptor discriminating this receptor subtype with respect to the other muscarinic receptors.

The interest in these molecules derives from the hypothesis that compounds which display M₂ subtype preference could be a promising strategy to develop novel analgesic agents as an improved approach alternative to the current pain therapy, today still inadequate because of the development of dependence and untoward effects or, sometimes, poorly effective.

Indeed, by taking advantage of the structural heterogeneity between the allosteric sites of muscarinic receptors, dualsteric ligand could display M₂ subtype preference to reach analgesic properties without relevant cholinergic side effects.

The first two groups of hybrids here studied behaved as potent M₂ full agonists endowed with slightly lower potency and intrinsic activity against M₁ and M₃ subtypes when studied in proper isolated organ preparations; instead the last group of compounds showed only weak muscarinic agonism and negligible ability to activate M₂ receptors.

In vivo, almost all the compounds showed dose-dependent analgesic effects in *Writhing test* but, nevertheless an improved tolerability profile compared with the respective orthosteric progenitor, only few agents deserved a deeper investigation on their effective analgesic activity.

The final result was the identification of a selective M₂ muscarinic bitopic agonist, 8b, with a remarkable and safe antinociceptive property that provides

support to the strategy to generate dualsteric ligands as advantageous tools opening promising avenues toward novel pain therapy.

Lastly, an exciting unexpected result arising from this research is the identification of analgesic compounds endowed with a multiple but muscarinic-independent mechanism of action whose pharmacology remains to be further investigated.

SOMMARIO

In questo studio sono stati caratterizzati *in vitro* e *in vivo* tre diverse serie di composti dualsterici sintetizzati come agonisti muscarinici preferenziali per il sottotipo recettoriale M_2 . Questi ibridi sono caratterizzati dalla capacità di interagire contemporaneamente con il sito di legame del ligando endogeno, definito ortosterico, e con il sito allosterico. Sono infatti ottenuti dalla fusione di potenti agonisti muscarinici ortosterici con modulatori allosterici.

Il vantaggio di avere molecole preferenziali per il sottotipo M_2 potrebbe avere un risvolto terapeutico importante nell'ambito del trattamento del dolore.

Infatti, nonostante i progressi fatti nella comprensione della fisiopatologia del dolore, la terapia farmacologica delle sintomatologie dolorose è spesso inadeguata. Gli approcci per sviluppare nuove molecole o individuare nuovi possibili bersagli terapeutici sono in continua evoluzione.

Nell'ambito della ricerca di nuovi target un ruolo importante hanno i recettori muscarinici; infatti è noto da tempo il coinvolgimento di questi recettori, in particolare del sottotipo M_2 , nel mediare analgesia.

La difficoltà nello sviluppo di agonisti muscarinici come analgesici risiede però nella difficile capacità di discriminare tra i diversi sottotipi recettoriali, data l'elevata omologia del sito di legame ortosterico tra le sottopopolazioni della famiglia dei recettori muscarinici.

Questo comporta l'insorgenza di pesanti effetti avversi dovuti ad esempio a stimolazione M_3 . La capacità dei ligandi dualsterici di interagire contemporaneamente anche con il sito allosterico, molto meno conservato tra i diversi sottotipi, potrebbe conferire una preferenzialità per il sottotipo M_2 .

In questa ottica si potrebbe disporre di agenti dotati di proprietà analgesiche, ma accompagnati da una ridotta incidenza di effetti avversi.

Tramite studi funzionali *in vitro* sono state quindi determinate potenza ed efficacia nei confronti di tre sottotipi recettoriali muscarinici, M_1 , M_2 , M_3 , nonché l'attività anticolinesterasica dei derivati in studio.

L'attività analgesica dei composti è stata invece valutata *in vivo* tramite *Writhing test* e *Hot plate test*; inoltre è stata monitorata la comparsa di effetti sedativi, in grado di alterare o interferire con le risposte ottenute dai test di analgesia, così come dei principali effetti avversi centrali e periferici dovuti a stimolazione muscarinica.

Le prime due serie di ibridi in studio hanno rivelato *in vitro* un comportamento da potenti agonisti nei confronti del recettore M_2 , con valori di potenza e attività intrinseca leggermente più bassi per i sottotipi M_1 e M_3 ; invece i composti dell'ultima serie hanno mostrato solo un debole agonismo verso i recettori muscarinici, ed una capacità di stimolare i recettori M_2 trascurabile.

Tuttavia *in vivo* tutte le serie hanno mostrato un'azione analgesica dose-dipendente nel *Writhing test*. Sebbene gli ibridi abbiano mostrato un profilo di tollerabilità migliore rispetto ai propri progenitori ortosterici, solo pochi derivati hanno meritato un ulteriore approfondimento dell'attività analgesica.

In particolare si è evidenziato il composto 8b, agonista bitopico M_2 , dotato di rilevanti proprietà analgesiche e buon profilo di tollerabilità, suggerendo che la strategia di sintetizzare ligandi dualsterici sembra essere un approccio valido e innovativo per lo sviluppo di agenti che possano rappresentare un'alternativa nell'ambito della terapia del dolore.

Infine, dallo studio dell'ultimo gruppo di derivati sono emersi risultati inaspettati, che hanno portato all'identificazione di composti dotati di proprietà analgesiche indipendenti dalla stimolazione muscarinica, il cui meccanismo d'azione necessita pertanto di ulteriori indagini.

INTRODUZIONE

Ligandi ortosterici e allosterici

I recettori accoppiati a proteine G (GPCRs) rappresentano la più grande famiglia di recettori di membrana, estremamente versatile.

Anche in virtù della loro distribuzione ubiquitaria sono coinvolti in una moltitudine di processi fisiologici e patologici. Non sorprende quindi che un elevato numero di farmaci in commercio abbia come bersaglio proprio i GPCRs (Overington et al., 2006). L'interesse nei confronti di questa superfamiglia è ancora attuale se si pensa da un lato che solo un quinto dei recettori accoppiati a proteine G è per ora un target terapeutico, suggerendo ulteriori possibilità di intervento per interazione con nuovi bersagli, dall'altro lato che si sono fatti importanti passi avanti nell'individuare modalità innovative di interazione con questi recettori, che hanno consentito di ottimizzare l'effetto delle molecole leganti (Valant et al., 2009).

L'approccio classico nello sviluppo di nuove molecole è quello di partire dalla struttura del ligando endogeno, utilizzando come target il suo sito di legame, definito ortosterico (Antony et al., 2009). Questa strategia spesso però comporta scarsa selettività, dal momento che i siti ortosterici sono altamente conservati tra i diversi sottotipi recettoriali, come accade ad esempio per la famiglia dei recettori muscarinici. È ormai risaputo che i GPCRs possono contenere anche siti di legame addizionali, definiti siti allosterici (Christopoulos, 2002), che presentano una sequenza amminoacidica molto meno ripetuta da un sottotipo all'altro. Modulatore allosterici sottotipo-selettivi possono dunque essere sviluppati più facilmente rispetto ad agonisti ed antagonisti ortosterici selettivi. La modulazione allosterica potrebbe quindi permettere lo sviluppo di agenti con migliorata affinità o selettività, capaci di effetti mirati e privi di attività indesiderate dovute all'attivazione contemporanea di più sottotipi recettoriali.

Ligandi dualsterici

I ligandi dualsterici sono molecole caratterizzate dalla capacità di legare contemporaneamente il sito ortosterico e quello allosterico. Queste molecole bitopiche nascono come ibridi derivati dalla combinazione di elementi modulatori allosterici e di elementi tipici di ligandi ortosterici, per cercare di superare la mancanza di selettività tra i vari sottotipi recettoriali che caratterizza gli agonisti ortosterici e la ridotta potenza propria dei ligandi allosterici (Figura 1) (Mohr et al., 2010).

Dualsteric ligands:

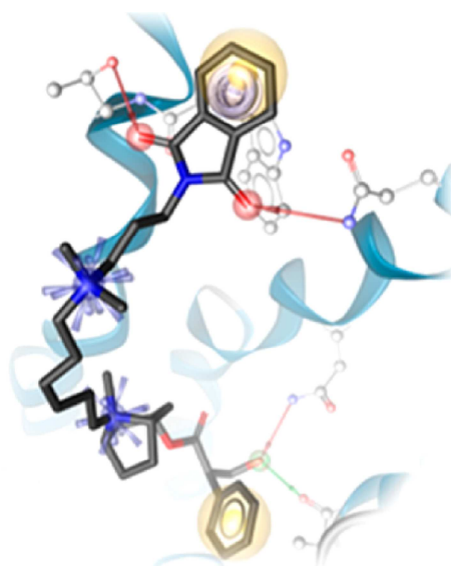
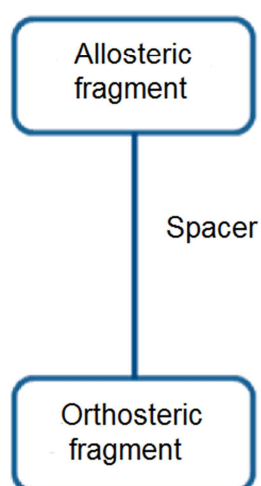


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura di un ligando bitopico (modificato da Schmitz et al., 2014).

In letteratura sono presenti lavori in cui si indagano le potenzialità di molecole in grado di interagire con diversi bersagli, la cui contemporanea attivazione concorra ad un effetto terapeutico, come ad esempio, nell'ambito di disordini del SNC caratterizzati da deficit colinergici, antagonisti dei recettori H_3 dotati anche di proprietà anticolinesterasiche (Incerti et al., 2010), oppure ligandi in grado di combinare l'attività di agonismo nei confronti dei recettori muscarinici M_1 con la capacità di inibire le colinesterasi (Fang et al., 2010).

Attualmente sono invece più rari gli esempi di veri e propri ligandi dualsterici, cioè ligandi che interagiscano contemporaneamente con due diversi siti collocati sullo stesso bersaglio recettoriale.

Recentemente sono state individuate due nuove molecole, TBPB e 77-LH-28-1, caratterizzate da un meccanismo di azione bitopico nei confronti del sottotipo recettoriale muscarinico M_1 (Keov et al., 2014) quali possibili alternative all'uso di uno stimolante muscarinico già conosciuto da tempo, la xanomelina, definito agonista preferenziale M_1/M_4 . Questo agonista si è rivelato in grado di migliorare le funzioni cognitive in patologie quali Alzheimer (Bodick et al., 1997) e schizofrenia (Shekhar et al., 2008), tuttavia presenta una efficacia limitata dall'inadeguata capacità di discriminazione tra i diversi sottotipi recettoriali, che porta alla comparsa di effetti indesiderati dovuti all'attivazione dei recettori M_2 e M_3 periferici. Di conseguenza questa innovativa modalità di interazione potrebbe essere un promettente approccio per lo sviluppo di agenti selettivi capaci di effetti mirati nella terapia dei disordini cognitivi, e privi di attività indesiderate dovute all'attivazione contemporanea di più sottotipi recettoriali.

Un altro recente esempio è rappresentato dalla sintesi di un composto ibrido in grado di legare il sito ortosterico e quello allosterico dei recettori adenosinici A1. La famiglia dei recettori adenosinici è un'altra importante classe di GPCRs; in particolare la stimolazione del sottotipo A1 comporta effetti protettivi a livello cardiaco, soprattutto in condizioni di danno da ischemia-riperfusion.

Tuttavia lo sviluppo di agonisti è stato fino ad ora reso difficoltoso per la presenza di importanti effetti negativi (bradicardia, ipotensione, blocco atrioventricolare). La sintesi del ligando bitopico VCP746 ha portato ad una molecola in grado di dissociare effetti terapeutici da effetti indesiderati (Valant et al., 2014).

Nell'ambito di questo filone di ricerca nascono le serie di derivati oggetto del nostro studio, sintetizzati come potenziali agonisti dualsterici muscarinici M_2 preferenziali; il legame simultaneo a entrambi i siti orto- e allosterico è reso possibile dalla vicinanza topografica dei due siti recettoriali: il sito allosterico è collocato in un loop extracellulare, all'ingresso della tasca di legame del ligando endogeno (Figura 2).

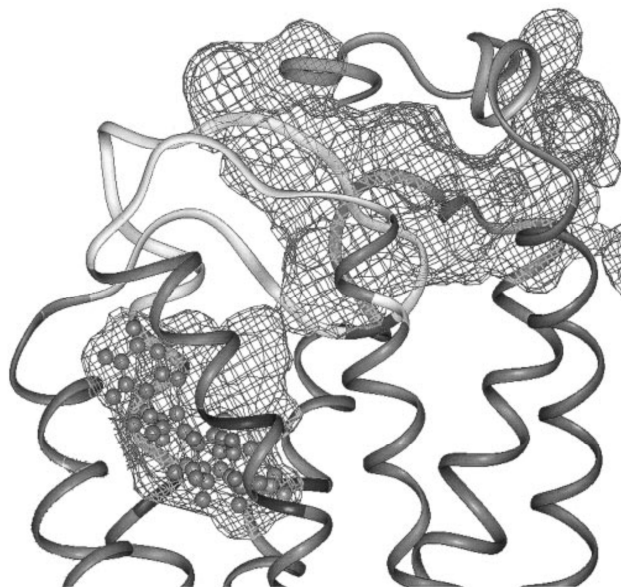


Figura 2: Modello del recettore M_2 che mostra il sito di legame ortosterico con legata l’N-metilscopolamina (NMS) e il sito di legame allosterico. Il loop extracellulare è rappresentato in grigio chiaro, i volumi accessibili sono rappresentati dalla griglia (Voigtländer et al., 2003).

I composti bisammonioalcanici in studio sono caratterizzati dalla fusione di componenti di agonisti ortosterici con componenti di modulatori allosterici, divisi da uno spaziatore metilenico (Disingrini et al., 2006).

Le diverse serie di composti ibridi sono state valutate per le loro proprietà antinocicettive, dal momento che il ruolo dei recettori muscarinici, in particolare gli M_2 , nel mediare analgesia è dimostrato da tempo (George et al., 1962); il principale ostacolo nello sviluppo di analgesici colino mimetici risiede proprio nella difficoltà di sviluppare molecole selettive per un particolare sottotipo recettoriale, data l’elevata omologia tra i recettori muscarinici.

Disporre di molecole preferenziali per il sottotipo recettoriale M_2 potrebbe consentire di avere effetti terapeutici mirati, con ridotta comparsa di effetti avversi dovuti all’interazione con gli altri sottotipi recettoriali.

Ad esempio la stimolazione dei recettori M_3 periferici può comportare a livello di muscolatura liscia l’incremento della motilità intestinale, con conseguenti diarrea e dolori addominali; può inoltre comportare costrizione bronchiale, così come aumento delle secrezioni esocrine salivari e gastriche.

Dolore

Il dolore è un universo complesso e poliedrico, difficile da inquadrare soltanto attraverso una definizione; è una sensazione di sofferenza che può incidere anche profondamente sulla vita dei pazienti. Fisiologicamente il dolore è un sintomo, una corretta risposta di adattamento che riveste un ruolo protettivo essenziale; infatti la capacità di provare dolore è lo strumento che il nostro organismo possiede per evitare o ridurre i danni tissutali. Quando però si verifica una alterata risposta di adattamento ad un insulto tissutale nervoso o non nervoso, il dolore cessa di avere la funzione di vantaggio biologico, diventando una vera e propria patologia (Mannion and Woolf, 2000).

Il dolore che va aldilà della funzione protettiva è spesso rappresentato dal dolore di tipo cronico, fortemente invalidante per l'individuo.

La differenza tra dolore cronico e acuto, al contrario di quanto si potrebbe pensare, non si esprime in termini temporali, bensì è correlata alla capacità o meno dell'organismo di ripristinare le condizioni fisiologiche.

Il dolore cronico si automantiene, in quanto deriva da alterazioni delle vie nervose nocicettive indotte da un danno iniziale, e persiste anche quando questo non è più presente.

Il dolore è uno dei principali problemi di salute pubblica: dati epidemiologici indicano che il dolore cronico in Europa affligge circa 1 persona su 4; la prevalenza si aggira intorno al 20%, ma può arrivare anche fino al 40% (Breivik et al., 2013). Inoltre è riportato che 1/5 circa dei pazienti soffre di sintomatologie dolorose per periodi molto prolungati, di oltre 20 anni (Breivik et al., 2006).

C'è quindi un enorme impatto non soltanto sulla qualità della vita degli individui, pesantemente compromessa per le difficoltà o impossibilità a svolgere le normali attività quotidiane, a lavorare e a dormire, ma anche sulla società, in termini sia di costi diretti, relativi alla spesa sanitaria (circa 200 miliardi di euro all'anno in Europa; van Hecke et al., 2013), sia indiretti, relativi alle giornate lavorative perse.

Fisiopatologia del dolore

Trasmissione del dolore

La percezione del dolore è conseguenza della stimolazione di specifici recettori, che vengono definiti nocicettori, deputati al riconoscimento degli stimoli dolorifici, che possono essere di diversa natura, chimica, meccanica, termica.

I nocicettori sono presenti sulle terminazioni periferiche di nervi sensitivi afferenti, e la loro attivazione comporta l'insorgenza di un potenziale d'azione che si propaga lungo le fibre nervose, consentendo la trasmissione dello stimolo nocicettivo a livello centrale. Le principali fibre deputate alla trasmissione della sensazione dolorifica sono le fibre A δ e le fibre C. Le prime sono mieliniche, caratterizzate da un'alta velocità di conduzione (20m/s), e consentono di percepire una sensazione dolorosa immediata e ben localizzata; le seconde sono fibre polimodali, cioè in grado di rispondere non solo a stimoli nocivi di natura meccanica e termica, ma anche chimica, conseguenti ad esempio al rilascio di mediatori infiammatori. Sono fibre amieliniche, (velocità di conduzione 2m/s), e trasmettono un dolore sordo, continuo e meno localizzato (Figura 3) (Raja et al., 1999).

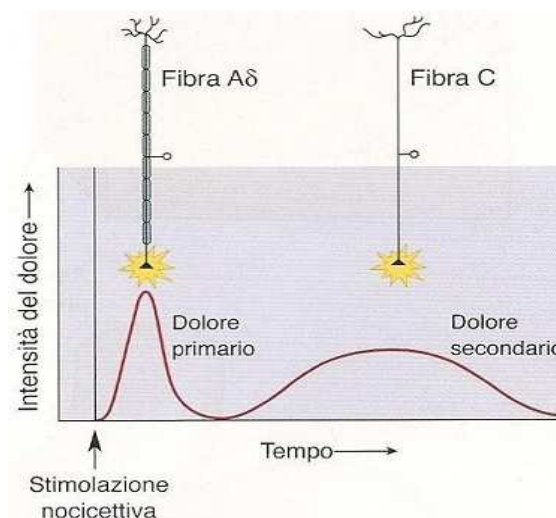


Figura 3: Rappresentazione schematica delle fibre nocicettive A δ e C. (Bear M, Neuroscienze III ed. 2007).

Le fibre nervose afferenti nocicettive entrano nelle corna dorsali del midollo spinale. Subito al loro ingresso formano delle connessioni sinaptiche con i neuroni sensitivi di secondo ordine, i cui corpi sono presenti nella substantia gelatinosa (SG). Le fibre di secondo ordine dopo decussazione ascendono controlateralmente nel midollo spinale formando fasci di fibre sia nella sostanza bianca laterale (tratti spinotalamici laterali) che nella sostanza bianca anteriore (tratti spinotalamici anteriori). Nell'insieme, queste vie costituiscono il sistema anterolaterale, e terminano nella sostanza reticolare del tronco encefalico e del talamo. Le afferenze talamiche raggiungono poi i nuclei ventrobasali e da qui i neuroni di terzo ordine proiettano verso la corteccia somatosensoriale, dove avviene la presa di coscienza della sensazione dolorifica (Figura 4) (Schnitzler and Ploner, 2000).

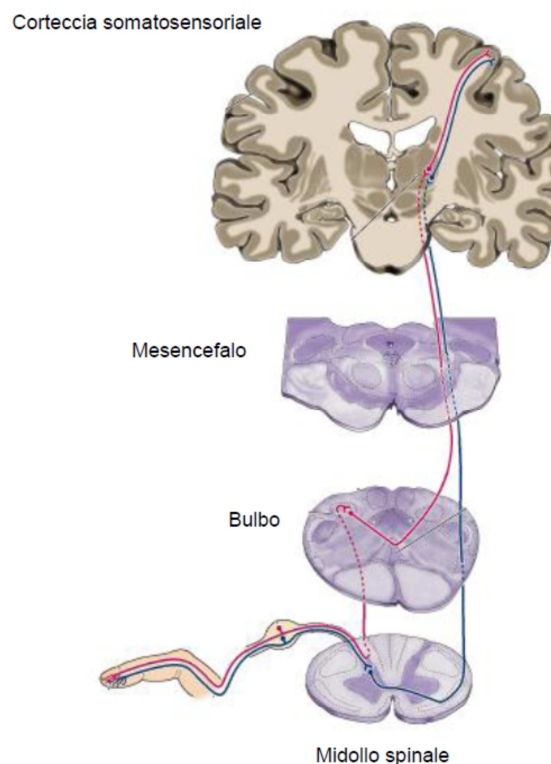


Figura 4: Rappresentazione schematica della trasmissione della sensazione dolorifica (modificato da Kandel ER, Principi di neuroscienze. Casa editrice ambrosiana 2003).

Modulazione del dolore

La percezione del dolore è il risultato del combinarsi degli impulsi che viaggiano in senso centripeto lungo le vie afferenti sensitive verso i nuclei corticali e sottocorticali e degli impulsi che da tali aree discendono in senso centrifugo inverso, diretti a controllare in senso inibitorio le afferenze nocicettive.

Queste vie discendenti sono quindi deputate alla modulazione della sensazione dolorifica ed integrano le informazioni sensitive, cognitive, emotive e motivazionali con le informazioni nocicettive afferenti (Gebhart, 2004).

Un centro molto importante del sistema discendente è costituito dalla sostanza grigia periacqueduttale (PAG) del mesencefalo, una piccola area di sostanza grigia che circonda il canale centrale. È stato infatti dimostrato nel ratto che la stimolazione elettrica di questa area cerebrale ha effetti analgesici di intensità sufficiente a consentire l'esecuzione di un intervento di chirurgia addominale senza anestesia e senza causare alcuna risposta di fuga da parte dell'animale (Reynolds, 1969). Le informazioni arrivano al PAG da ippocampo, corteccia, talamo e sono proiettate poi in un'area del midollo allungato, vicino alla linea mediana, conosciuta come Nucleo Magnocellulare del Rafe (NRM).

Dal NMR le vie nervose terminano nelle corna dorsali dove, mediante la liberazione di serotonina, modulano l'attività di interneuroni inibitori encefalinerfici a livello della sostanza gelatinosa (SG) (Figura 5).

La funzione di controllo degli interneuroni inibitori della SG viene descritta come "teoria del controllo a cancello". Questi interneuroni intervengono nel modulare sia l'attività delle fibre afferenti che entrano nel midollo spinale, sia l'attività delle fibre discendenti del Nucleo Magnocellulare del Rafe. Questo meccanismo di controllo è influenzato dall'attività delle fibre di grande e piccolo diametro: l'attività delle fibre A β tende ad inibire la trasmissione (chiude il cancello), mentre l'attività delle fibre A δ e C facilita la trasmissione (apre il cancello).

I peptidi oppioidi intervengono nel modulare la trasmissione dolorifica sia a livello della sostanza grigia periacqueduttale, che della sostanza gelatinosa, che a livello periferico.

Oltre alla trasmissione oppioide è stato riconosciuto un ruolo nella modulazione inibitoria della percezione dolorifica anche alle fibre noradrenergiche che

originano dal locus coeruleus; queste, raggiungendo le corna dorsali, inibiscono la trasmissione dolorifica mediante l'attivazione di recettori α_2 presinaptici.

È stato infine dimostrato, grazie alla somministrazione locale di carbacholo, che anche l'attivazione dei recettori muscarinici nella PAG induceva analgesia nei ratti (Guimarães et al., 2000).

In conclusione, l'integrazione dei segnali spinali, sovraspinali e discendenti inibitori interviene nella percezione degli stimoli dolorifici e coinvolge l'attività e il rilascio di numerosi neurotrasmettitori, tra cui peptidi oppioidi endogeni, noradrenalina, serotonina e acetilcolina (Fiorino and Garcia-Guzman, 2012).

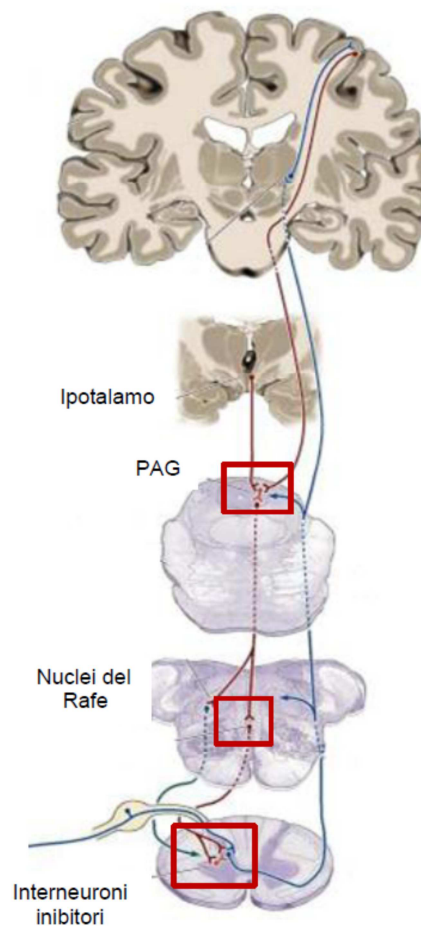


Figura 5: Rappresentazione schematica della modulazione della sensazione dolorifica (modificato da Kandel ER, Principi di neuroscienze. Casa editrice ambrosiana 2003).

Dolore nocicettivo e dolore neuropatico

Due grandi categorie di dolore sono il dolore di tipo nocicettivo e il dolore di tipo neuropatico. Il dolore nocicettivo è conseguenza di un danno tissutale o infiammatorio, e può essere suddiviso in dolore somatico o viscerale.

Nel primo caso sono coinvolti i nocicettori localizzati a livello di apparato muscolo-scheletrico, cutaneo o articolare; è di solito un dolore ben localizzato, definito e associato al luogo della lesione.

Il dolore nocicettivo viscerale coinvolge invece gli organi toraci e addominali; spesso è intermittente, con fitte di maggiore intensità, e può essere riferito, cioè proiettato a distanza rispetto al viscere in cui origina lo stimolo nocivo, come ad esempio il dolore al braccio nel corso di un infarto miocardico (Sikandar and Dickenson, 2012).

Il dolore neuropatico è causato da una lesione o disfunzione a livello del sistema nervoso centrale o periferico; è un dolore severo che può insorgere dopo un periodo di latenza rispetto alla lesione, può essere di tipo urente o lancinante e permane anche dopo che è venuta meno la causa scatenante.

I più comuni esempi di dolore neuropatico periferico sono la neuropatia diabetica, la nevralgia del trigemino e la nevralgia post-erpetica; si parla di dolore neuropatico centrale ad esempio nei casi di lesioni al midollo spinale, sclerosi multipla, ictus (Szczudlik et al., 2014).

Il dolore neuropatico infine è comune nel cancro, come risultato della compressione di nervi periferici, effetti collaterali di farmaci chemioterapici, della radioterapia o della chirurgia (Bartolini et al., 2011).

Terapie farmacologiche del dolore

La terapia per la gestione del dolore deve essere volta alla soppressione del dolore stesso e al miglioramento della qualità di vita del paziente.

Le linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), prima riferite alla gestione del dolore oncologico cronico, e poi estese anche al dolore cronico di tipo non oncologico, sono basate su un approccio terapeutico sequenziale, che naturalmente deve essere adattato alle esigenze di ogni singolo paziente.

Sono dunque previste tre fasi progressive che indicano fundamentalmente l'utilizzo di:

- 1) FANS
- 2) Oppioidi per il dolore lieve e moderato (Codeina, Tramadolo, Buprenorfina...)
- 3) Oppioidi per il dolore moderato e severo (Morfina, Metadone, Ossicodone...)

Il passaggio da una fase alla successiva è determinato dalla severità e dalla persistenza del dolore. L'utilizzo di queste classi di farmaci è accompagnato da noti effetti collaterali che spaziano dalla comparsa di ulcere e sanguinamenti per i FANS a fenomeni di tolleranza, dipendenza e depressione respiratoria per gli analgesici oppioidi. Oltre a questo bisogna considerare che, soprattutto chi soffre di dolore neuropatico, raramente risponde ai FANS, ed è molto comune l'insorgenza di resistenza agli analgesici oppioidi. Di conseguenza la terapia farmacologica, in particolare per il dolore neuropatico, risulta spesso inadeguata e difficoltosa. Ci sono altre importanti classi di farmaci utilizzati principalmente in casi di dolore neuropatico: gli antidepressivi triciclici e gli antiepilettici, la cui azione viene ricondotta, rispettivamente, all'aumento del tono serotoninergico e adrenergico delle vie discendenti inibitorie e al blocco dei canali Na^+ e Ca^{++} dipendenti. Purtroppo anche questi farmaci sono caratterizzati da effetti avversi che spesso ne limitano l'utilizzo (ad esempio effetti anticolinergici come disturbi urinari, o effetti a livello cardiaco per gli antidepressivi; fenomeni di sedazione e vertigini per gli antiepilettici).

È quindi fondamentale la ricerca di nuovi bersagli o molecole in grado di esplicare attività analgesica accompagnata il più possibile da ridotti effetti collaterali. Nell'ambito della ricerca di nuovi approcci analgesici si collocano ad esempio gli antagonisti del recettore N-metil-D-aspartato, NMDA, e gli agonisti α_2 -adrenergici, come la clonidina.

Lo sviluppo di antagonisti NMDA è stato oggetto di intensa ricerca, dato il coinvolgimento di questi recettori a livello periferico, spinale e centrale.

Sono stati dunque pianificati e condotti molteplici studi tesi a sviluppare antagonisti ortosterici, così come modulatori allosterici, tuttavia i risultati sono ancora poco incoraggianti (Bleakman et al., 2006).

Infatti, nonostante numerosi studi preclinici abbiano evidenziato effetti antinocicettivi degli antagonisti NMDA, spesso nei trials clinici sono stati raggiunti solo modesti effetti.

Inoltre il loro problema principale è attualmente rappresentato dalla scarsa tollerabilità verso le dosi necessarie per ridurre il dolore, dovuta in particolare alla comparsa di disturbi cognitivi, fenomeni dissociativi, sedazione, allucinazioni, deficit motori (Zhou et al., 2011) (Figura 6).

STUDI PRECLINICI					
		Modelli animali	Somministrazione	Risultati	Autori
Antagonisti NMDA non competitivi	Ketamina, Destrofan	CCI, ratto	Intratecale	Riduzione iperalgesia termica	Mao et al., 1993
	Memantina	CCI, ratto	Intraperitoneale		Eisenberg et al., 1995
	MK-801, Memantina, Ketamina	SNL, ratto	Somministrazione sistemica	Riduzione iperalgesia termica e meccanica	Suzuki et al., 2001
Antagonisti NMDA competitivi	D-AP5	SCI, ratto	Intratecale	Riduzione iperalgesia meccanica	Bennett et al., 2000
Antagonisti NMDA per il sito della glicina	L-701, 5,7-DCK	CCI, SNL, ratto	Intraperitoneale, intravenosa	Riduzione allodinia meccanica	Christoph et al., 2005

STUDI CLINICI					
		Patologia	Somministrazione	Risultati	Autori
Antagonisti NMDA non competitivi	Ketamina	Sindrome algodistrofica Studio fase II	Infusione intravenosa 7 mg/Kg/h	Riduzione del dolore (disabilità, qualità di vita)	Kiefer et al., 2008
Antagonisti NMDA per il sito della glicina	GV196771	Neuropatia diabetica, Nevralgia postoperatoria Studio fase II	Orale 300mg/die	Mancata riduzione del dolore (SF-MPQ)	Wallace et al., 2002

Figura 6: Alcuni esempi di studi preclinici e clinici sugli antagonisti dei recettori NMDA. CCI: Chronic Constriction Injury; SNL: Spinal Nerve Ligation; SCI: Spinal Cord Injury; SF-MPQ: short form of the McGill Pain Questionnaire.

Per quanto riguarda gli agonisti α_2 -adrenergici, è stato dimostrato che la somministrazione intratecale di clonidina è in grado di produrre un potente effetto analgesico nei confronti del dolore provocato da uno stimolo termico, mentre ha un effetto minore e di breve durata nel caso di uno stimolo dolorifico meccanico (Chen et al., 2007).

Inoltre gli agonisti α_2 si sono rivelati efficaci nell'alleviare l'allodinia tattile associata a dolore neuropatico cronico, con un meccanismo mediato dal coinvolgimento dei recettori nicotinici e muscarinici spinali (Pan et al., 1999).

La clonidina è risultata efficace, in seguito ad applicazione transdermica, anche in pazienti affetti da dolore correlato a neuropatia diabetica (Byas-Smith et al., 1995) e a neuropatia post-erpetica (Abadir et al., 1996); tuttavia la somministrazione sistemica per via orale, pur mostrando i noti effetti antipertensivi, non sembra avere efficacia sul dolore.

Recentemente è stata posta grande attenzione anche nei confronti della Palmitoiletanolamide (PEA), amide endogena dell'acido palmitico con l'etanolamina, appartenente alla famiglia delle N-acil-etanolamine (NAEs). Questa sostanza, le cui proprietà antinfiammatorie sono state evidenziate già dagli anni sessanta, sta attualmente dimostrando in svariati studi sia preclinici che clinici di essere efficace in diversi modelli di dolore, non solo acuto, ma anche neuropatico (Figura 7).

STUDI PRECLINICI			
Modelli animali	Somministrazione	Risultati	Autori
Edema da carragenina, ratto	Orale 10 mg/Kg	Riduzione iperalgesia meccanica e termica	Conti et al., 2002
Iniezione di NGF, ratto	Intraperitoneale 25 mg/Kg	Riduzione iperalgesia termica	Farquhar and Rice, 2003
PSNL, ratto	Intraperitoneale 100µg/Kg	Riduzione iperalgesia meccanica	Helyes et al., 2003

STUDI CLINICI			
Patologia	Somministrazione	Risultati	Autori
Dolore neuropatico diabetico o traumatico 30 pazienti	Orale 1200 mg/die	Riduzione intensità del dolore (VAS, NPSI)	Cocito et al., 2014
Nevralgia postherpetica 8 pazienti	Locale	Riduzione intensità del dolore (VAS)	Phan et al., 2010
Dolore cronico di diverse eziopatologie 610 pazienti	Orale 1200 mg/die	Riduzione intensità del dolore (NRS)	Gatti et al., 2012

Figura 7: Alcuni esempi di studi preclinici e clinici relativi alla Palmitoiletanolamide.

NGF: Nerve growth factor; PSNL: Partial Spinal Nerve Ligation.

VAS: Visual Analog Scale; NPSI: Neuropathic Pain Symptom Inventory; NRS: Numerical Rating Scale.

Analgesia e recettori muscarinici

Un approccio interessante è rappresentato dallo studio delle potenzialità analgesiche degli agonisti muscarinici. Infatti è noto da tempo il coinvolgimento di questi recettori nel mediare l'analgesia sia a livello periferico, che spinale e sovrastipale.

Già dagli anni sessanta sono stati descritti gli effetti analgesici dell'acetilcolina e di sostanze colinomimetiche ad azione diretta e indiretta. La somministrazione in topi e ratti di oxotremorina (OXO), un agonista muscarinico non selettivo in grado di oltrepassare la barriera ematoencefalica, è in grado di indurre un potente effetto analgesico, abolito dalla co-somministrazione di antagonisti muscarinici non selettivi, come atropina e scopolamina (George et al., 1962).

Grazie all'utilizzo di topi knock-out è stato possibile comprendere maggiormente il ruolo dei diversi sottotipi recettoriali muscarinici nel mediare l'analgesia.

In diversi modelli sperimentali di dolore acuto (come *Tail-flick* e *Hot plate test*) è stato osservato che l'effetto analgesico dopo somministrazione di oxotremorina è fortemente attenuato nei topi M₂ knockout, dimostrando che l'analgesia indotta da oxotremorina nei confronti di uno stimolo termico è mediata soprattutto dall'attivazione del sottotipo recettoriale M₂. Anche la mancanza del recettore M₄ porta ad una attenuazione dell'effetto analgesico, mentre la perdita di entrambi i recettori ne comporta il completo annullamento (Wess, 2003).

Il potenziale ruolo di agonisti muscarinici come analgesici non si applica solo a modelli di dolore acuto, ma anche per il dolore neuropatico: in un modello di neuropatia diabetica ottenuto in ratti con diabete indotto da streptozotocina è stato osservato inizialmente che la densità dei recettori muscarinici a livello del midollo spinale aumenta approssimativamente del 50%. Inoltre è stato riportato che la neostigmina, inibitore reversibile dell'acetilcolinesterasi (AChE), inibisce l'allodinia tattile in questi animali trattati con streptozotocina, suggerendo una possibile utilità terapeutica di composti colinomimetici nel diabete neuropatico (Chen and Pan, 2003).

Un recente studio ha inoltre dimostrato la presenza di mRNA per i recettori M₂ nei neuroni sensoriali del ganglio del trigemino e il loro coinvolgimento

nell'antinocicezione in modelli animali di dolore orofacciale dati dall'iniezione di formalina (Dussor et al., 2004).

Livello spinale

Stimoli nocicettivi aumentano i livelli di acetilcolina nel midollo spinale, come osservato dall'analisi del liquido cerebro spinale di pecore dopo induzione di dolore (Eisenach et al., 1996). L'acetilcolina è rilasciata da interneuroni colinergici delle corna dorsali, attivati dalle vie discendenti noradrenergiche e serotoninergiche, e svolge un'attività inibitoria sulla trasmissione dolorifica.

È stato dimostrato da studi di binding che a livello delle corna dorsali del midollo spinale sono presenti i sottotipi recettoriali muscarinici M_2 , M_3 , M_4 , (Mulugeta et al., 2003).

Studi effettuati utilizzando [35 S]GTP γ S, composto radioattivo capace di legare i recettori accoppiati alle proteine G attivate, hanno permesso di evidenziare che i recettori M_2 sono la sottopopolazione recettoriale maggiormente presente nel midollo spinale di topi, e che è presente anche una piccola ma significativa popolazione di recettori M_4 (Chen et al., 2005).

Il ruolo dei recettori M_4 nell'analgesia è stato confermato anche dall'analisi farmacologica condotta con due nuove molecole derivate chimicamente dall'epibatidina, siglate CMI 936 e CMI 1145, ad alta affinità sia per i recettori M_2 che per gli M_4 (Duttaroy et al., 2002; Ellis et al., 1999).

Nei topi doppiamente knockout entrambi i composti sono privi di attività analgesica, indipendentemente dalla via di applicazione, mentre in topi M_2 knockout sono in grado di mantenere una certa attività antinocicettiva.

Nel midollo spinale dei ratti l'attivazione dei recettori muscarinici modula l'attività dei neuroni GABAergici, glutamatergici e della glicina (Figura 8); in particolare i recettori M_2 , espressi sui neuroni afferenti primari, giocano un ruolo importante nell'inibire il rilascio di glutammato, ma anche i sottotipi M_3 ed M_4 , localizzati su una popolazione di interneuroni glutamatergici, possono contribuire all'effetto inibitorio. I sottotipi M_2 , M_3 ed M_4 sono tutti coinvolti nel potenziare la trasmissione GABAergica e glicinergica: l'attivazione dei 3 sottotipi recettoriali muscarinici su interneuroni che rilasciano GABA e glicina ne potenzia l'effetto

inibitorio sul neurone post-sinaptico; infine il rilascio di GABA dagli interneuroni GABAergici può anche inibire il rilascio sia del glutammato che della glicina mediante recettori presinaptici GABA_B (Pan et al., 2008).

Nel midollo spinale dei topi, al contrario, i recettori M₂, M₃, M₄ modulano la trasmissione GABAergica attraverso recettori presinaptici: i sottotipi M₂ e M₄ attenuano l'input inibitorio del GABA e della glicina verso i neuroni delle corna dorsali, mentre il recettore M₃ facilita il rilascio di GABA e glicina (Pan et al., 2008).

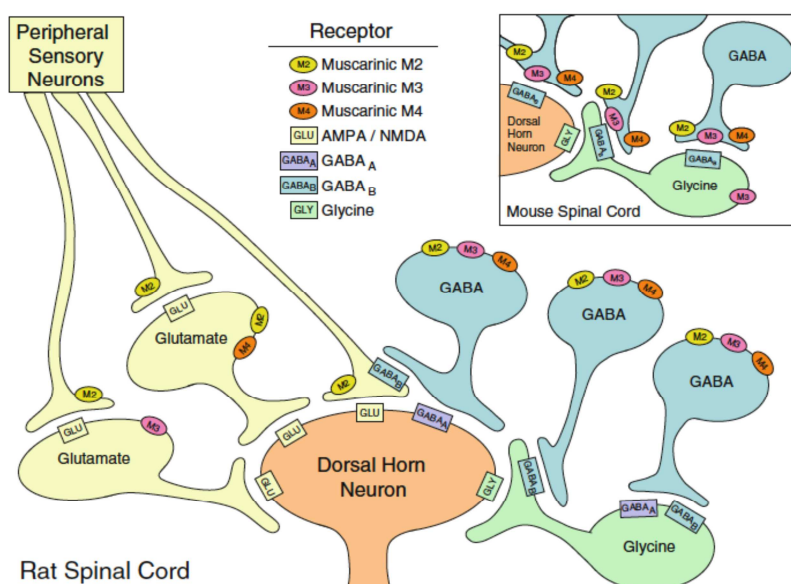


Figura 8: Modulazione della trasmissione nocicettiva a livello delle corna dorsali del midollo spinale di ratto e di topo (riquadro in alto a destra) (Fiorino and Garcia-Guzman, 2012).

Queste differenze tra specie nella localizzazione dei recettori muscarinici spinali e nella modulazione del rilascio di GABA e glicina, potrebbero suggerire effetti analgesici diversi tra le specie, ma in realtà l'attivazione dei sottotipi recettoriali M₂ e M₄ determina un efficace effetto analgesico sia in topi che in ratti.

Questo suggerisce l'esistenza di altri meccanismi, oltre alla modulazione degli impulsi eccitatori glutamatergici e degli impulsi inibitori GABAergici e

glicinergici, alla base dell'attività antinocicettiva degli agonisti muscarinici (Fiorino and Garcia-Guzman, 2012).

Livello sovrasspinale

Studi sperimentali hanno dimostrato che il sistema colinergico regola la risposta al dolore anche a livello sovrasspinale.

La somministrazione sovrasspinale di agonisti muscarinici evidenzia un coinvolgimento nell'attività analgesica di diverse aree cerebrali, come ad esempio l'ipotalamo (Franco and Prado, 1996), la sostanza grigia periacqueduttale (PAG) (Guimarães et al., 2000) e l'amigdala (Oliveira and Prado, 1994).

In un modello sperimentale di nocicezione acuta dovuta a stimolo nocivo di natura termica, il *Tail-flick test*, è stato osservato che dopo somministrazione di carbacholo, agonista muscarinico, nella sostanza grigia periacqueduttale (PAG) si verificava un effetto antinocicettivo, prolungando la latenza nel *Tail-flick* e innalzando la soglia dolorifica alla quale si produce una vocalizzazione (Guimarães et al., 2000).

Altre evidenze di meccanismi muscarinici sovrasspinali dell'analgesia provengono dall'utilizzo di oligonucleotidi contro il recettore M_1 , o contro la subunità delle proteine G del tipo G_q/G_{11} accoppiate a tali recettori (Galeotti et al., 2003, Ghelardini et al., 2000).

L'iniezione intracerebroventricolare di nucleotidi antisenso contro il recettore o le proteine G previene l'effetto antinocicettivo evocato dalla somministrazione sottocutanea sia dell'anticolinesterasico fisostigmina che dell'oxotremorina (Galeotti et al., 2005).

Inoltre l'iniezione intracerebroventricolare di agonisti M_1 , come il McN-A-343, produce effetti analgesici nell'*Hot plate test* e nel *Writhing test* (Bartolini et al., 1992); l'effetto viene abolito dalla contemporanea somministrazione di atropina e pirenzepina (antagonista M_1 selettivo), mentre somministrando un antagonista M_2 permane l'attività analgesica; questo risultato suggerisce che l'attivazione sovrasspinale M_1 è sufficiente per ottenere un effetto analgesico nel topo.

Il fatto che gli effetti degli agonisti M_1 non vengano alterati dalla somministrazione di un bloccante della ricaptazione della colina (emicolinio-3), indica anche che gli effetti analgesici sono mediati dai recettori M_1 postsinaptici (Bartolini et al., 1992).

Altri dati sperimentali suggeriscono un ruolo non solo dei recettori M_1 , ma anche M_2 e M_4 nella modulazione del dolore a livello sovraspinale.

Nel SNC i recettori M_2 sono localizzati principalmente a livello presinaptico e si comportano da autorecettori, cioè inibiscono il rilascio di acetilcolina. Somministrando i.c.v. un antagonista selettivo M_2 , l'AFDX-116, si ottiene analgesia come conseguenza dell'aumento della concentrazione di acetilcolina e questo effetto non è accompagnato dalla comparsa dei tipici effetti collaterali dovuti ad un'eccessiva stimolazione periferica del sistema colinergico.

L'effetto è abolito sia dalla co-somministrazione di antagonisti muscarinici (atropina o pirenzepina) sia dall'emicolinio.

Questo mette in luce come il meccanismo analgesico di un antagonista M_2 si espliciti a livello presinaptico (Bartolini et al., 1992).

Livello periferico

Il ruolo dei recettori muscarinici periferici nella modulazione del dolore è stato dimostrato da diversi studi elettrofisiologici e neurochimici.

In particolare in uno studio di Bernardini e colleghi (2001), su preparati della porzione cutanea del nervo femorale sottoposto a stimoli di natura termica e meccanica, sono stati applicati agonisti e antagonisti muscarinici per indagare il ruolo delle afferenze nocicettive periferiche.

È stato osservato che la muscarina era in grado di produrre una profonda desensibilizzazione di tutti i tipi di fibre nocicettive; lo stesso effetto si otteneva somministrando al preparato l'agonista M_2 selettivo, arecaidina. Al contrario la co-somministrazione di scopolamina o gallamina, antagonista M_2 selettivo, impediva l'instaurarsi dell'effetto analgesico. Anche l'utilizzo di modelli knockout ha permesso di confermare come l'effetto analgesico fosse dovuto ai recettori M_2 : la muscarina manteneva l'effetto analgesico nei topi wild-type e M_4 knockout, mentre non era più in grado di attenuare il dolore nei topi M_2 knockout confermando il loro ruolo principale (Bernardini et al., 2002).

Più recentemente il ruolo dei recettori M_2 nella nocicezione è stato indagato anche a livello del trigemino (Dussor et al., 2004). Anche in questo modello è stato dimostrato come l'arecaidina, agonista M_2 preferenziale, fosse in grado di annullare il dolore oro-facciale indotto dalla somministrazione periorale di formalina, ma solamente quando co-somministrata, e non se l'applicazione avveniva in un sito distale rispetto all'iniezione di formalina. Questo dato suggerisce che la stimolazione dei recettori M_2 periferici è sufficiente per avere effetti antinocicettivi in questa forma di dolore.

Agonisti muscarinici in terapia

Come detto in precedenza, la problematica dell'utilizzo di agonisti muscarinici in terapia risiede nella difficoltà di disporre di molecole che abbiano una buona capacità di discriminazione tra i diversi recettori muscarinici, data la loro elevata omologia. Questo determina la comparsa di effetti avversi dovuti alla stimolazione dei differenti sottotipi recettoriali. Ad esempio l'attivazione dei recettori M_3 periferici comporta la comparsa di manifestazioni indesiderate a livello di ghiandole esocrine, con aumento delle secrezioni oculari, salivari e gastriche, così come a livello di muscolatura liscia, con aumentata motilità intestinale e costrizione bronchiale. L'iperproduzione di muco da parte delle ghiandole poste nelle prime vie aeree può sovrapporsi alla costrizione della muscolatura liscia bronchiale, provocando quindi difficoltà respiratorie. L'attivazione M_3 dell'endotelio vasale può causare effetti ipotensivi.

Anche la stimolazione M_2 può avere ripercussioni negative a livello cardiovascolare, che devono pertanto essere indagate per assicurare un buon profilo di tollerabilità.

Infine anche l'attivazione dei recettori muscarinici centrali non è da sottovalutare. Questi sono infatti ampiamente distribuiti in svariate aree del SNC, sia a livello postsinaptico che presinaptico. Ad esempio i recettori presinaptici M_2 nel SNC modulano negativamente il rilascio di numerosi neurotrasmettitori; di conseguenza la stimolazione non desiderata o indiscriminata dei diversi sottotipi recettoriali muscarinici può comportare importanti interferenze nella trasmissione nervosa centrale.

Lo studio di molecole bitopiche potrebbe quindi essere un approccio innovativo e interessante per lo sviluppo di agenti dotati di attività analgesica ma accompagnati da una ridotta incidenza di effetti avversi.

OBIETTIVO DELLA RICERCA

I ligandi dualsterici rappresentano una modalità innovativa di interazione recettoriale. Sono molecole che vengono progettate per essere in grado di legare simultaneamente due diversi siti di legame, che possono essere situati su bersagli diversi o essere siti orto- e allosterici situati sullo stesso recettore. Questo filone di ricerca potrebbe portare a ottenere composti dotati di una maggiore potenza, diminuendo l'insorgenza di effetti indesiderati, in quanto sarebbero necessarie concentrazioni inferiori rispetto a quelle delle singole molecole, o dotati di maggiore capacità di discriminazione tra diversi sottotipi recettoriali, consentendo anche in questo caso di avere effetti terapeutici accompagnati da ridotti effetti indesiderati.

In letteratura sono attualmente presenti pochi casi di ligandi bitopici in grado di interagire contemporaneamente con diversi siti di legame collocati sullo stesso recettore. Un esempio è la recente sintesi di due nuovi ligandi TBPB e 77-LH-28-1, dotati di un meccanismo di azione bitopico nei confronti del sottotipo recettoriale muscarinico M₁ (Keov et al., 2014), che rappresenta un tentativo di ottenere molecole in grado di esercitare effetti mirati nella terapia dei disordini cognitivi, senza la comparsa di effetti indesiderati dovuti all'attivazione contemporanea di più sottotipi recettoriali.

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è la caratterizzazione funzionale, *in vitro* ed *in vivo*, del profilo farmacologico di nuovi derivati sviluppati come potenziali ligandi muscarinici presso il Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Pietro Pratesi dell'Università degli Studi di Milano.

Per ottenere i composti in studio si è partiti dalla struttura dell'Oxotremorina-M, modulandola per arrivare al potente agonista muscarinico ortosterico non selettivo **Iperoxo** (Dallanoce et al. 1999; Barocelli et al., 2000).

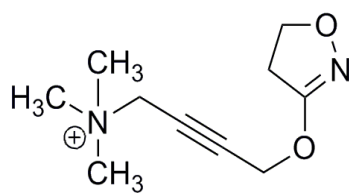
Dalla fusione di questo composto con la porzione ftalimmido- o 1,8 naftalimmido-2,2-dimetilpropilica rispettivamente dei modulatori allosterici negativi **W84** (Tränkle et al., 1998; Disingrini et al., 2006) e **Nafmetonio** (Muth et al., 2005) deriva il primo gruppo di composti bis-ammonioalcanici in esame.

I diversi ibridi si differenziano per il progressivo allungamento da sei a dieci atomi di carbonio della catena metilenica che collega il nucleo ftalimido-propanico del **W84** o l'anello 1,8-naftalimmido-2,2-dimetilpropanico del **Nafmetonio** con l'anello isossazolico del composto **Iperoxo**.

I composti **9a** e **9b** sono invece derivati rispettivamente del **W84** e del **Nafmetonio** con catena spaziatrice a 6 metileni, in cui si ha l'incorporazione del gruppo ammonico quaternario prossimo al nucleo policiclico in un anello piperidinico (Figure 9 e 10).

Il secondo gruppo di composti sintetizzati deriva invece dall'incorporazione di un diverso derivato dell'Oxotremorina-M, il composto **ISOX**, nella struttura del modulatore allosterico **W84**.

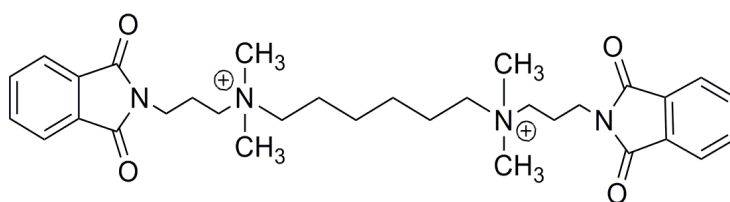
I tre derivati bis-ammonio alcanici, **P4-ISOX**, **P6-ISOX** e **P8-ISOX**, sono caratterizzati da un progressivo allungamento, rispettivamente di 4, 6 e 8 atomi di carbonio, dello spaziatore metilenico che collega il nucleo ftalimido-propanico del **W84** con l'anello isossazolico del composto **ISOX** (Figura 11).



IPEROXO

3

+



W84

4



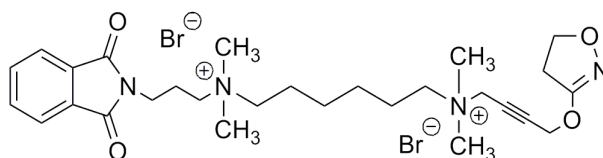
6a: n=6

7a: n=7

8a: n=8

P-9-IPER: n=9

P-10-IPER: n=10



9a: n=6

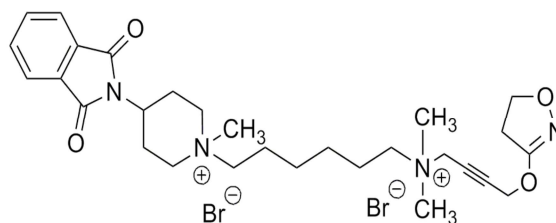
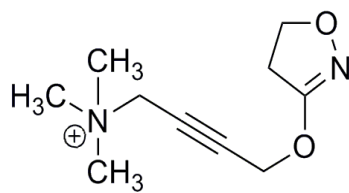


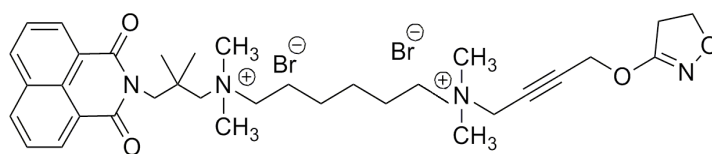
Figura 9: Ibridi derivati dalla fusione del composto 3 Iperoxo con il composto 4 W84 (serie 6a-9a pubblicati in Matera et al., 2014).



IPEROXO

3

+



Nafmetonio

5



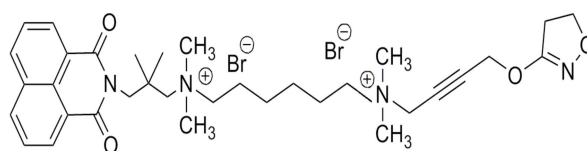
6b: n=6

7b: n=7

8b: n=8

N-9-IPER: n=9

N-10-IPER: n=10



9b: n=6

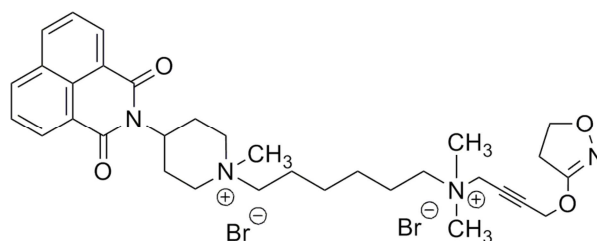


Figura 10: Ibridi derivati dalla fusione del composto 3 Iperoxo con il composto 5 Nafmetonio (serie 6b-9b pubblicati in Matera et al., 2014).

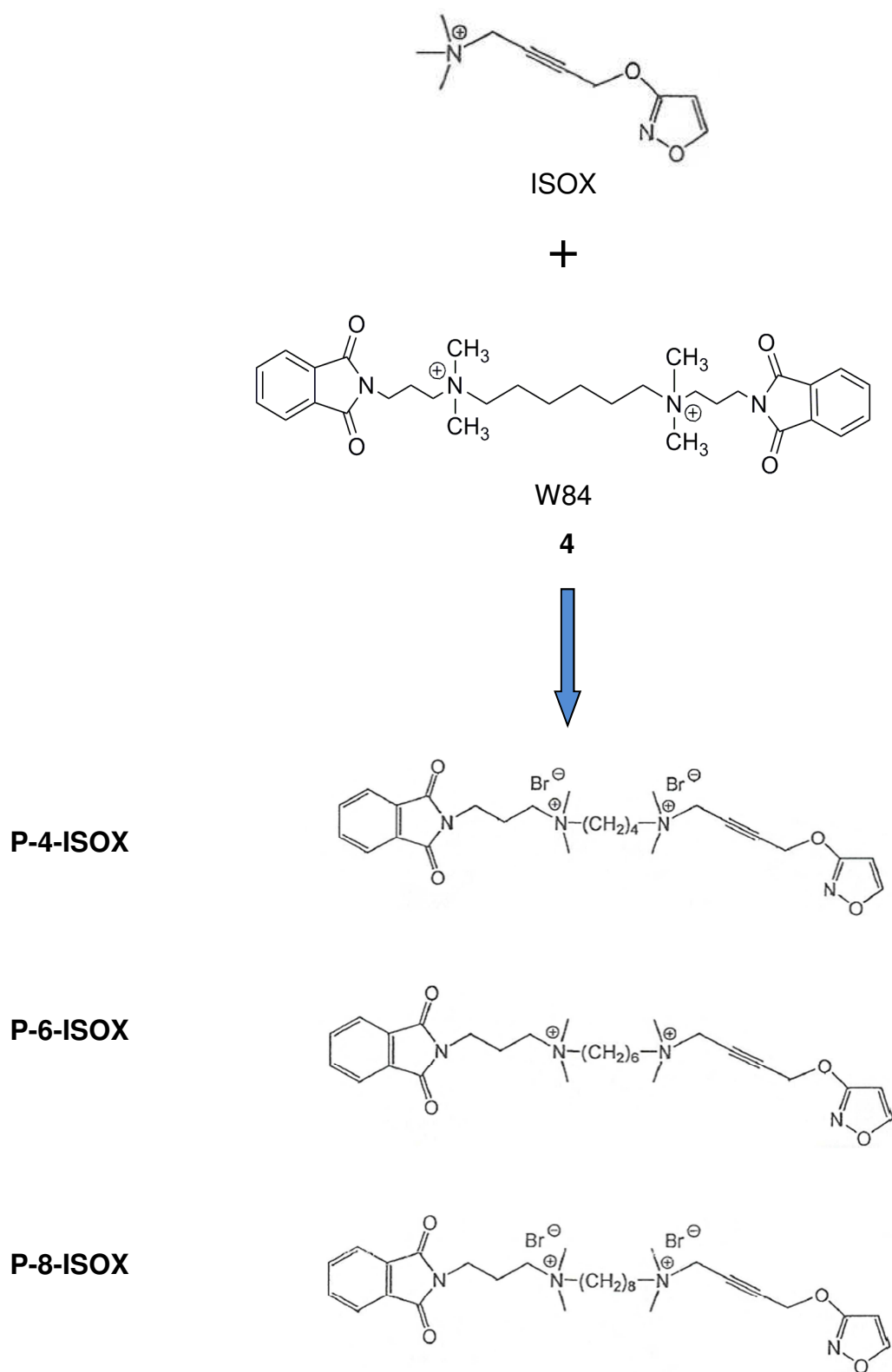


Figura 11: Ibridi derivati dalla fusione del composto ISOX con il composto 4 W84.

1. CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA IN VITRO

Per caratterizzare farmacologicamente *in vitro* questi composti si è valutata la potenza agonista, l'attività intrinseca e, nel caso di composti privi di efficacia, la potenza antagonista degli ibridi in esame e dei relativi progenitori allosterici verso i sottotipi recettoriali muscarinici M_1 , M_2 e M_3 . Questi parametri sono stati determinati funzionalmente in opportuni modelli sperimentali *in vitro* costituiti da tessuti isolati quali i vasi deferenti di coniglio, atrio cardiaco sinistro di cavia stimolato elettricamente e ileo terminale di cavia stimolato farmacologicamente. Inoltre, considerando che molecole con struttura bisammonica quaternaria possono esplicare attività anticolinesterasica (Hallek and Szinicz, 1988), è stato valutato anche l'eventuale effetto inibitorio sulle colinesterasi cerebrali di ratto tramite saggio colorimetrico di Ellman.

2. CARATTERIZZAZIONE FARMACOLOGICA IN VIVO

Il coinvolgimento dei recettori muscarinici nel modulare la percezione dolorifica è provato da tempo; la difficoltà dell'utilizzo clinico di agonisti muscarinici risiede nella scarsa capacità di discriminazione tra i diversi sottotipi recettoriali, dovuta al fatto che il sito recettoriale di legame per il mediatore endogeno è altamente conservato. Esiste però nelle vicinanze del sito ortosterico anche un sito di legame allosterico, caratterizzato da una sequenza amminoacidica meno ripetuta. La vicinanza tra questi due diversi siti consente di progettare molecole bitopiche, in grado di interagire contemporaneamente con entrambi, con l'obiettivo di avere composti dotati di una maggiore capacità di discriminare i diversi sottotipi recettoriali.

I composti in studio sono stati sintetizzati come potenziali agonisti muscarinici M_2 preferenziali, al fine di unire una buona attività analgesica con una ridotta incidenza di effetti indesiderati ad esempio M_3 mediati.

La ricerca di nuove molecole in grado di modulare la percezione dolorifica con un meccanismo innovativo è un'importante strategia per ovviare ai tipici effetti indesiderati che accompagnano l'utilizzo dei classici farmaci in terapia, come i

FANS (ulcere gastriche) o gli analgesici oppioidi (sedazione, depressione respiratoria, dipendenza), che rimangono attualmente i più efficaci ed utilizzati antidolorifici.

I composti sono quindi stati testati in vivo per caratterizzarne l'attività farmacologica.

Per valutare l'attività antinocicettiva dei composti in studio sono stati effettuati due diversi test, il *Writhing test*, in cui lo stimolo nocivo è di tipo chimico e rappresentato dall'iniezione di un agente algogeno, e l'*Hot plate test*, modello di algesia di natura termica.

Per evidenziare un'eventuale azione sedativa dei composti, in grado di alterare la valutazione dell'attività analgesica, è stato condotto l'*Open field test*, che consente di monitorare l'attività locomotoria spontanea degli animali trattati.

Tramite l'uso di antagonisti specifici nel *Writhing test* è stato inoltre indagato il meccanismo d'azione di alcuni composti in studio, cercando di definire i recettori coinvolti nel mediare analgesia.

E' stata poi monitorata la comparsa di effetti indesiderati associabili alla stimolazione di recettori muscarinici periferici (diarrea, salivazione e lacrimazione) e centrali (tremori). Si è inoltre monitorata la temperatura corporea per valutare l'eventuale comparsa di ipotermia, come osservato in seguito alla somministrazione di agonisti muscarinici (Barocelli et al., 2001).

MATERIALI E METODI

Gli esperimenti sono stati eseguiti secondo protocolli di ricerca approvati dal Ministero della Salute nel rispetto della norma che regola la sperimentazione sugli animali da laboratorio (D.LGS 26/2014) e in accordo con le linee guida dei comitati etici locali per la ricerca sugli animali.

Per questa sperimentazione sono stati impiegati conigli maschi albini del peso di 3-3.5 Kg, cavie albine di sesso maschile del peso di 250-300 g, topi maschi di ceppo Swiss di 20-35 g, ratti femmina di ceppo Wistar di 200-250 g.

Gli esperimenti sono stati condotti dalle 9 a.m. alle 15 a.m. utilizzando animali tenuti a digiuno per 12 ore prima della sperimentazione ma con libero accesso all'acqua.

I composti sperimentali, sciolti in soluzione fisiologica (NaCl 0.9%), sono stati somministrati in un volume di 0.1ml/50g di peso corporeo per via sottocutanea.

Studi funzionali in vitro

Vasi deferenti di coniglio (M_1)

La porzione prostatica dei vasi deferenti (1.5 cm) è stata isolata, montata in un bagno per organi isolati da 10ml, contenente soluzione Krebs modificata (composizione mM: NaCl 134, KCl 3.4, CaCl_2 2.8, KH_2PO_4 1.3, NaHCO_3 16, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6, Glucosio 7.7 e yohimbina 0.001) e sottoposta ad una tensione a riposo di 0.75g. La soluzione nutritizia è stata termostata a 31°C e continuamente areata con una miscela gassosa (O_2 95%, CO_2 5%). La contrazione dei vasi è stata indotta elettricamente mediante impulsi elettrici singoli (0.05Hz, 0.5msec., 450mA), prodotti da uno stimolatore (mod. ES-3 LACE Elettronica, Ospedaletto, PI, Italia) e inviati al tessuto da un sistema di elettrodi di platino coassiali inseriti nel bagno (Barocelli et al., 2000).

Atrio sinistro di cavia (M_2)

L'atrio sinistro è stato isolato e montato verticalmente in un bagno per organi isolati da 20ml, contenente una soluzione Krebs modificata (composizione mM: NaCl 118.9, KCl 4.6, CaCl_2 2.5, KH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 25, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2, Glucosio 11.1) e sottoposto ad una tensione a riposo di 0.5g. La soluzione nutritizia è stata termostata a 32°C e continuamente areata con una miscela gassosa (O_2 95%, CO_2 5%). L'attività contrattile ritmica del tessuto cardiaco, collegato ad un trasduttore isometrico, è stata evocata e mantenuta per ore, ponendo l'atrio sinistro tra due elettrodi coassiali di platino collegati ad uno stimolatore elettrico (mod. ES-3 LACE Elettronica, Ospedaletto, PI, Italia) che inviava impulsi della durata di 5msec, con la frequenza di 2Hz e potenziale di 5V (Barocelli et al., 2000).

Ileo terminale di cavia (M_3)

Segmenti (2-3 cm) della porzione terminale dell'ileo di cavia sono stati sospesi in bagni termostatati alla temperatura di 37°C, contenenti 10 ml di soluzione Krebs-Henseleit (composizione mM: NaCl 118.9, KCl 4.6, CaCl_2 2.5, KH_2PO_4 1.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12, NaHSO_4 2.5 Glucosio 11.1), ossigenata con una miscela gassosa costituita da O_2 95% e CO_2 5% e sottoposto alla tensione di 1g.

La contrazione dei tessuti è prodotta in seguito all'aggiunta nei bagni di concentrazioni note di agenti farmacologici di riferimento e dei diversi composti in studio (Barocelli et al., 2000).

La risposta contrattile, elettricamente o farmacologicamente indotta, di ogni tessuto, è stata misurata come variazione della tensione sviluppata dal tessuto e registrata da un trasduttore isometrico amplificato e collegato ad un registratore a penna (Gemini, Basile, Comerio, VA).

Protocollo sperimentale

Dopo circa 45 minuti di stabilizzazione dei preparati, durante i quali la soluzione nutritizia è stata rinnovata periodicamente ad intervalli regolari di 15 minuti, curve concentrazione-risposta dei vari composti in studio sono state ottenute tramite applicazione cumulativa di concentrazioni crescenti di ogni singolo composto (van Rossum and van den Brink, 1963). Le varie sostanze sono state addizionate direttamente al bagno con una microsiringa usando incrementi di concentrazione di 0.5 unità logaritmiche.

Le conseguenti variazioni nell'ampiezza delle contrazioni indotte elettricamente nel tessuto atriale o nei vasi deferenti e della risposta contrattile nel tessuto ileale di cavia sono state registrate isometricamente come cambiamenti della tensione sviluppata dal tessuto. Le curve sono state confrontate con quelle prodotte dalla applicazione di agonisti di riferimento, betanecolo o McN-A-343.

Le diverse concentrazioni sono state applicate solo dopo il raggiungimento dell'equilibrio della risposta precedente. I composti che si sono rivelati privi di attività agonista sono stati studiati come potenziali agenti antimuscarinici: a tale scopo sono state confrontate le curve concentrazione-risposta dell'agonista di riferimento betanecolo/McN-A-343 ottenute in assenza ed in presenza di diverse concentrazioni (10^{-6} - 10^{-5} M) di tali derivati mantenuti per 10 minuti (ileo) o 30 minuti (atrio sinistro, vaso deferente) a contatto con il tessuto.

Determinazione dell'attività anticolinesterasica

Preparazione dell'omogenato cerebrale

Dopo il sacrificio di ratti per inalazione di anidride carbonica è stata praticata una perfusione endocardiaca con circa 60 ml di tampone fosfato 0.1 M pH 7.4, raffreddato in ghiaccio, al fine di allontanare il sangue dal comparto vascolare delle regioni del tronco superiore e del cervello. A questo punto il cervello è stato rapidamente prelevato e, dopo eliminazione del cervelletto, pesato ed omogeneizzato meccanicamente in 9 volumi di PBS 0.1 M a pH 7.4 alla temperatura di 4°C per mezzo di un omogeneizzatore Potter-Elvehjem. L'omogenato così ottenuto, previamente diluito in 5 parti di PBS a pH 7.4, è stato utilizzato come sorgente di colinesterasi cerebrale e impiegato per il dosaggio spettrofotometrico di Ellman (Ellman et al., 1961).

Protocollo sperimentale

L'attività colinesterasica totale dei campioni di tessuto cerebrale è stata misurata utilizzando acetiltiocolina come substrato. Applicando tale metodica, 100µl di omogenato cerebrale, ottenuti mediante la procedura già descritta, e 20µl di acetiltiocolina ioduro 0.075 M sono stati addizionati ad una miscela di reazione costituita da 5.77 ml di tampone fosfato PBS 0.1 M a pH 8, 50 µl di acido ditionitrobenzoico 0,005 M e 60 µl del composto in esame o del veicolo. Dopo un periodo di incubazione di 15 minuti a 37 °C in bagno termostato, la reazione è stata bloccata mediante aggiunta alla miscela di 500 µl di formalina al 4%. Da ciascun campione, sottoposto a centrifugazione a 2000 giri/min per 5 minuti a temperatura ambiente, è stato prelevato 1 ml di surnatante di cui è stata determinata spettrofotometricamente l'assorbanza a 412 nm.

Studi in vivo

Determinazione dell'attività analgesica nel topo

Writhing test

Il test è stato eseguito su topi assegnati in modo randomizzato ai differenti gruppi sperimentali costituiti ciascuno da almeno 8 animali. Il test consente di valutare l'attività antinocicettiva nei confronti di un dolore infiammatorio viscerale (Koster et al., 1959). Dopo 30 minuti dalla somministrazione per via sottocutanea di differenti dosaggi dei composti in esame o del solo veicolo, i topi sono stati trattati per via intraperitoneale con l'agente algogeno, rappresentato da acido acetico 0.6% (1ml/100g peso corporeo).

Inoltre, per caratterizzare l'attività analgesica dei composti **8b** e **P-6-ISOX**, il test è stato effettuato anche dopo somministrazione per via sottocutanea di antagonisti selettivi nei confronti di diversi recettori, utilizzando: l'antagonista nicotico mecamilamina (1mg/kg), l'antagonista α_2 -adrenergico yohimbina (1mg/kg), l'antagonista μ oppioide naloxone (1mg/kg) o gli antagonisti muscarinici atropina (5mg/kg) e metilatropina (5 mg/kg). Dopo 15 minuti dalla somministrazione degli antagonisti è stato somministrato il composto in esame e, dopo altri 30 minuti, l'agente algogeno.

I topi trattati sono stati quindi collocati in apposite camere di osservazione per valutare il numero di "writhes", ovvero la comparsa del tipico comportamento di stiramento ed estensione simultanea di addome e di almeno una zampa posteriore, eseguiti da ciascun topolino ogni 5 minuti nella mezz'ora successiva all'iniezione dell'agente algogeno.

Hot plate test

Il test consente di valutare l'attività analgesica dei composti nei confronti di uno stimolo nocicettivo di natura termica. Nell'esperimento l'animale viene collocato su di una piastra calda termostata, la cui temperatura è mantenuta a 52°C.

Il parametro valutato è il tempo di reazione, cioè il tempo impiegato dagli animali per manifestare una reazione allo stimolo termico. La percezione dello stimolo doloroso è rappresentata dal tentativo di sottrarre la zampa dalla fonte di calore, leccandola o saltando (Eddy and Leimbach, 1953).

Il tempo massimo di permanenza sulla piastra è in ogni caso di 30 secondi (cut-off time) per evitare danni ai tessuti delle zampe. Per limitare la variabilità del test, prima della somministrazione dei composti in studio, sono stati selezionati per la sperimentazione solo gli animali che rispondevano allo stimolo termico nell'arco di tempo compreso tra i 5 e i 15 secondi.

L'andamento temporale dell'analgesia è stato seguito effettuando la misurazione prima e 15, 30, 60, 90 e 120 minuti dopo la somministrazione sottocutanea dei composti in studio o del veicolo.

Il prolungamento del tempo di latenza si valuta confrontando i valori dei topolini trattati con i composti in esame rispetto a quelli del gruppo controllo.

Dai dati registrati è stato ricavato il parametro MPE (Massimo Effetto Possibile).

Determinazione dell'attività locomotoria nel topo

Open field test

L'*Open field test* è un modello sperimentale utilizzato per valutare l'attività locomotoria spontanea manifestata dai topolini quando posti in un nuovo ambiente, indice dell'eventuale eccitazione o sedazione. Gli animali vengono singolarmente posti all'interno di un'arena quadrata suddivisa in quattro compartimenti circondati da pareti divisorie (altezza 40 cm, lunghezza 45 cm, larghezza 45 cm). Il movimento degli animali viene videoregistrato per un periodo totale di un'ora.

Durante questo periodo di osservazione, tramite l'ausilio di un apposito software (Any-maze, Ugo Basile, Comerio (VA), Italia), vengono misurati il cammino percorso espresso in metri e il tempo di immobilità dell'animale espresso in minuti. Mezz'ora prima dell'inizio dell'esperimento i composti in esame, oppure il solo veicolo, sono stati somministrati per via sottocutanea alla dose in grado di generare un grado significativo di analgesia.

Effetti sistemici nel topo

La presenza o l'assenza di particolari risposte sistemiche tipicamente colinergiche e indesiderate come diarrea, lacrimazione o scialorrea sono state registrate per un'ora nei topolini trattati per via s.c. con i composti in studio da parte di un osservatore non a conoscenza del trattamento.

A temperatura ambiente è stato utilizzato un sensore rettale di temperatura con lo scopo di misurare la loro temperatura interna immediatamente prima e dopo 30 minuti dalla somministrazione sottocutanea dei composti in esame e del veicolo: l'effetto ipotermizzante è stato registrato come presente nel caso di un abbassamento della temperatura corporea pari o superiore a 2°C.

Effetti sistemici nel ratto anestetizzato

Protocollo sperimentale

Gli animali sono stati anestetizzati con Uretano dietilico (1.25g/kg, i.p.).

Per tutta la durata dell'esperimento, la temperatura corporea dell'animale è stata mantenuta costante a 37°C grazie all'impiego di una lampada riscaldante.

Per agevolare la respirazione è stata praticata tracheotomia.

L'arteria carotide è stata isolata ed incannulata con un tubicino di polietilene (PE50) collegato ad un trasduttore di pressione (TDS104A Biopac Systems, 2Biological Instruments, Besozzo VA, Italia) contenente soluzione fisiologica eparinizzata (100U/ml) per evitare la formazione di coaguli nel sistema.

Il composto **8b** è stato somministrato per via s.c. alle dosi di 0.01-0.05-0.1-0.5 mg/Kg. L'animale, al termine dell'esperimento, è stato sacrificato per inalazione di anidride carbonica.

Cardiocircolo

I parametri cardiocircolatori (pressione arteriosa espressa in mmHg e frequenza cardiaca espressa in battiti/min) sono stati rilevati dal sistema Power Lab Chart v4.1 (PowerLab/4SP ADI Instruments, Ugo Basile, Comerio, VA, Italia) collegato al trasduttore di pressione (TDS104A Biopac System, 2Biological Instruments, Besozzo (VA), Italia) per tutta la durata dell'esperimento, prima e per un'ora dopo la somministrazione del composto in studio.

La somministrazione di un ugual volume di soluzione fisiologica è stata effettuata come controllo.

Analisi dei dati

Studi funzionali in vitro

La *potenza* degli agonisti è stata espressa come pEC_{50} ($-\text{Log } EC_{50}$), calcolata mediante analisi di regressione lineare con il metodo dei minimi quadrati; l'*attività intrinseca* (α) è stata calcolata come la frazione della massima risposta ottenuta rispetto a quella dell'agonista pieno betanecolo o McN-A-343.

In assenza di attività intrinseca, è stata determinata la potenza antagonista degli stessi composti espressa come pK_B , calcolata secondo il metodo di Furchgott. Tutti i dati sono espressi come $\text{media} \pm \text{SEM}$.

Determinazione dell'attività anticolinesterasica

In merito alla determinazione dell'attività anticolinesterasica, per ogni concentrazione dei composti in studio è stata calcolata la percentuale di inibizione dell'attività colinesterasica come segue:

$$[(\text{Abs controllo} - \text{Abs campione}) / \text{Abs controllo}] \times 100$$

Abs = Assorbanza del campione a 412 nm

La potenza inibitoria è stata espressa come pIC_{50} (logaritmo negativo della concentrazione del composto in grado di inibire del 50% l'attività dell'enzima) e come E_{max} (entità massima dell'effetto inibitorio dell'attività colinesterasica) ed è stata confrontata con quella dell'anticolinesterasico di riferimento Tacrina.

Determinazione dell'attività analgesica

Writhing test

Nel *Writhing test* si è confrontato il numero di stiramenti effettuati tra il 6° e 10° minuto successivi all'applicazione dell'agente infiammatorio (momento in cui si manifesta la massima attività algogena dell'acido acetico) dagli animali trattati rispetto al gruppo controllo, ricevente il solo veicolo.

È stata quindi stimata la percentuale di analgesia, calcolata secondo la formula:
% Analgesia= $100 - (n^{\circ} \text{ stiramenti gruppo trattato} \times 100) / (n^{\circ} \text{ stiramenti gruppo controllo})$.

Tutti i dati sono stati espressi come media $\pm$ SEM e analizzati dal punto di vista statistico. È stata effettuata un'analisi One Way ANOVA seguita dal Dunnett's Post Test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ sono considerati rispettivamente significativi, molto significativi e altamente significativi).

Hot plate test

I risultati, registrati ai vari tempi dalla somministrazione dei composti, sono stati ottenuti come tempo di latenza, cioè il tempo espresso in secondi impiegato dall'animale per rispondere allo stimolo dolorifico.

L'effetto antinocicettivo è stato espresso come percentuale del Massimo Effetto Possibile (MPE) = $100 \times [(\text{latenza trattato} - \text{latenza basale}) / (30 - \text{latenza basale})]$.
Tutti i dati sono stati espressi come media $\pm$ SEM e analizzati dal punto di vista statistico tramite Two Way ANOVA, seguita dal Bonferroni post test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, sono considerati rispettivamente significativi e molto significativi).

Determinazione dell'attività locomotoria

Open-field test

Nell'*Open-field test* sono stati valutati il cammino percorso, espresso in metri, e il tempo di immobilità, espresso in minuti, di ciascun animale trattato e i valori ottenuti sono stati confrontati con quelli dei topolini controllo. Tutti i dati sono stati espressi come media $\pm$ errore standard ed analizzati tramite One Way ANOVA seguita dal Dunnett's Post Test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ sono considerati rispettivamente significativi, molto significativi e altamente significativi).

Effetti sistemici nel ratto anestetizzato

Cardiocircolo

I dati relativi ai parametri cardiovascolari sono stati espressi come variazione della frequenza cardiaca (battiti al minuto) e variazione della pressione sanguigna media (mmHg), sottraendo il valore basale a ciascun valore massimo valutato ogni 5 minuti dopo la somministrazione del composto **8b**.

I dati sono stati analizzati applicando un'analisi della varianza a due vie seguita da Bonferroni post test, considerando come significativo il valore di $P < 0.05$ e molto significativo il valore di $P < 0.01$.

Sostanze

Tutti i derivati bisammonioalcanici in studio sono stati sintetizzati presso i laboratori diretti dal Prof. De Amici del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche Pietro Pratesi dell'Università degli Studi di Milano.

Acido acetico, mecamilamina, naloxone, metilatropina, atropina, tacrina sono stati acquistati dalla ditta Sigma Aldrich (Italia); Oxotremorina ed Oxotremorina-M sono stati acquistati presso la ditta RBI (Research Biochemical Inc, Natick, MA). Tutti i composti utilizzati sono stati disciolti in soluzione fisiologica.

RISULTATI

Caratterizzazione funzionale in vitro

Derivati Del W84 e del Nafmetonio

Gli ibridi bis ammonio alcanici in studio sono stati valutati su tre diversi sottotipi recettoriali muscarinici, M_1 , M_2 e M_3 (Tabelle 1 e 2).

I due modulatori allosterici **W84** e **Nafmetonio**, capostipiti dei derivati in studio, hanno mostrato entrambi un comportamento da antagonisti deboli.

In particolare il **Nafmetonio (composto 5)** si è rivelato attivo nei confronti di tutti i sottotipi recettoriali presi in considerazione, evidenziando una discreta potenza nei confronti dei recettori M_2 ($pK_B=6.57$), mentre il **W84 (composto 4)** è risultato inattivo fino alla concentrazione $10\mu M$ sui recettori M_2 , con valori di pK_B di 5.45 e 5.35 rispettivamente per il sottotipo M_1 e M_3 .

Tutti i derivati in studio hanno evidenziato un profilo di agonismo nei confronti di tutti e tre i recettori muscarinici, con una potenza di due o tre ordini di grandezza inferiore rispetto all'agonista ortosterico **Iperoxo (composto 3)**. Entrambe le serie di derivati mostrano in vitro valori di pEC_{50} confrontabili verso i diversi sottotipi recettoriali.

In una prima fase sono stati sintetizzati, per entrambe le serie, i composti ibridi caratterizzati dal progressivo allungamento della catena metilenica spaziatrice da 6 a 8 atomi di carbonio. I derivati del Nafmetonio si rivelano in generale più potenti degli ibridi del W84 nei confronti di tutti i recettori muscarinici.

Relativamente all'attività intrinseca si può inoltre osservare come i valori di α per i recettori M_3 tendano ad essere inferiori rispetto agli M_1 e M_2 , come si nota in particolare per il composto **8b** ($\alpha=1$ M_1 ; $\alpha=1.01$ M_2 ; $\alpha=0.75$ M_3).

Successivamente sono stati sintetizzati nuovi composti contraddistinti da un ulteriore allungamento della catena metilenica, a 9 e 10 atomi di carbonio. Come si può notare nelle tabelle 1 e 2, questa modifica comporta un incremento della potenza verso entrambi i sottotipi recettoriali esaminati, M_2 e

M₃, sia per i derivati del Nafmetonio che del W84 (pEC₅₀ M₂: 8.28-8.74; pEC₅₀ M₃: 8.15-8.40).

Per quanto riguarda l'attività anticolinesterasica, tutti i derivati del Nafmetonio sono risultati dotati di una debole capacità di inibire le colinesterasi cerebrali di ratto. Rispetto al capostipite, che mostra una pIC₅₀ di 4.38 si verifica un leggero incremento fino a valori di 5.56 per l'analogo a 10 atomi di carbonio.

Tra i derivati del W84, hanno mostrato invece debole attività anticolinesterasica solamente i composti **7a** e **8a**.

Composti	M ₁			M ₂			M ₃			AntiChE	
	pE ₅₀	α	pK _B	pE ₅₀	α	pK _B	pE ₅₀	α	pK _B	pIC ₅₀	% E _{max}
3°	9.87 (0.07)	1.00		10.1 (0.13)	1.00		9.78 (0.10)	1.00		Inattivo [#]	
4°			5.45 (0.16)			Inattivo [*]			5.35 (0.17)		
6a°	6.04 (0.26)	0.96 (0.02)		7.18 (0.08)	0.93 (0.03)		6.06 (0.10)	0.94 (0.04)		ND	44.0 (9.0)
7a°	7.98 (0.10)	1.00 (0)		7.91 (0.13)	1.00 (0.02)		6.98 (0.28)	0.92 (0.05)		4.5 (0.05)	73.5 (1.5)
8a°	7.79 (0.08)	1.00 (0)		7.85 (0.07)	1.05 (0.05)		7.16 (0.08)	0.90 (0.06)		4.71 (0.04)	83.5 (0.5)
9a°	7.41 (0.03)	1.03 (0.01)		7.42 (0.16)	0.95 (0.05)		7.16 (0.04)	0.96 (0.06)		ND	58.5 (4.5)
P-9-IPER	ND	ND		8.28 (0.06)	0.91 (0.08)		8.31 (0.15)	1.01 (0.10)		Inattivo [*]	Inattivo [*]
P-10-IPER	ND	ND		8.74 (0.03)	1.11 (0.02)		8.40 (0.11)	0.92 (0.10)		Inattivo [*]	Inattivo [*]

Tabella 1: Valori di potenza (pEC₅₀) e attività intrinseca (α) dei derivati del W84 sui recettori M₁ (vasi deferenti di coniglio), M₂ (atrio di cavia) ed M₃ (ileo di cavia). Valori di potenza (pIC₅₀) e massimo effetto inibitorio (% E max) sulle colinesterasi cerebrali di ratto.

I valori sono medie di 6-10 esperimenti con errore standard tra parentesi.

ND: non determinato; * = fino a 10μM; # = fino a 100μM; ° = pubblicato in Matera et al., 2014.

Composti	M ₁			M ₂			M ₃			AntiChE	
	pE ₅₀	α	pK _B	pE ₅₀	α	pK _B	pE ₅₀	α	pK _B	pIC ₅₀	% E _{max}
3°	9.87 (0.07)	1.00		10.1 (0.13)	1.00		9.78 (0.10)	1.00		Inattivo [#]	
5°			6.24 (0.19)			6.57 (0.18)			5.49 (0.10)		
6b°	7.66 (0.20)	0.90 (0.04)		8.11 (0.13)	0.93 (0.01)		7.68 (0.11)	0.81 (0.07)		4.99 (0.04)	80.0 (2.0)
7b°	8.06 (0.05)	0.97 (0.04)		7.73 (0.07)	0.97 (0.04)		7.30 (0.08)	0.87 (0.09)		5.10 (0.06)	87.3 (2.2)
8b°	8.19 (0.02)	1.00 (0)		8.15 (0.09)	1.01 (0.03)		7.94 (0.09)	0.75 (0.12)		5.00 (0.03)	90.0 (1.0)
9b°	8.00 (0.11)	1.01 (0.03)		7.67 (0.06)	0.98 (0.04)		7.33 (0.08)	1.05 (0.10)		4.64 (0.03)	81.0 (1.0)
N-9-IPER	ND	ND		8.67	1.18		8.22 (0.11)	0.78 (0.09)		5.44 (0.04)	89
N-10-IPER	ND	ND		8.40	1.07		8.15 (0.09)	0.97 (0.09)		5.56 (0.08)	85

Tabella 2: Valori di potenza (pEC₅₀) e attività intrinseca (α) dei derivati del Nafmetonio sui recettori M₁ (vasi deferenti di coniglio), M₂ (atrio di cavia) ed M₃ (ileo di cavia). Valori di potenza (pIC₅₀) e massimo effetto inibitorio (% E max) sulle colinesterasi cerebrali di ratto.

I valori sono medie di 6-10 esperimenti con errore standard tra parentesi.

ND: non determinato; # = fino a 100μM; ° = pubblicato in Matera et al., 2014.

Derivati ISOX

Il composto **ISOX**, precursore dei derivati ibridi in studio, è stato oggetto di precedenti studi (Barocelli et al., 2001), in cui ha mostrato un'attività analgesica potente e dose-dipendente, accompagnata però dalla comparsa di effetti indesiderati periferici dovuti all'attivazione di recettori M_3 , come diarrea, lacrimazione e salivazione.

Come si osserva in Tabella 3, questo precursore si dimostra un agonista potente e totale nei confronti di tutti i sottotipi recettoriali muscarinici.

Al contrario i tre composti **P-4-ISOX**, **P-6-ISOX** e **P-8-ISOX** si rivelano dei deboli agonisti muscarinici sia nei confronti dei recettori M_1 che M_3 .

Sul tessuto cardiaco è stato inoltre riscontrato per tutti i composti un imprevisto effetto inotropo positivo.

Composti	M_1		M_2		M_3		AntiChE	
	pE ₅₀	α	pE ₅₀	α	pE ₅₀	α	pIC ₅₀	% E _{max}
ISOX	7.48 (0.05)	0.98 (0.02)	8.03 (0.16)	0.99 (0.02)	7.79 (0.06)	1.09 (0.04)	-	-
P-4-ISOX	5.97	0.52	*		4.71 (0.06)	0.67 (0.13)	-	-
P-6-ISOX	5.43 (0.18)	0.83 (0.05)	§	0.45 (0.2)	5.28 (0.08)	0.76 (0.12)	4.29 (0.16)	71
P-8-ISOX		0.13	#		5.55 (0.07)	1.02 (0.14)	4.52 (0.03)	79

Tabella 3: Valori di potenza (pEC₅₀) e attività intrinseca (α) dei derivati ISOX sui recettori M_1 (vasi deferenti di coniglio), M_2 (atrio di cavia) ed M_3 (ileo di cavia). Valori di potenza (pIC₅₀) e massimo effetto inibitorio (% E max) sulle colinesterasi cerebrali di ratto.

I valori sono medie di 6-10 esperimenti con errore standard tra parentesi.

ND: non determinato

* = inotropo positivo da 1 μ M; § = inotropo positivo da 30 μ M

= inotropo positivo da 100nM; - = inattivo fino a 100 μ M

Valutazione dell'attività analgesica: Writhing test

Derivati del Nafmetonio e del W84

Gli ibridi in studio sono stati testati in vivo tramite *Writhing test*, per valutare le loro proprietà antinocicettive. Tutti i composti di entrambe le serie, ad eccezione dei composti **7b** e **9b**, hanno mostrato un'attività analgesica dose dipendente.

La potenza in vivo dei derivati di entrambe le serie risulta essere inferiore rispetto al precursore ortosterico **3** (ED_{50} : 1 μ g/Kg).

L'attività antinocicettiva sembra essere influenzata sia dalla natura del modulatore allosterico che dalla lunghezza della catena metilenica spaziatrice. Infatti, come si può osservare dai Grafici 1 e 2, i derivati del Nafmetonio si mostrano più potenti rispetto a quelli del W84, così come per entrambe le serie si osserva un incremento della potenza con l'allungamento dello spaziatore metilenico. Infatti i due analoghi superiori dei due gruppi si rivelano dotati della maggiore potenza (ED_{50} : 0.007 (**N-10-IPER**) vs 0.25 (**6b**) mg/Kg; ED_{50} : 0.02 (**P-10-IPER**) vs 7.73 (**6a**) mg/Kg).

Dai grafici 3 e 4 si può dunque osservare una buona correlazione per entrambe le serie tra il numero di metileni e la potenza analgesica (derivati Nafmetonio: $R^2=0.931$; derivati W84: $R^2=0.994$).

Tra i derivati del Nafmetonio gli omologhi superiori, a partire dal composto **8b**, mostrano tutti un'elevata attività analgesica, con ED_{50} dell'ordine dei microgrammi/Kg (Tabella 4). Invece all'interno della serie del W84, sebbene il composto **P-10-IPER** sia il derivato dotato della maggiore potenza analgesica, il composto **P-9-IPER** risulta inattivo alla dose di 0.1mg/kg, e presenta un'azione analgesica non statisticamente significativa alla dose di 1mg/kg.

I composti **9a** e **9b** sono invece i due analoghi a 6 atomi di carbonio, caratterizzati dall'incorporazione del gruppo ammonico quaternario in un anello piperidinico adiacente al nucleo policiclico.

Come si può osservare dai grafici 1 e 2, la loro attività si discosta da quella degli altri derivati. Il composto **9a** mostra infatti un'elevata potenza (ED_{50} : 0.25 mg/Kg), producendo un'analgesia dell'80% alla dose di 1 mg/Kg. Invece la sua

controparte **9b** risulta inattiva fino alla dose di 1 mg/Kg, e l'elevata tossicità mostrata non ha consentito di indagare ulteriormente l'attività analgesica a dosi superiori.

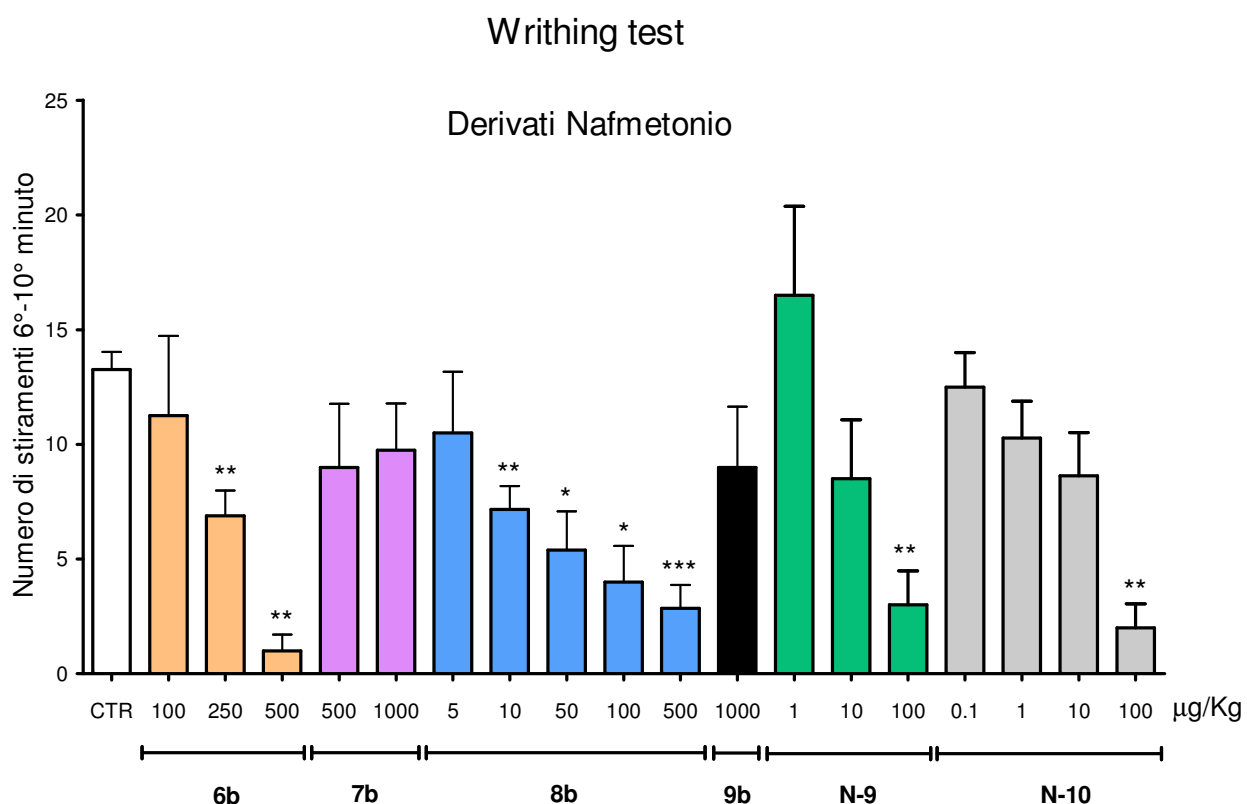


Grafico 1: Attività analgesica dei composti in studio valutata tramite *Writhing test*, espressa come numero di stiramenti osservati tra il 6° e il 10° minuto dopo somministrazione dell'agente algogeno.

I valori sono riportati come medie $\pm$ errori standard. Le dosi sono espresse come $\mu\text{g/Kg}$.

*=P<0.05, **=P<0.01, ***=P<0.001, One way ANOVA, Dunnett's post test.

Writhing test

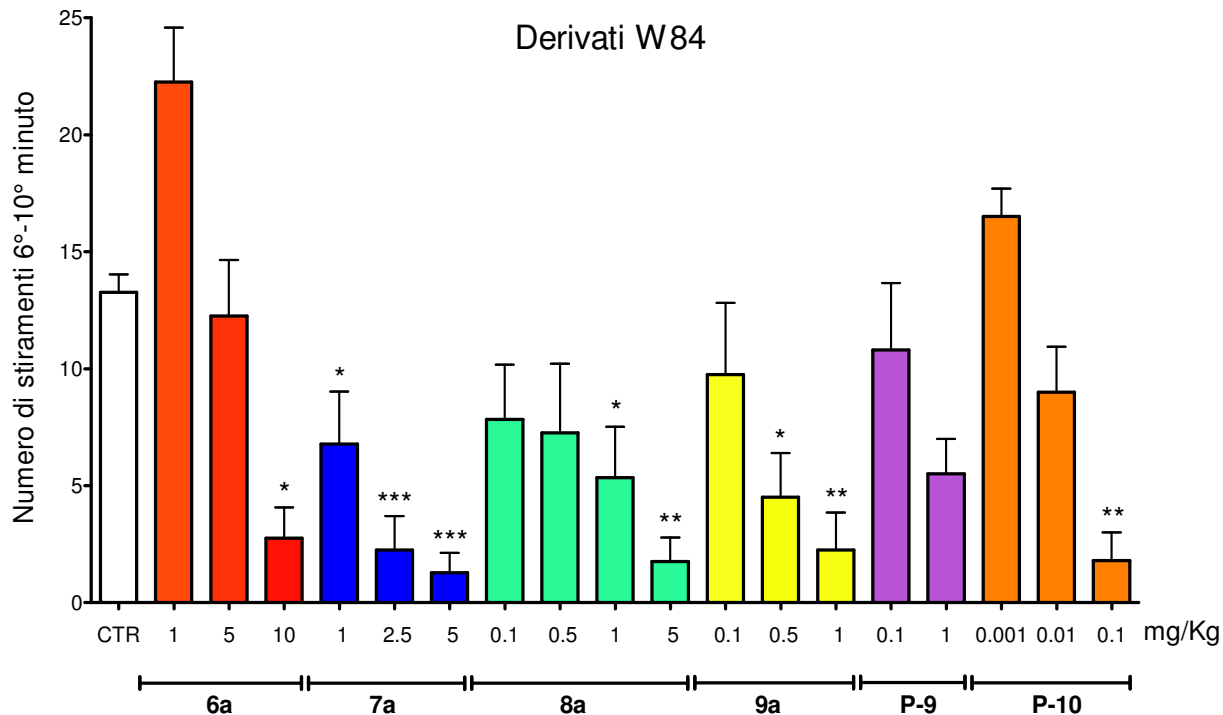


Grafico 2: Attività analgesica dei composti in studio valutata tramite *Writhing test*, espressa come numero di stiramenti osservati tra il 6° e il 10° minuto dopo somministrazione dell'agente algogeno.

I valori sono riportati come medie $\pm$ errori standard. Le dosi sono espresse come mg/Kg.

***=P<0.05, **=P<0.01, ***=P<0.001, One way ANOVA, Dunnett's post test.**

Derivati Nafmetonio

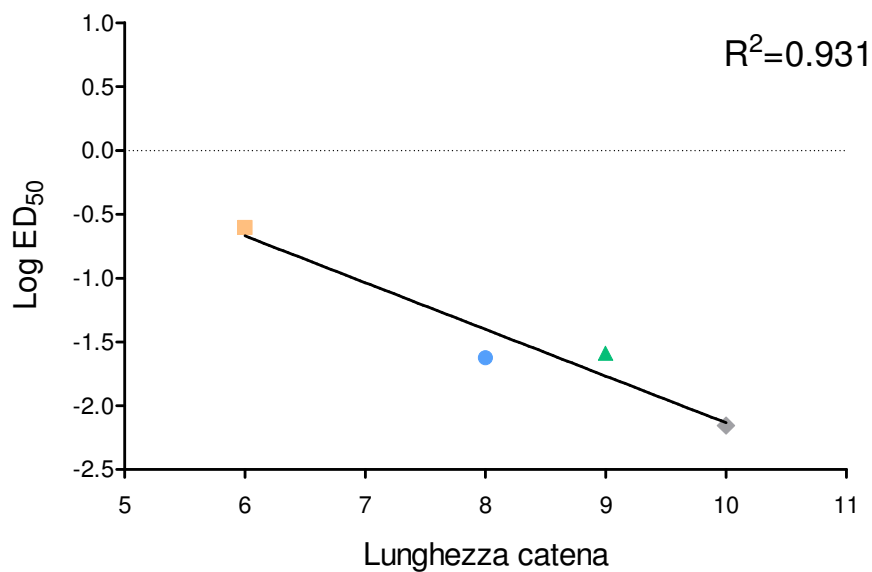


Grafico 3: Correlazione tra i valori di LogED₅₀ e la lunghezza della catena spaziatrice metilenica per i derivati del Nafmetonio.

Derivati W84

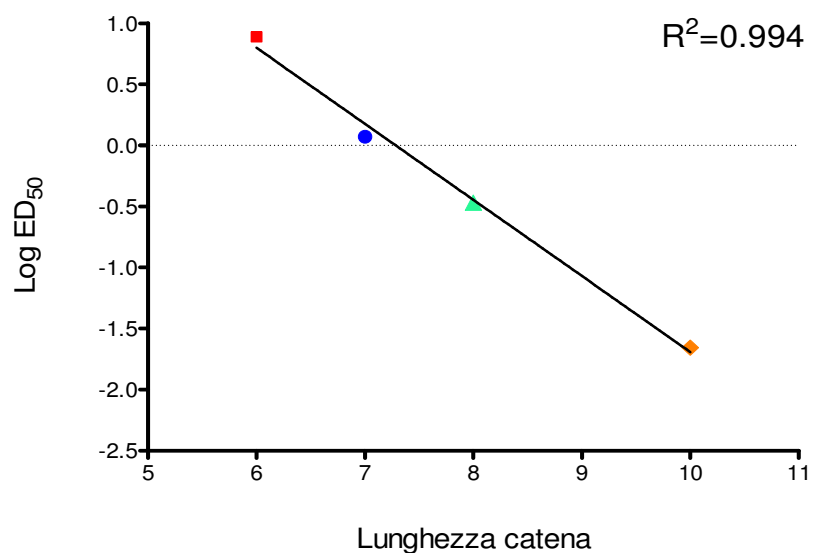


Grafico 4: Correlazione tra i valori di LogED₅₀ e la lunghezza della catena spaziatrice metilenica per i derivati del W84.

Derivati Nafmetonio	ED₅₀ (mg/Kg)	Derivati W84	ED₅₀ (mg/Kg)
6b	0.25	6a	7.73
7b	-	7a	1.18
8b	0.024	8a	0.34
9b	-	9a	0.25
N-9-IPER	0.026	P-9-IPER	-
N-10-IPER	0.007	P-10-IPER	0.02

Tabella 4: Potenza analgesica espressa come ED₅₀ delle due serie di composti.

Derivati ISOX

Tutti i composti sono stati in grado di evocare una risposta analgesica nel *Writhing test*, con una potenza che risulta essere nettamente inferiore rispetto al componente ortosterico **ISOX** (ED₅₀: 63µg/Kg) (Tabella 5).

Derivati ISOX	ED ₅₀ (mg/Kg)
P-4-ISOX	26.55
P-6-ISOX	8.36
P-8-ISOX	6.64

Tabella 5: Potenza analgesica dei derivati ISOX espressa come ED₅₀.

Come si osserva nel Grafico 5, tutti i derivati esercitano effetti antinocicettivi in maniera dose-dipendente.

Analogamente a quanto succede per i derivati del Nafmetonio e del W84, la potenza analgesica cresce con l'allungamento della catena spaziatrice metilenica che collega la struttura dell'**ISOX** a quella del **W84**.

Il composto **P-4-ISOX** risulta infatti il meno potente, riducendo il numero di stiramenti in maniera statisticamente significativa solo alla dose di 40 mg/kg.

Il composto **P-6-ISOX** mostra invece un effetto analgesico del 60% già alla dose di 10 mg/kg, mentre il **P-8-ISOX** allo stesso dosaggio produce un'analgesia del 90%.

Writhing test

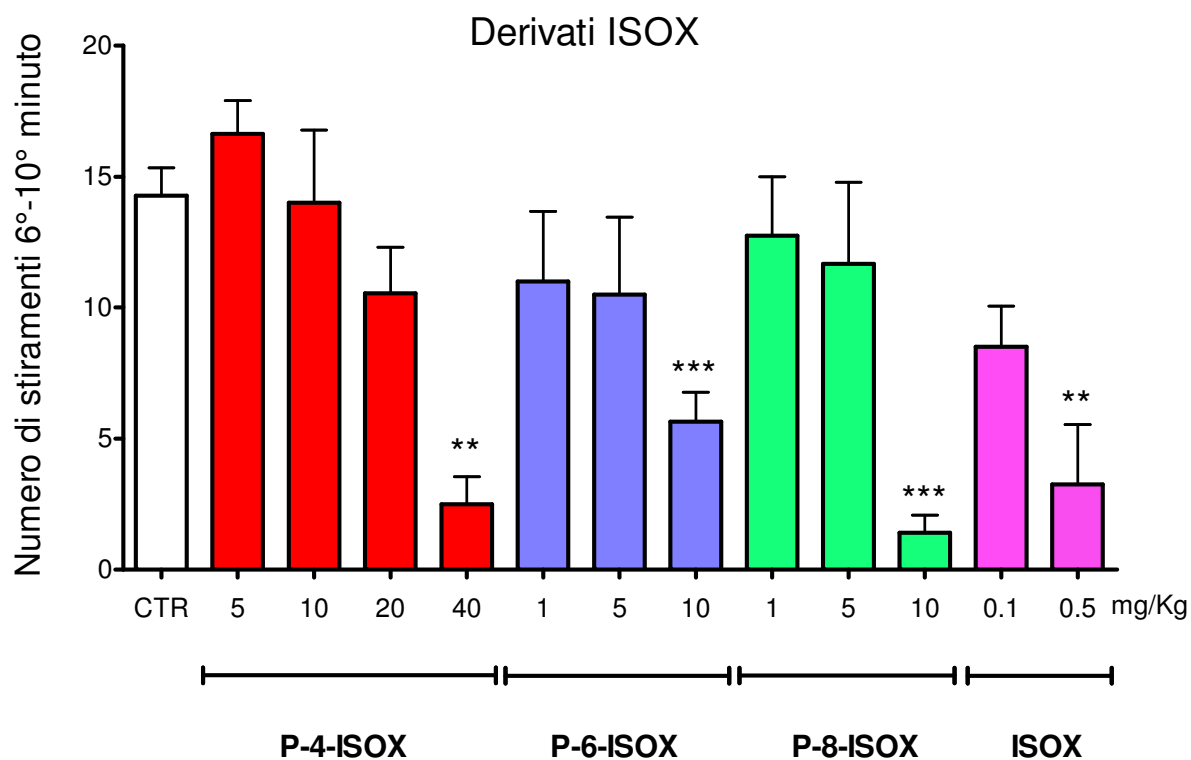


Grafico 5: Attività analgesica dei composti in studio valutata tramite *Writhing test*, espressa come numero di stiramenti osservati tra il 6° e il 10° minuto dopo somministrazione dell'agente algogeno.

I valori sono riportati come medie $\pm$ errori standard. Le dosi sono espresse in mg/Kg.

= $P < 0.01$, *= $P < 0.001$, One way ANOVA, Dunnett's post test.

L'incremento della potenza analgesica passando dal **P-4-ISOX** all'analogo superiore **P-8-ISOX** è osservabile anche dal Grafico 6, dove si riscontra una buona correlazione tra il logaritmo delle ED_{50} e il numero di metileni (R^2 : 0.916).

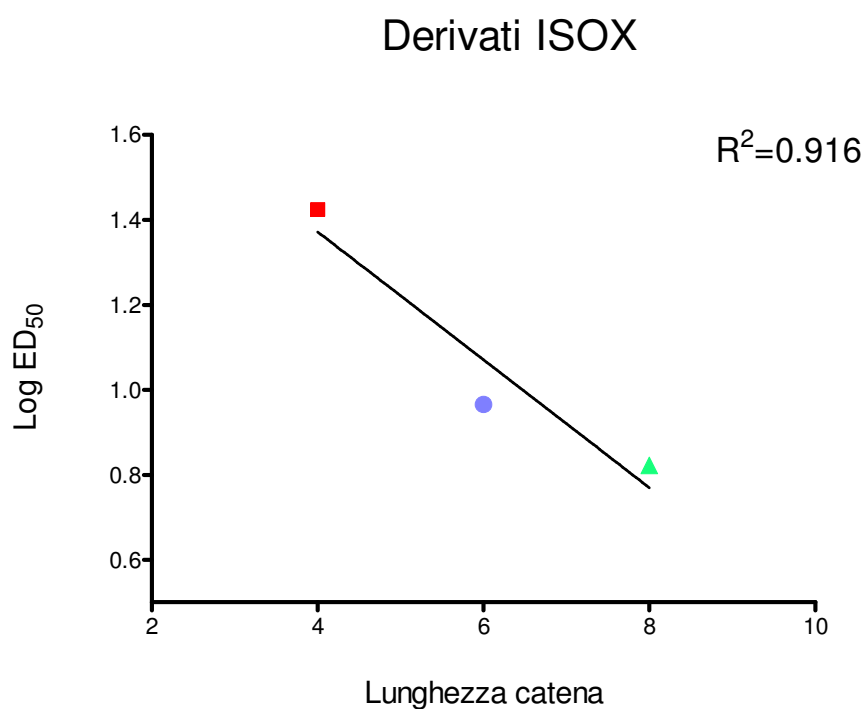


Grafico 6: Correlazione tra i valori di $\text{Log}ED_{50}$ e la lunghezza della catena spaziatrice metilenica per i derivati ISOX.

Valutazione dell'attività analgesica: Hot plate test

Derivati del Nafmetonio e del W84

L'indagine sull'attività antinocicettiva dei composti è stata estesa ad un diverso modello di nocicezione, l'*Hot plate test*, nel quale lo stimolo nocivo è di natura termica. In questo modello, in cui è stata utilizzata la morfina come riferimento positivo, i derivati del Nafmetonio non sembrano attivi, infatti nessuno dei composti è in grado di prolungare in maniera statisticamente significativa il tempo di latenza degli animali trattati rispetto al controllo.

Dal Grafico 7, che riporta l'andamento dell'effetto nocicettivo nel tempo, si può osservare come il composto **8b**, pur mostrando una maggiore efficacia rispetto ai composti **N-9-IPER** e **N-10-IPER**, non supera il 25% del massimo effetto antinocicettivo dopo 90 minuti dalla somministrazione.

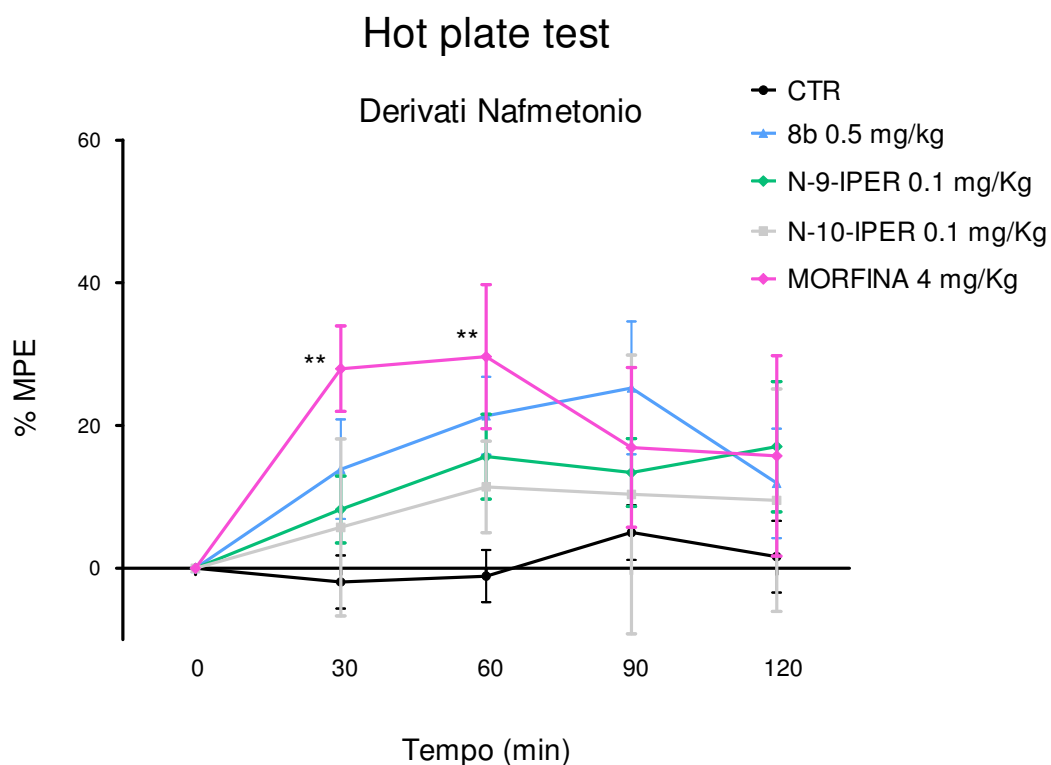


Grafico 7: Effetto antinocicettivo espresso come percentuale del Massimo Effetto Possibile (MPE) in funzione del tempo. **= $P < 0.01$, Two way ANOVA, Bonferroni post test. MPE: $100 \times [(\text{latenza trattato} - \text{latenza basale}) / (30 - \text{latenza basale})]$.

Per quanto riguarda i derivati del W84 l'omologo superiore della serie, il composto a 10 atomi di carbonio **P-10-IPER**, è l'unico che si rivela in grado di prolungare il tempo di latenza dei topolini in maniera significativa.

Dopo 30 minuti dalla somministrazione raggiunge un effetto antinocicettivo confrontabile con quello della morfina (Grafico 8).

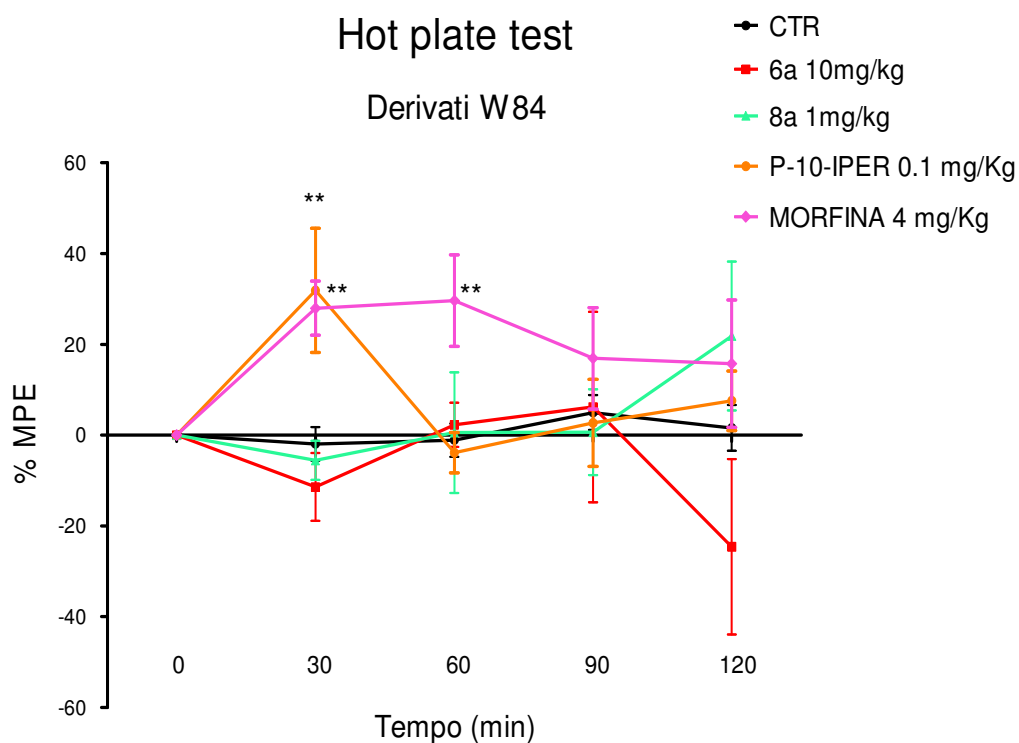


Grafico 8: Effetto antinocicettivo espresso come percentuale del Massimo Effetto Possibile (MPE) in funzione del tempo. **= $P < 0.01$, Two way ANOVA, Bonferroni post test. MPE: $100 \times [(\text{latenza trattato} - \text{latenza basale}) / (30 - \text{latenza basale})]$.

Derivati ISOX

Anche i derivati ISOX sono stati valutati nel modello *Hot plate test* alle dosi risultate significativamente analgesiche nel *Writhing test*; come si può osservare dal Grafico 9, il composto **ISOX** alla dose di 0.5 mg/Kg si rivela efficace, prolungando in maniera statisticamente significativa il tempo di latenza

nell'insorgenza della risposta dei topolini ai tempi di 30 e 60 minuti. Al contrario nessuno dei derivati in studio si è dimostrato efficace in questo tipo di modello.

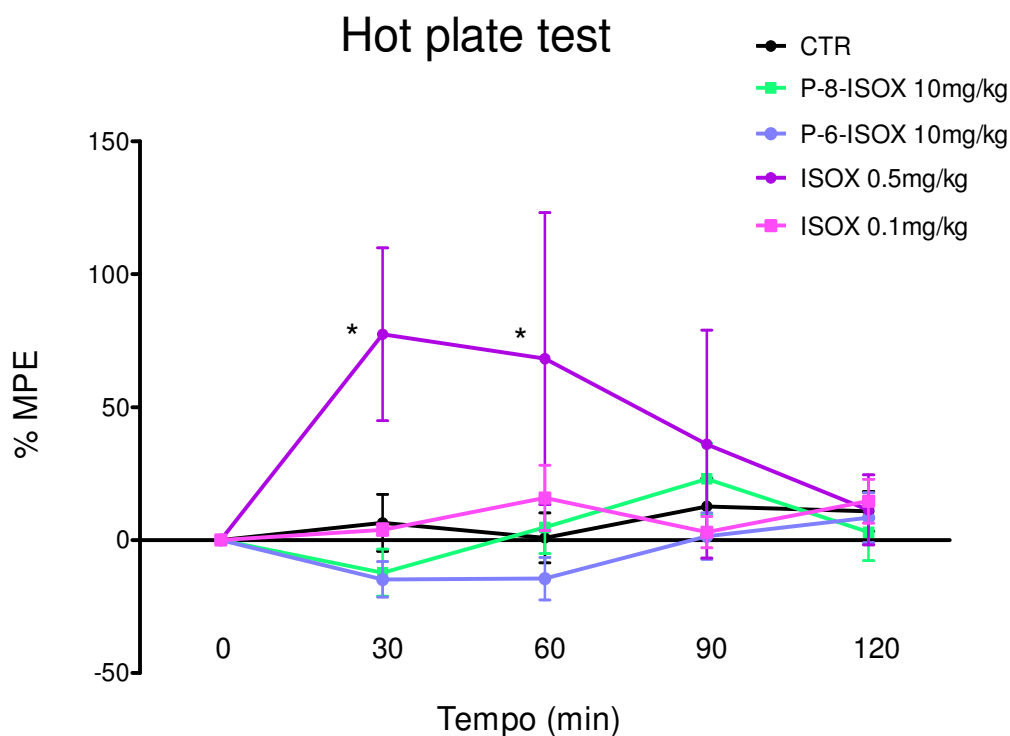


Grafico 9: Effetto antinocicettivo espresso come percentuale del Massimo Effetto Possibile (MPE) in funzione del tempo. *=P<0.05, Two way ANOVA, Bonferroni post test. MPE: $100 \times [(\text{latenza trattato} - \text{latenza basale}) / (30 - \text{latenza basale})]$.

Valutazione dell'attività sedativa

Derivati del Nafmetonio e del W84

L'attività analgesica dei composti in studio, emersa dal *Writhing test*, è stata valutata come comparsa di una risposta stereotipata conseguente alla somministrazione di un agente algogeno; la presenza di eventuali proprietà sedative delle sostanze potrebbe interferire con la comparsa di questa risposta,

portando quindi a sovrastimare l'azione analgesica degli ibridi. È stata pertanto verificata l'assenza di azioni sedative, tramite *Open field test*.

Questo test consente di valutare l'attività locomotoria spontanea dei topolini, che vengono singolarmente posti all'interno di un'arena quadrata dove possono muoversi liberamente, valutandone la tendenza ad esplorare un ambiente sconosciuto.

I parametri analizzati nel corso di 60 minuti di osservazione sono la distanza percorsa, espressa in metri, e il tempo di immobilità degli animali, espresso in minuti. Gli ibridi in studio sono stati testati alle dosi in grado di produrre almeno l'80% di analgesia.

Dal grafico 10 si può osservare come all'interno del gruppo dei derivati del Nafmetonio nessuno dei composti prolunghi in maniera statisticamente significativa il tempo di immobilità degli animali.

Prendendo invece in considerazione il cammino percorso si osserva dal grafico che l'allungamento della catena metilenica spaziatrice comporta l'inizio della comparsa di effetti sedativi. Infatti per i derivati a 9 e 10 atomi di carbonio si assiste ad una riduzione significativa di questo parametro ($P < 0.01$ e $P < 0.05$ rispettivamente) (Grafico 11).

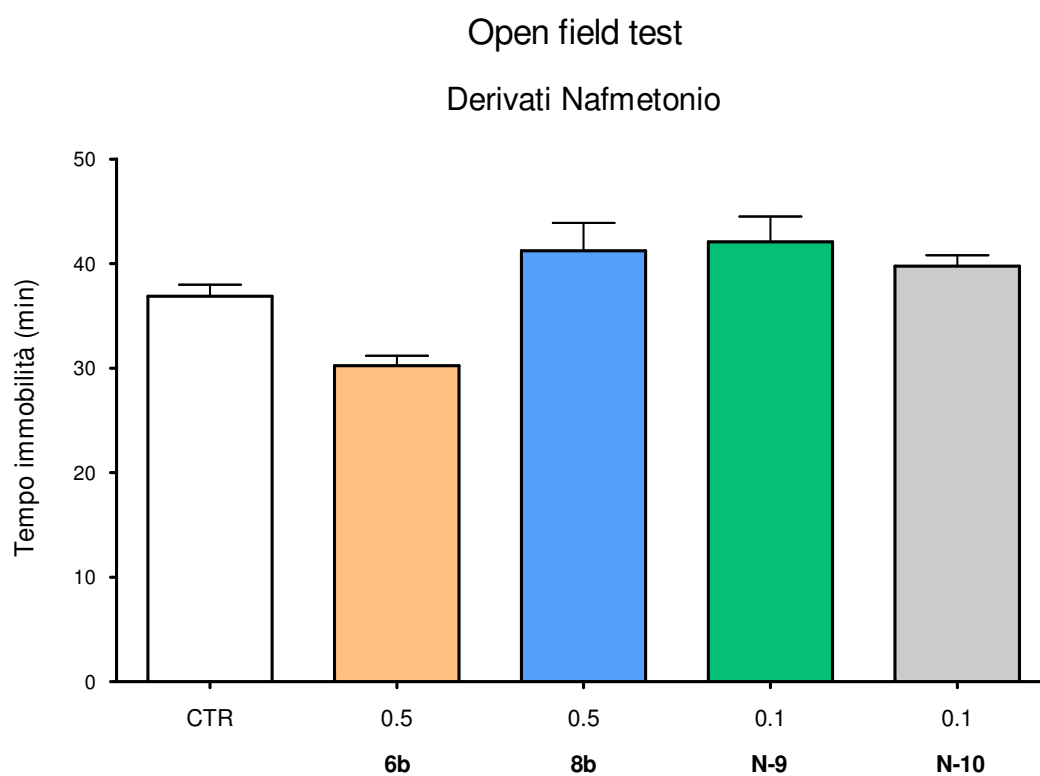


Grafico 10: Effetti dei derivati del Nafmetonio sull'attività locomotoria spontanea valutata tramite *Open field test* espressa come tempo di immobilità (minuti).

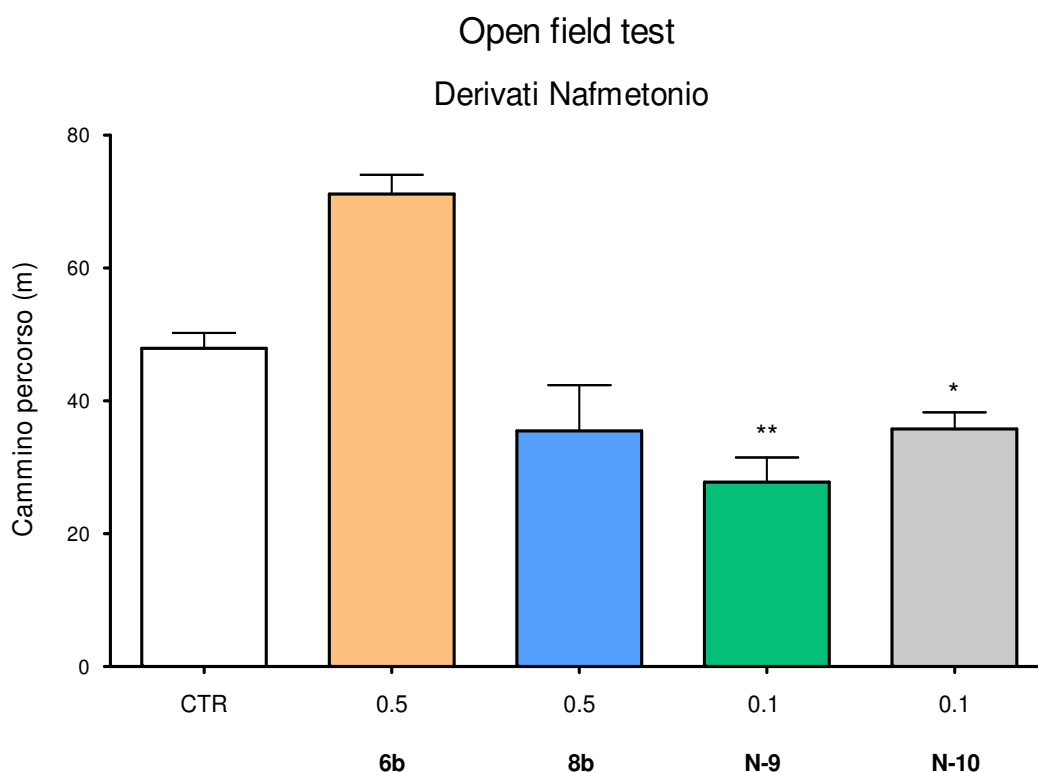


Grafico 11: Effetti dei derivati del Nafmetonio sull'attività locomotoria spontanea valutata tramite *Open field test* espressa come cammino percorso (metri).

*= $P < 0.05$, **= $P < 0.01$, One way ANOVA, Dunnett's post test.

Per quanto riguarda i derivati del W84, già il composto **8a** risulta essere sedativo in quanto la sua somministrazione influenza sia il tempo di immobilità che il cammino percorso (Grafici 12 e 13).

L'allungamento dello spaziatore metilenico anche per questa serie di composti si riflette in una riduzione statisticamente significativa del cammino percorso riscontrabile per il composto **P-10-IPER** (Grafico 13).

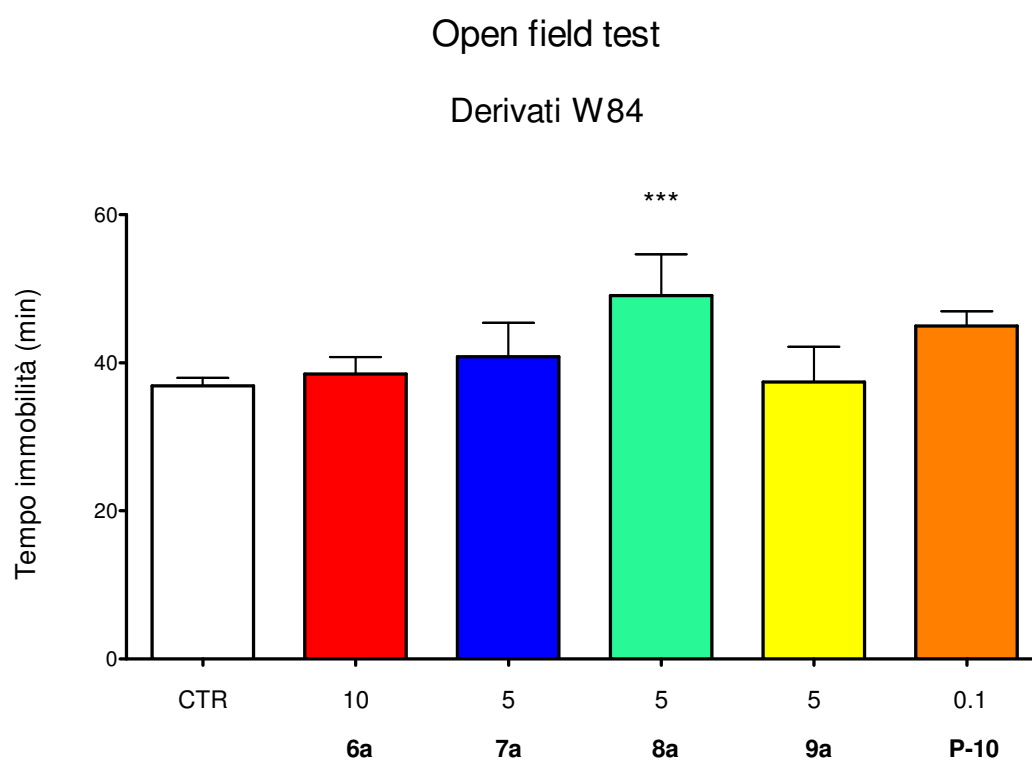


Grafico 12: Effetti dei derivati del W84 sull'attività locomotoria spontanea valutata tramite *Open field test* espressa come tempo di immobilità (minuti).

*****=P<0.001, One way ANOVA, Dunnett's post test.**

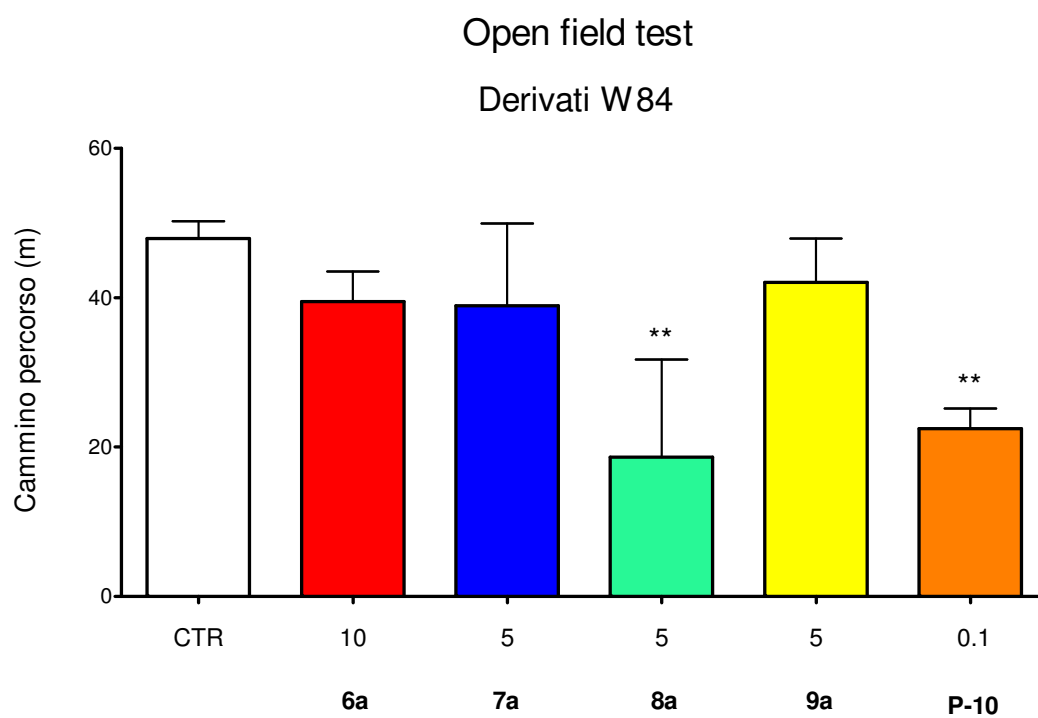


Grafico 13: Effetti dei derivati del W84 sull'attività locomotoria spontanea valutata tramite *Open field test* espressa come cammino percorso (metri).

****=P<0.01, One way ANOVA, Dunnett's post test.**

Derivati ISOX

Anche i derivati della serie ISOX sono stati valutati tramite *Open field test* per determinare la presenza di effetti sedativi. Sono state valutate le dosi risultate significativamente analgesiche al *Writhing test*.

Tra i composti dualsterici in esame solo il **P-4-ISOX** ha ridotto la motilità spontanea dei topolini, sia espressa come metri percorsi durante l'ora di osservazione, sia valutata come minuti di immobilità (Grafico 14).

Il composto ortosterico **ISOX** è risultato anche esso sedativo in quanto, pur non modificando il tempo di immobilità, riduce in modo altamente significativo il cammino percorso (Grafico 15).

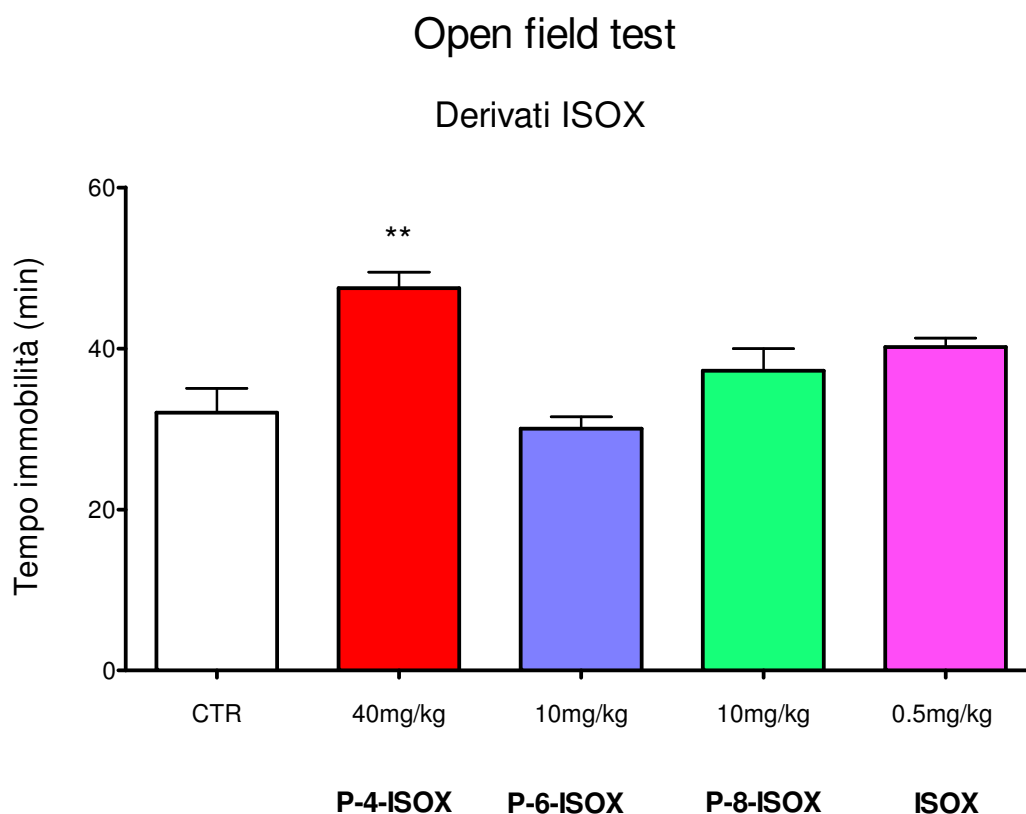


Grafico 14: Effetti dei derivati ISOX sull'attività locomotoria spontanea valutata tramite *Open field test* espressa come tempo di immobilità (minuti).

****=P<0.01, One way ANOVA, Dunnett's post test.**

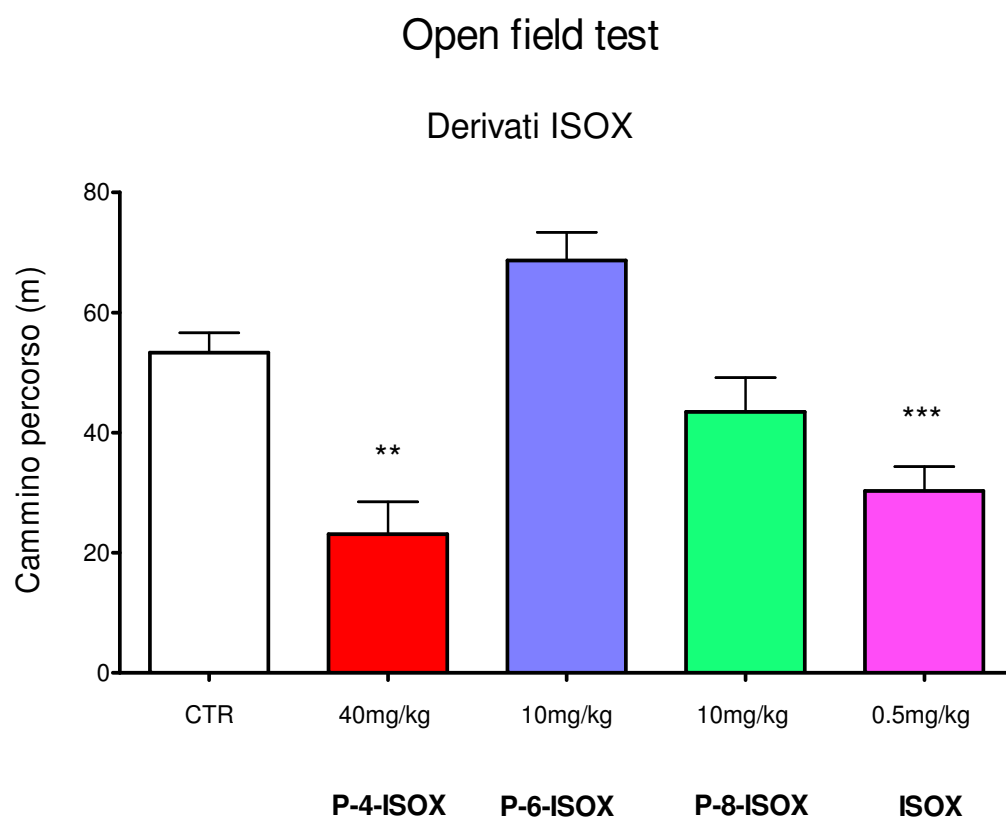


Grafico 15: Effetti dei derivati ISOX sull'attività locomotoria spontanea valutata tramite *Open field test* espressa come cammino percorso (metri).

****= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$, One way ANOVA, Dunnett's post test.**

Valutazione effetti indesiderati muscarinici

Derivati del Nafmetonio e del W84

Per valutare il profilo di tollerabilità dei derivati in studio, in seguito a somministrazione sottocutanea, è stata registrata la frequenza di comparsa di effetti indesiderati riconducibili alla stimolazione di recettori muscarinici, quali diarrea, come conseguenza di un eccessivo incremento della motilità intestinale, scialorrea e lacrimazione, prodotte da un aumento delle secrezioni ghiandolari, tremori e ipotermia.

La Tabella 6 riporta le dosi a cui i composti producono un grado significativo di analgesia; come si può osservare, i derivati del Nafmetonio risultano meglio tollerati. Infatti la loro somministrazione non è accompagnata dalla presenza di effetti indesiderati muscarinici. Per quanto riguarda i derivati del W84, l'unico composto che incrementa le secrezioni ghiandolari è il **7a**.

Per tutti i composti della serie si registra però un aumento della motilità intestinale, ed è anche frequente la comparsa di ipotermia.

Nessuno dei composti produce la comparsa di tremori, fatto che suggerisce un meccanismo d'azione periferico, in accordo con la struttura dei composti, che essendo molecole ingombranti e dotate di due gruppi carichi difficilmente potrebbero essere in grado di attraversare la barriera ematoencefalica.

L'allungamento della catena metilenica a 9 e 10 atomi di carbonio porta ad un incremento della potenza analgesica, ma anche, oltre alla comparsa di effetti sedativi come precedentemente osservato, ad un peggioramento del profilo di tollerabilità, per entrambe le serie. La prima dose analgesica di tutti e tre i derivati, **P-10-IPER**, **N-9-IPER**, **N-10-IPER** è infatti accompagnata da una elevata frequenza di comparsa di effetti indesiderati principalmente M₃ mediati (Tabella 6).

Composti	Dose	Diarrea	Salivazione	Lacrimazione	Ipotermia	Tremore
3	0.001	-	+	-	++	-
6a	10	+	-	-	+++	-
7a	1	++	+	++	++	-
8a	1	++	-	-	-	-
9a	0.5	-	-	-	-	-
P10-IPER	0.1	++++	++++	++++	+++	-
6b	0.25	-	-	-	-	-
8b	0.01	-	-	-	-	-
N9-IPER	0.1	++	++	+	+++	-
N10-IPER	0.1	++	+++	+	++++	-

Tabella 6: Frequenza di comparsa di effetti indesiderati negli animali trattati con i composti in studio alle dosi analgesiche. +=25%, ++=50%, +++=75%, ++++=100%.

La dose è espressa in mg/Kg.

Derivati ISOX

Come riportato in Tabella 7, il composto **ISOX** alla prima dose analgesica di 0.5 mg/kg risulta poco tollerato. È infatti evidente la presenza di effetti indesiderati tipici della stimolazione dei recettori muscarinici: effetto ipotermizzante, aumento della motilità intestinale e delle secrezioni, con salivazione e lacrimazione presenti almeno nel 50% degli animali trattati.

I nuovi ibridi bisammonioalcanici sono molto meglio tollerati rispetto al precursore ortosterico **ISOX**, in quanto non si sono registrati, in nessuno dei topolini, gli effetti collaterali dovuti ad un'eccessiva stimolazione muscarinica M₃. L'unico effetto indesiderato che si è potuto osservare è stata la comparsa di ipotermia, osservata nel 50% degli animali trattati con le dosi analgesiche di **P-4-ISOX** e di **P-6-ISOX**, e nel 100% dei topolini trattati con la dose analgesica di **P-8-ISOX**.

L'assenza di tremori può essere giustificata per la presenza di due gruppi carichi, che dovrebbe quindi impedire l'accesso delle molecole al sistema nervoso centrale.

Composti	Dose	Diarrea	Salivazione	Lacrimazione	Tremori	Ipotermia
ISOX	0.5	++++	++	+++	-	+++
P4-ISOX	40	-	-	-	-	++
P6-ISOX	10	-	-	-	-	++
P8-ISOX	10	-	-	-	-	++++

Tabella 7: Frequenza di comparsa di effetti indesiderati negli animali trattati con i composti in studio alle dosi analgesiche. ++=50%, +++=75%, ++++=100%.

La dose è espressa in mg/Kg.

Effetti sul sistema cardiovascolare: composto 8b

Tra i derivati del W84 e del Nafmetonio in studio, il composto **8b** sembra risultare il composto maggiormente promettente, in quanto caratterizzato dalla maggiore potenza analgesica unita ad un buon profilo di tollerabilità.

La sua somministrazione non è infatti accompagnata da effetti sedativi o da effetti indesiderati dovuti a stimolazione dei recettori M_3 a dosi ancora in grado di produrre una significativa analgesia. Per approfondire il suo profilo farmacologico si è voluto quindi verificare gli effetti della sua somministrazione sul sistema cardiocircolatorio. Infatti l'interazione con i recettori M_2 presenti a livello cardiaco potrebbe comportare delle ripercussioni negative sui parametri cardiovascolari. Il derivato bisammonioalcanico è stato quindi somministrato in ratti anestetizzati, in cui sono stati monitorati i cambiamenti di pressione arteriosa media e frequenza cardiaca.

Il Grafico 16 mostra come il composto **8b** a 0.01 mg/Kg, dose risultata attiva nel *Writhing test*, non modifichi i valori di pressione media.

La somministrazione di dosi maggiori genera un abbassamento dose dipendente, riduzione che risulta statisticamente significativa solamente a partire da 0.1 mg/Kg, dose dieci volte superiore a quella necessaria per esercitare un'azione antinocicettiva.

Analogamente a quanto accade per la pressione arteriosa, anche il parametro della frequenza cardiaca non viene modificato dalla somministrazione di soluzione fisiologica o del composto **8b** alla dose di 0.01 mg/kg.

Il trattamento con dosaggi superiori provoca una progressiva riduzione della frequenza, significativa soltanto per i dosaggi di 0.1 e 0.5 mg/kg (Grafico 17).

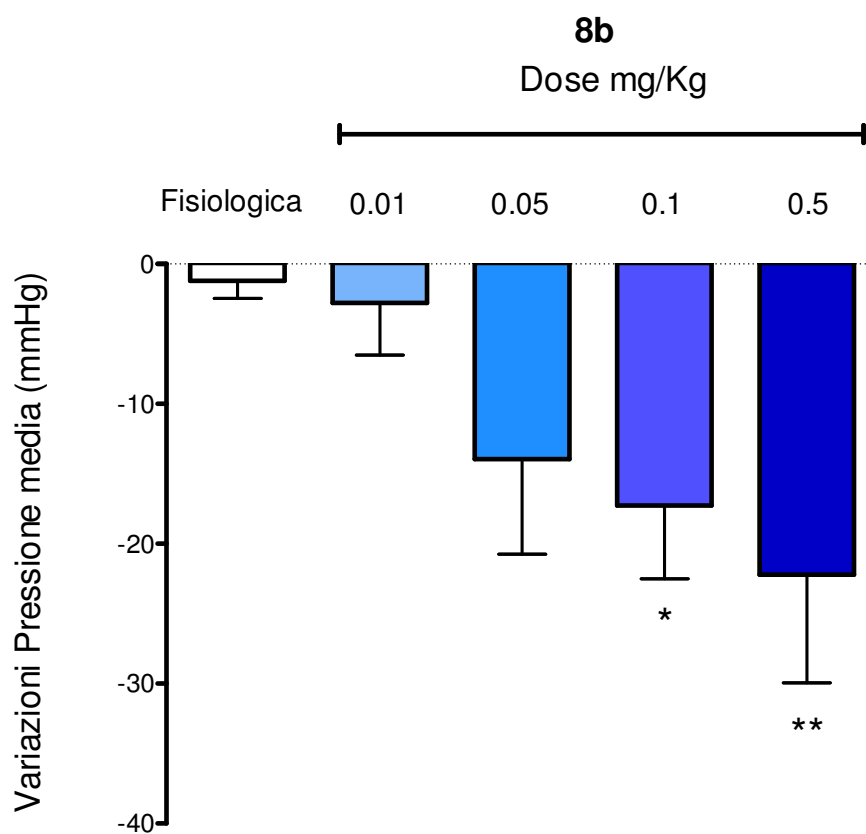


Grafico 16: Variazioni di pressione media (mmHg) dopo somministrazione di fisiologica e di dosi crescenti di composto 8b.

*=P<0.05, **=P<0.01, One way ANOVA, Bonferroni post test.

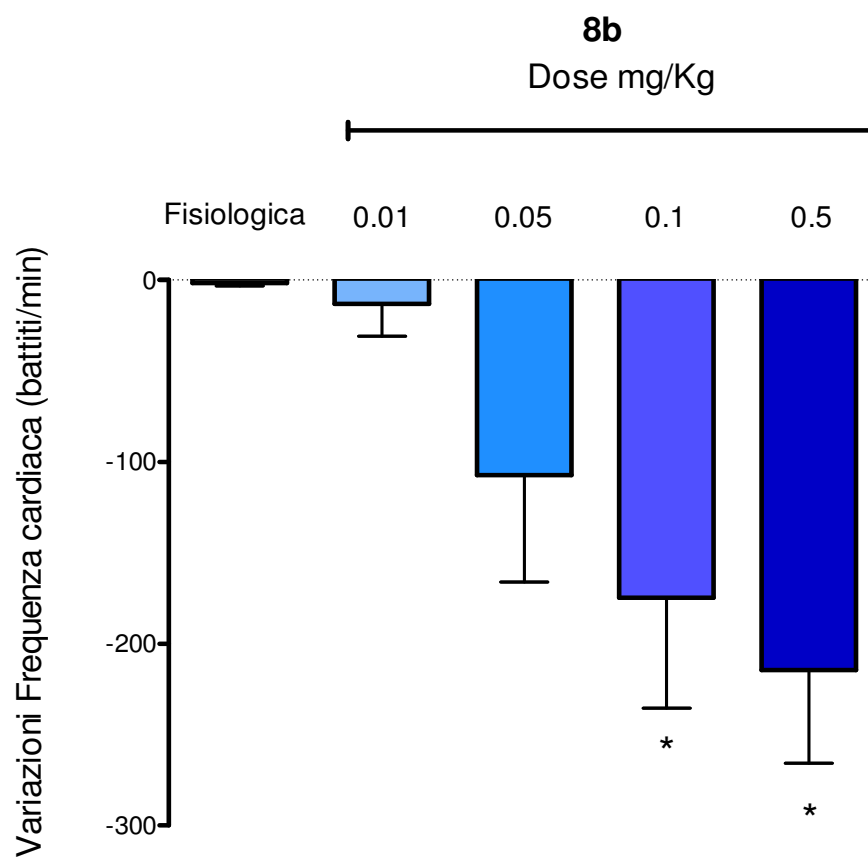


Grafico 17: Variazioni di frequenza cardiaca media (BPM) dopo somministrazione di fisiologica e di dosi crescenti di composto 8b.

*=P<0.05, One way ANOVA, Bonferroni post test.

Caratterizzazione attività analgesica

Composto 8b

Infine l'indagine è stata estesa per verificare l'effettivo coinvolgimento dei recettori muscarinici nell'attività analgesica del composto **8b**.

Questo è stato quindi somministrato nel *Writhing test*, alla dose in grado di indurre un 80% di analgesia (0.5mg/kg), in associazione con alcuni bloccanti recettoriali: l'antagonista muscarinico atropina, la metilatropina, analogo quaternario incapace, a differenza del precursore atropina, di attraversare la barriera emato-encefalica, l'antagonista nicotinico neuronale mecamilamina, il naloxone, antagonista per i recettori μ oppioidi, somministrati a dosi alle quali è documentata la loro azione di antagonisti recettoriali specifici in vivo.

Dal Grafico 18 si osserva come l'effetto analgesico del composto non risenta della presenza né di mecamilamina né di naloxone.

Solo il pretrattamento con atropina e metilatropina è stato in grado di revertire l'azione antinocicettiva, suggerendo il coinvolgimento dei recettori muscarinici periferici nel mediare l'analgesia in vivo nei topolini, senza l'interessamento dei recettori oppioidi o nicotinici. Questo potrebbe consentire l'assenza di effetti indesiderati quali depressione respiratoria, dipendenza e tolleranza, classici sintomi che accompagnano l'utilizzo di farmaci morfino-simili.

La struttura voluminosa delle molecole in esame e la presenza di due gruppi ammonici quaternari fa ipotizzare un difficile accesso dei composti al sistema nervoso centrale.

Dal momento che i recettori M_2 nel SNC modulano il rilascio di numerosi neurotrasmettitori, l'azione periferica dei composti in studio permette di evitare interferenze con la trasmissione nervosa centrale.

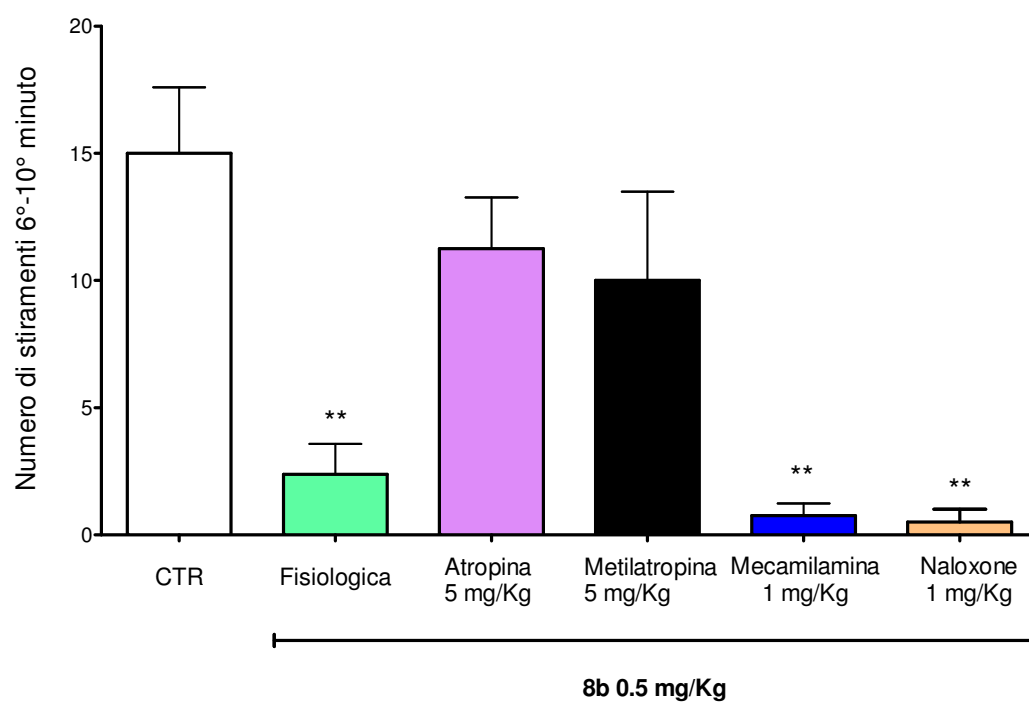


Grafico 18: Attività analgesica, valutata tramite *Writhing test*, del composto 8b da solo e in associazione a diversi antagonisti recettoriali.

****=P<0.01, One way ANOVA, Dunnett's post test.**

Caratterizzazione attività analgesica

Composto P-6-ISOX

Considerando il profilo farmacologico dei derivati ISOX osservato *in vitro* e la totale assenza *in vivo* dei tipici effetti indesiderati dovuti a stimolazione dei recettori muscarinici, si è deciso di indagare il meccanismo recettoriale alla base dell'attività analgesica riscontrata. Per questo motivo il composto **P-6-ISOX** è stato valutato nuovamente mediante *Writhing test* alla dose in grado di indurre un grado significativo di analgesia (10mg/kg) in associazione con alcuni bloccanti recettoriali: con l'antagonista muscarinico atropina (5mg/kg s.c.), con l'antagonista selettivo dei recettori α_2 -adrenergici yohimbina (1mg/kg s.c.), con l'antagonista nicotinico neuronale mecamilamina (1mg/kg s.c.) e con l'antagonista oppioide naloxone (1mg/kg s.c.).

Tutti gli antagonisti sono stati somministrati 15 minuti prima del composto in studio, utilizzando dosaggi indicati in letteratura; inoltre alle dosi utilizzate questi antagonisti non producono effetti sedativi nell'*Open field test* e non vanno a modificare in modo significativo il numero di stiramenti nel *Writhing test*.

Dal Grafico 19 si evidenzia che l'attività analgesica del **P-6-ISOX** non sembra essere mediata nè dai recettori nicotinici nè dai recettori muscarinici, infatti la presenza di questi due antagonisti non va ad influenzare l'effetto antinocicettivo del composto in studio.

L'effetto analgesico invece viene ridotto dalla co-somministrazione degli antagonisti naloxone e yohimbina, mettendo in luce un possibile coinvolgimento dei recettori oppioidi e α_2 -adrenergici.

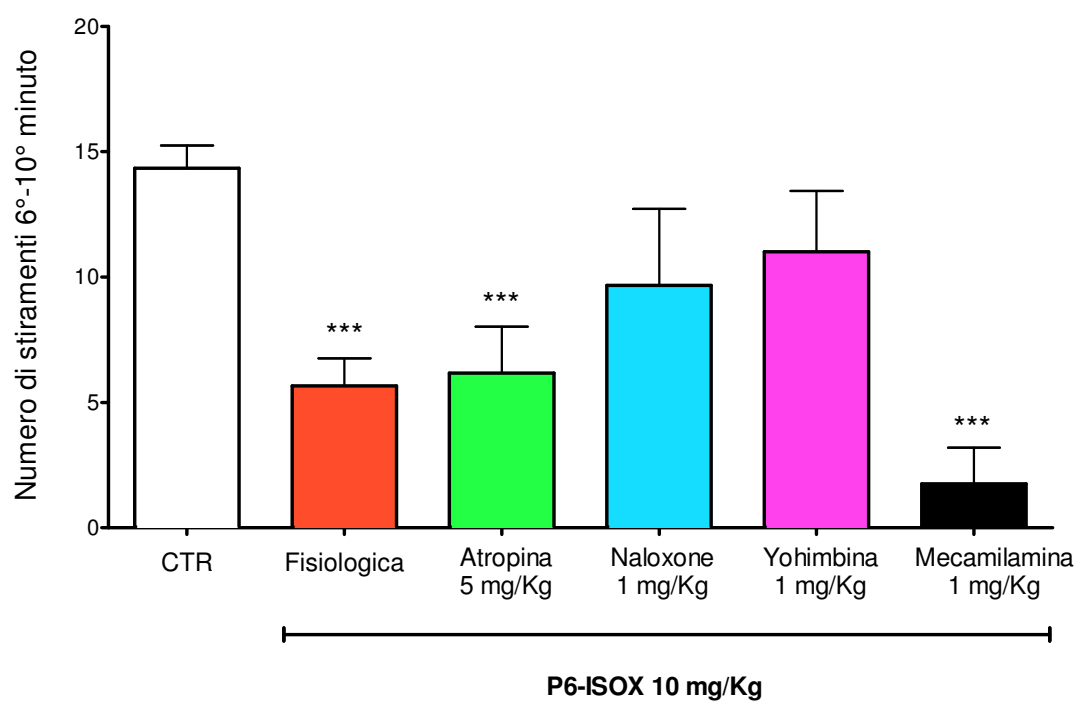


Grafico 19: Attività analgesica, valutata tramite *Writhing test*, del composto P-6-ISOX da solo e in associazione a diversi antagonisti recettoriali.

***= $P < 0.001$, One way ANOVA, Dunnett's post test.

DISCUSSIONE

Durante questo lavoro di tesi sono state valutate diverse serie di composti sintetizzati come ligandi dualsterici preferenziali per il sottotipo recettoriale M₂.

La loro capacità di interagire su più siti del recettore M₂ è stata accertata attraverso studi di legame su proteine recettoriali con mutazioni sito specifiche.

È stato infatti osservato che, in presenza di mutazioni dei residui amminoacidici situati nel sito ortosterico oppure in quello allosterico, gli ibridi presentavano un diverso potere di spiazzamento.

Inoltre mentre gli ibridi mostravano un'affinità ridotta nei confronti di ciascuno dei due tipi di recettori mutati rispetto a quelli wild-type, il progenitore ortosterico perdeva affinità solo per la mutazione al sito ortosterico, così come il W84 e il Nafmetonio mostravano un'affinità ridotta solamente in presenza di mutazioni al dominio allosterico (Antony et al., 2009).

Derivati del Nafmetonio e del W84

I dati raccolti dimostrano che il comportamento degli ibridi in studio (serie **1-9a/b** e **N-9/10-IPER**, **P9/10-IPER**), sia *in vitro* che *in vivo*, è guidato dalla componente ortosterica; infatti, mentre i due modulatori allosterici hanno evidenziato una debole attività antagonista, tutti i derivati di entrambe le serie si sono rivelati degli agonisti muscarinici, nei confronti di tutti e tre i sottotipi recettoriali considerati, seppure meno potenti rispetto al progenitore ortosterico **Iperoxo**. Relativamente alla potenza dei derivati si può osservare, per entrambe le serie, un incremento dei valori di pEC₅₀ con l'allungamento della catena metilenica spaziatrice a 9 e 10 atomi di carbonio, dato che si riflette anche nella potenza analgesica osservata *in vivo*.

In vitro, si può osservare che i valori di attività intrinseca α degli ibridi derivanti dal Nafmetonio tendono ad essere più bassi nei confronti del recettore M₃ rispetto a quelli della serie derivata da W84, dato più evidente per il composto

8b, mentre con l'ulteriore allungamento a 9 e 10 atomi dello spaziatore metilenico questa differenza viene a perdersi.

Tuttavia i dati di pEC₅₀ indicano una scarsa capacità di discriminazione tra i diversi sottotipi recettoriali.

Nonostante questo, *in vivo* i derivati hanno quasi tutti mostrato una buona attività analgesica dose-dipendente, accompagnata da un buon profilo di tollerabilità. In particolare i derivati del Nafmetonio risultano meglio tollerati rispetto ai derivati del W84. La loro somministrazione, a dosi ancora attive, non è infatti accompagnata dai tipici effetti indesiderati dovuti a stimolazione M₃, come diarrea, salivazione, lacrimazione che compaiono nel potente ligando ortosterico **Iperoxo**.

L'aumento della catena metilenica a 9 e 10 atomi ha portato ad un incremento della potenza analgesica, ma anche ad un peggioramento della maneggevolezza dei composti. Infatti per entrambe le serie si assiste ad un incremento nella frequenza di comparsa di effetti indesiderati.

Inoltre si può riscontrare anche l'aumento della comparsa di effetti sedativi: per la serie dei derivati del W84 già il composto **8a** mostra di prolungare in maniera significativa il tempo di immobilità degli animali e diminuire il cammino percorso, così come il composto **P-10-IPER**.

Tra i derivati del Nafmetonio invece compaiono effetti sedativi solamente per gli omologhi a 9 e 10 atomi di carbonio.

L'approfondimento del meccanismo d'azione per il composto **8b** utilizzando specifici antagonisti nel *Writhing test* sembra confermare che l'analgesia di queste due serie di composti sia mediata dai recettori muscarinici periferici.

Il meccanismo d'azione periferico, supposto anche per la presenza di gruppi carichi, che rendono difficoltoso l'accesso al SNC, e per l'assenza di effetti indesiderati come i tremori, potrebbe anche spiegare la mancata efficacia riscontrata per entrambe le serie nell'*Hot plate test*. Infatti questo test misura risposte comportamentali, come saltare o leccarsi le zampe, che coinvolgono circuiti non solo spinali, ma anche sovraspinali complessi, ed è quindi indicativo di un effetto analgesico mediato prevalentemente a livello centrale; è stato riscontrato che agenti caratterizzati da un meccanismo d'azione periferico

possono risultare inattivi nell' inibire le risposte a stimoli termici (Couto et al., 2011; Yaksh and Rudy, 1976).

L'unico composto che ha mostrato di prolungare in maniera statisticamente significativa il tempo di latenza degli animali è stato il **P-10-IPER**; tuttavia la presenza di effetti sedativi riscontrati nell'*Open field test* ha un effetto confondente sulla valutazione dell'efficacia antinocicettiva, per cui è ragionevole pensare che il prolungamento nella risposta sia dovuto alla sedazione dei topolini piuttosto che ad un reale effetto analgesico.

Il composto risultato più interessante in termini di potere analgesico accompagnato dall'assenza di effetti indesiderati M_3 mediati è il derivato **8b**, che ha inoltre mostrato di possedere un buon profilo di tollerabilità anche a livello cardiovascolare.

Da questi dati emerge come lo studio di composti dualsterici possa essere una strategia interessante nell'ambito di nuove terapie per il dolore, che merita di essere ulteriormente approfondita.

I composti sono fino ad ora stati valutati in modelli di dolore acuto, in seguito a somministrazioni singole. Sicuramente alcuni dei composti meritano un approfondimento dello studio al fine di mettere in evidenza gli esiti di un trattamento cronico in termini di efficacia e di eventuali effetti avversi o sviluppo di tolleranza ricorrendo a modelli di dolore di natura diversa come il dolore neuropatico.

Derivati ISOX

Il precursore dell'ultima serie di ibridi in studio, il composto **ISOX**, era stato oggetto di precedenti studi (Barocelli et al., 2001), da cui era emersa la sua azione analgesica potente e dose-dipendente in due diversi modelli sperimentali di dolore, il *Licking test* ed il *Writhing test*. Il suo effetto antinocicettivo è risultato essere sensibile all'atropina, e non antagonizzato da mecamilamina o naloxone, dimostrando quindi un'azione analgesica mediata dai recettori muscarinici e non dai recettori nicotinici o oppioidi.

La sua somministrazione è risultata però essere accompagnata dalla comparsa di effetti indesiderati periferici dovuti ad esempio alla stimolazione dei recettori muscarinici M₃, come ipermotilità intestinale e ipersecrezione delle ghiandole esocrine.

I tre derivati dalla fusione del progenitore ortosterico con la porzione ftalimido-propanica del W84 hanno invece presentato un comportamento inatteso.

Dai dati *in vitro* è infatti emerso come queste molecole siano degli scarsi agonisti muscarinici; inoltre è stato anche evidenziato un inatteso effetto inotropo positivo a livello cardiaco. Queste osservazioni, unite alla totale assenza dei tipici effetti indesiderati dovuti a stimolazione muscarinica quando somministrati *in vivo*, hanno portato a supporre l'interazione di questi ibridi con bersagli recettoriali diversi.

I composti in studio hanno tuttavia mostrato di possedere effetti analgesici evidenziati tramite *Writhing test*, e questo non deve stupire se si pensa alla complessità e alla moltitudine di recettori, mediatori e vie di segnalazione implicate nella trasmissione, percezione e modulazione della sensazione dolorifica.

Il loro comportamento *in vivo* richiama quello dei derivati del W84 e del Nafmetonio; sono infatti risultati nettamente meno potenti rispetto al proprio progenitore ortosterico, e la potenza è leggermente incrementata con l'allungarsi della catena metilenica spaziatrice.

La struttura dei composti, caratterizzata dalla presenza di gruppi carichi, fa supporre che il meccanismo di azione dei tre ligandi sia periferico, ipotesi che è

supportata dall'assenza di tremori negli animali, attribuibile ad una ridotta capacità di accesso al SNC.

Anche per questa serie di ibridi la mancanza di attività mostrata nell'*Hot plate test* può quindi essere spiegata dal fatto che questo test misura risposte comportamentali che coinvolgono i centri cerebrali superiori, e spesso agenti con meccanismo d'azione periferico possono risultare inattivi verso stimoli nocivi di natura termica (Couto et al., 2011; Yaksh and Rudy, 1976).

L'ipotesi che i composti coinvolgano recettori non muscarinici nel produrre analgesia è stata confermata dal *Writhing test* effettuato per il composto **P-6-ISOX** in presenza di antagonisti selettivi. In particolare, mentre l'effetto non risulta antagonizzato dalla co-somministrazione di atropina, è emerso l'interessamento non solo dei recettori oppioidi, ma anche α_2 -adrenergici.

È riportato che agonisti α_2 -adrenergici e oppioidi agiscono in modo sinergico nella modulazione del dolore quando co-somministrati nel midollo spinale.

Infatti utilizzando topi knock out per i recettori α_{2A} è stata osservata la riduzione della sinergia nel produrre effetti analgesici (Stone et al., 1997).

È stato anche osservato in modelli di dolore acuto che la somministrazione di morfina e clonidina produce effetti sinergici nel mediare analgesia, senza un potenziamento negli effetti avversi (Stone et al., 2014)

Anche l'osservazione che l'unico effetto collaterale riscontrato è l'ipotermia, sembra supportare il potenziale coinvolgimento dei recettori α_2 nell'attività dei composti in esame. Infatti è stato dimostrato che la clonidina, agonista α_2 , oltre a possedere effetti analgesici, produce ipotermia, e questo effetto viene annullato dopo somministrazione degli antagonisti α_2 -adrenergici yohimbina e idaxozan (Bhalla et al., 2011); anche altri agonisti α_2 manifestano un'azione antinocicettiva accompagnata da ipotermia come osservato in diversi modelli animali di algesia (Millan et al., 2000). Naturalmente, dal momento che la regolazione della temperatura corporea è modulata da molteplici meccanismi e sono coinvolti differenti recettori, questo aspetto necessita di ulteriori approfondimenti.

Alla luce di questi risultati emerge come lo studio di questi composti debba essere ulteriormente approfondito.

Innanzitutto sarà necessario, ad esempio tramite studi di binding, determinare con quali recettori vadano effettivamente a interagire, per potere meglio definire il loro meccanismo d'azione analgesico.

In secondo luogo sarà importante indagare ulteriormente la maneggevolezza di questi derivati. Infatti, se è vero che questi composti hanno mostrato un buon profilo di tollerabilità, resta da valutare la presenza di eventuali effetti avversi dovuti all'interazione con i diversi recettori.

In particolare, una volta confermato il coinvolgimento dei recettori adrenergici, considerando anche gli effetti inotropi positivi evidenziati dagli studi funzionali *in vitro* è importante verificare l'assenza di ripercussioni negative a livello cardiovascolare, dovute ad esempio all'eventuale interazione con i recettori adrenergici.

In conclusione, tra i diversi derivati in studio gli ibridi più promettenti, come il composto **8b** o il composto **P-6-ISOX**, hanno mostrato una buona attività analgesica in un modello di dolore acuto, il *Writhing test*, in assenza di effetti sedativi o altri effetti indesiderati.

La sintesi di questi derivati bisammonioalcanici ha quindi rappresentato un primo approccio innovativo che pone le basi per lo studio dei ligandi dualsterici come possibile strategia terapeutica nell'ambito del dolore, per poter avere un buon rapporto tra efficacia terapeutica e tollerabilità.

BIBLIOGRAFIA

Abadir AR, Kraynack BJ, Mayda J 2nd, Gintautas J. Postherpetic neuralgia: response to topical clonidine. *ProcWestPharmacolSoc.* 1996;39:47-8.

Antony J, Kellershohn K, Mohr-Andrä M, Kebig A, Prilla S, Muth M, Heller E, Disingrini T, Dallanoe C, Bertoni S, Schrobang J, Tränkle C, Kostenis E, Christopoulos A, Höltje HD, Barocelli E, De Amici M, Holzgrabe U, Mohr K. Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. *FASEBJ.* 2009;23(2):442-50.

Barocelli E, Ballabeni V, Bertoni S, Dallanoe C, De Amici M, De Micheli C, Impicciatore M. New analogues of oxotremorine and oxotremorine-M: estimation of their in vitro affinity and efficacy at muscarinic receptor subtypes. *LifeSci.* 2000;67(6):717-23.

Barocelli E, Ballabeni V, Bertoni S, De Amici M, Impicciatore M. Evidence for specific analgesic activity of a muscarinic agonist selected among a new series of acetylenic derivatives. *LifeSci.* 2001;68(15):1775-85.

Bartolini A, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C. Analgesic and antineuropathic drugs acting through central cholinergic mechanisms. *RecentPatCNSDrugDiscov.* 2011;6(2):119-40.

Bartolini A, Ghelardini C, Fantetti L, Malcangio M, Malmberg-Aiello P, Giotti A. Role of muscarinic receptor subtypes in central antinociception. *BrJPharmacol.* 1992;105(1):77-82.

Bear M, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscienze.* 2007 III ed. Masson-Edra.

Bennett AD, Everhart AW, Hulsebosch CE. Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury. *BrainRes.* 2000;859(1):72-82.

Bernardini N, Reeh PW, Sauer SK. Muscarinic M₂ receptors inhibit heat-induced CGRP release from isolate dratskin. *Neuroreport* 2001;12(11):2457-60.

Bernardini N, Roza C, Sauer SK, Gomeza J, Wess J, Reeh PW. Muscarinic M₂ receptors on peripheral nerve endings: a molecular target of antinociception. *JNeurosci.* 2002;22(12):RC229.

Bhalla S, Andurkar SV, Gulati A. Study of adrenergic, imidazoline, and endothelin receptors in clonidine-, morphine-, and oxycodone-induced changes in rat body temperature. *Pharmacology.* 2011;87(3-4):169-79.

Bleakman D, Alt A, Nisenbaum ES. Glutamate receptors and pain. *SeminCellDevBiol.* 2006;17(5):592-604.

Bodick NC, Offen WW, Levey AI, Cutler NR, Gauthier SG, Satlin A, Shannon HE, Tollefson GD, Rasmussen K, Bymaster FP, Hurley DJ, Potter WZ, Paul SM. Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *ArchNeurol.* 1997;54(4):465-73.

Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *EurJPain.* 2006;10(4):287-333.

Breivik H, Eisenberg E, O'Brien T. The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. *BMCPublicHealth*. 2013;13:1229.

Byas-Smith MG, Max MB, Muir J, Kingman A. Transdermal clonidine compared to placebo in painful diabetic neuropathy using a two-stage 'enriched enrollment' design. *Pain*. 1995;60(3):267-74.

Chen SR, Pan HL. Spinal GABA_B receptors mediate antinociceptive actions of cholinergic agents in normal and diabetic rats. *BrainRes*. 2003;965(1-2):67-74.

Chen SR, Pan HM, Richardson TE, Pan HL. Potentiation of spinal alpha(2)-adrenoceptor analgesia in rats deficient in TRPV1-expressing afferent neurons. *Neuropharmacology*. 2007;52(8):1624-30.

Chen SR, Wess J, Pan HL. Functional activity of the M₂ and M₄ receptor subtypes in the spinal cord studied with muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *JPharmacolExpTher*. 2005;313(2):765-70.

Christoph T, Reissmüller E, Schiene K, Englberger W, Chizh BA. Antiallodynic effects of NMDA glycine(B) antagonists in neuropathic pain: possible peripheral mechanisms. *BrainRes*. 2005;1048(1-2):218-27.

Christopoulos A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *NatRevDrugDiscov*. 2002;1(3):198-210.

Cocito D, Peci E, Ciaramitaro P, Merola A, Lopiano L. Short-term efficacy of ultramicronized palmitoylethanolamide in peripheral neuropathic pain. *PainResTreat*. 2014;2014:854560.

Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G. Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *BrJPharmacol.* 2002;135(1):181-7.

Couto VM, Vilela FC, Dias DF, Dos Santos MH, Soncini R, Nascimento CG, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. *JEthnopharmacol.* 2011;134(2):348-53.

Dallanoe C, Conti P, De Amici M, De Micheli C, Barocelli E, Chiavarini M, Ballabeni V, Bertoni S, Impicciatore M. Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *BioorgMedChem.* 1999;7(8):1539-47.

Disingrini T, Muth M, Dallanoe C, Barocelli E, Bertoni S, Kellershohn K, Mohr K, De Amici M, Holzgrabe U. Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *JMedChem.* 2006;49(1):366-72.

Dussor GO, Helesic G, Hargreaves KM, Flores CM. Cholinergic modulation of nociceptive responses in vivo and neuropeptide release in vitro at the level of the primary sensory neuron. *Pain.* 2004;107(1-2):22-32.

Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *MolPharmacol.* 2002;62(5):1084-93.

Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *JPharmacolExpTher.* 1953;107(3):385-93.

Eisenach JC, Detweiler DJ, Tong C, D'Angelo R, Hood DD. Cerebrospinal fluid norepinephrine and acetylcholine concentrations during acute pain. *AnesthAnalg.* 1996;82(3):621-6.

Eisenberg E, LaCross S, Strassman AM. The clinically tested N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine blocks and reverses thermal hyperalgesia in a rat model of painful mononeuropathy. *NeurosciLett.* 1995;187(1):17-20.

Ellis JL, Harman D, Gonzalez J, Spera ML, Liu R, Shen TY, Wypij DM, Zuo F. Development of muscarinic analgesics derived from epibatidine: role of the M₄ receptor subtype. *JPharmacolExpTher.* 1999;288(3):1143-50.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *BiochemPharmacol.* 1961;7:88-95.

Fang L, Jumpertz S, Zhang Y, Appenroth D, Fleck C, Mohr K, Tränkle C, Decker M. Hybrid molecules from xanomeline and tacrine: enhanced tacrine actions on cholinesterases and muscarinic M₁ receptors. *JMedChem.* 2010;53(5):2094-103.

Farquhar-Smith WP, Rice AS. A novel neuroimmune mechanism in cannabinoid-mediated attenuation of nerve growth factor-induced hyperalgesia. *Anesthesiology.* 2003;99(6):1391-401.

Fiorino DF, Garcia-Guzman M. Muscarinic Pain Pharmacology: realizing the Promise of Novel Analgesics by Overcoming Old Challenges. *HandbExpPharmacol.* 2012;208:191-221.

Franco AC, Prado WA. Antinociceptive effects of stimulation of discrete sites in the rat hypothalamus: evidence for the participation of the lateral hypothalamus area in descending pain suppression mechanisms. *MedBiolRes.* 1996;29(11):1531-41.

Galeotti N, Bartolini A, Ghelardini C. Ryanodine receptors are involved in muscarinic antinociception in mice. *BehavBrainRes.* 2005;164(2):165-71.

Galeotti N, Bartolini A, Ghelardini C. The phospholipase C-IP₃ pathway is involved in muscarinic antinociception. *Neuropsychopharmacology.* 2003;28(5):888-97.

Gatti A, Lazzari M, Gianfelice V, Di Paolo A, Sabato E, Sabato AF. Palmitoylethanolamide in the treatment of chronic pain caused by different etiopathogenesis. *PainMed.* 2012;13(9):1121-30.

Gebhart GF. Descending modulation of pain. *NeurosciBiobehavRev.* 2004;27(8):729-37.

George R, Haslett WL, Jenden DJ. The central action of a metabolite of tremorine. *LifeSci* 1962;1:361-3.

Ghelardini C, Galeotti N, Bartolini A. Loss of muscarinic antinociception by antisense inhibition of M₁ receptors. *BrJPharmacol.* 2000;129(8):1633-40.

Guimarães AP, Guimarães FS, Prado WA. Modulation of carbachol-induced antinociception from the rat periaqueductal gray. *BrainResBull.* 2000;51(6):471-8.

Hallek M, Szinicz L. Effects of some mono- and bisquaternary ammonium compounds on the reactivatability of soman-inhibited human acetylcholinesterase in vitro. *BiochemPharmacol.* 1988;37(5):819-25.

Helyes Z, Németh J, Thán M, Bölcskei K, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *LifeSci*. 2003;73(18):2345-53.

Incerti M, Flammini L, Saccani F, Morini G, Comini M, Coruzzi M, Barocelli E, Ballabeni V, Bertoni S. Dual-acting drugs: an in vitro study of nonimidazole histamine H₃ receptor antagonists combining anticholinesterase activity. *ChemMedChem*. 2010;5(7):1143-9.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principi di neuroscienze. 2003 Casa editrice ambrosiana.

Keov P, López L, Devine SM, Valant C, Lane JR, Scammells PJ, Sexton PM, Christopoulos A. Molecular mechanisms of bitopic ligand engagement with the M₁ muscarinic acetylcholine receptor. *JBiolChem*. 2014;289(34):23817-37.

Kiefer RT, Rohr P, Ploppa A, Dieterich HJ, Grothusen J, Koffler S, Altemeyer KH, Unertl K, Schwartzman RJ. Efficacy of ketamine in anesthetic dosage for the treatment of refractory complex regional pain syndrome: an open-label phase II study. *PainMed*. 2008;9(8):1173-201.

Koster R, Anderson M, Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *FederationProceedings*, 1959;18:412–416.

Mannion RJ, Woolf CJ. Pain mechanisms and management: a central perspective. *ClinJPain*. 2000;16:S144-56.

Mao J, Price DD, Hayes RL, Lu J, Mayer DJ, Frenk H. Intrathecal treatment with dextrorphan or ketamine potently reduces pain-related behaviors in a rat model of peripheral mononeuropathy. *BrainRes*. 1993 Mar 5;605(1):164-8.

Matera C, Flammini L, Quadri M, Vivo V, Ballabeni V, Holzgrabe U, Mohr K, De Amici M, Barocelli E, Bertoni S, Dallanocce C. Bis(ammonio)alkane-type agonists of muscarinic acetylcholine receptors: synthesis, in vitro functional characterization, and in vivo evaluation of their analgesic activity. *EurJMedChem.* 2014;75:222-32.

Millan MJ, Dekeyne A, Newman-Tancredi A, Cussac D, Audinot V, Milligan G, Duqueyroix D, Girardon S, Mullot J, Boutin JA, Nicolas JP, Renouard-Try A, Lacoste JM, Cordi A. S18616, a highly potent, spiroimidazoline agonist at alpha(2)-adrenoceptors: I. Receptor profile, antinociceptive and hypothermic actions in comparison with dexmedetomidine and clonidine. *JPharmacolExpTher.* 2000;295(3):1192-205.

Mohr K, Tränkle C, Kostenis E, Barocelli E, De Amici M, Holzgrabe U. Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise. *BrJPharmacol.* 2010;159(5):997-1008.

Mulugeta E, El-Bakri N, Karlsson E, Elhassan A, Adem A. Loss of muscarinic M₄ receptors in spinal cord of arthritic rats: implications for a role of M₄ receptors in pain response. *BrainRes.* 2003;982(2):284-7.

Muth M, Sennwitz M, Mohr K, Holzgrabe U. Muscarinic allosteric enhancers of ligand binding: pivotal pharmacophoric elements in hexamethonio-type agents. *JMedChem.* 2005;48(6):2212-7.

Oliveira MA, Prado WA. Antinociception and behavioral manifestations induced by intracerebroventricular or intra-amygdaloid administration of cholinergic agonists in the rat. *Pain.* 1994;57(3):383-91.

Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *NatRevDrugDiscov.* 2006;5(12):993-6.

Pan HL, Chen SR, Eisenach JC. Intrathecal clonidine alleviates allodynia in neuropathic rats: interaction with spinal muscarinic and nicotinic receptors. *Anesthesiology*. 1999;90(2):509-14.

Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *PharmacolTher*. 2008;117(1):141-61.

Phan NQ, Siepmann D, Gralow I, Ständer S. Adjuvant topical therapy with a cannabinoid receptor agonist in facial postherpetic neuralgia. *JDtschDermatolGes*. 2010;8(2):88-91.

Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of pain*. New York: Churchill Livingstone. 1999:11–57.

Reynolds DV. Surgery in the Rat during Electrical Analgesia Induced by Focal Brain Stimulation. *Science*. 1969;164(3878):444-5.

Schmitz J, van der Mey D, Bermudez M, Klöckner J, Schrage R, Kostenis E, Tränkle C, Wolber G, Mohr K, Holzgrabe U. Dualsteric muscarinic antagonists-orthosteric binding pose controls allosteric subtype selectivity. *JMedChem*. 2014;57(15):6739-50.

Schnitzler A, Ploner M. Neurophysiology and functional neuroanatomy of pain perception. *JClinNeurophysiol*. 2000;17(6):592-603.

Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, Lienemann J, Dubé S, Mallinckrodt C, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC. Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *AmJPsychiatry*. 2008;165(8):1033-9.

Sikandar S, Dickenson AH. Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2012;6(1):17-26.

Stone LS, German JP, Kitto KF, Fairbanks CA, Wilcox GL. Morphine and clonidine combination therapy improves therapeutic window in mice: synergy in antinociceptive but not in sedative or cardiovascular effects. *PLoS One*. 2014;9(10):e109903.

Stone LS, MacMillan LB, Kitto KF, Limbird LE, Wilcox GL. The alpha2a adrenergic receptor subtype mediates spinal analgesia evoked by alpha2 agonists and is necessary for spinal adrenergic-opioid synergy. *J Neurosci*. 1997;17(18):7157-65.

Suzuki R, Matthews EA, Dickenson AH. Comparison of the effects of MK-801, ketamine and memantine on responses of spinal dorsal horn neurones in a rat model of mononeuropathy. *Pain*. 2001;91(1-2):101-9.

Szczudlik A, Dobrogowski J, Wordliczek J, Stępień A, Krajnik M, Leppert W, Woron J, Przeklasa-Muszyńska A, Kocot-Kępska M, Zajączkowska R, Janecki M, Adamczyk A, Malec-Milewska M. Diagnosis and management of neuropathic pain: Review of literature and recommendations of the Polish Association for the Study of Pain and the Polish Neurological Society. *Neurol Neurochir Pol*. 2014;48(6):423-435.

Tränkle C, Andresen I, Lambrecht G, Mohr K. M₂ receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: possible involvement of the common allosteric site. *Mol Pharmacol*. 1998;53(2):304-12.

Valant C, May LT, Aurelio L, Chuo CH, White PJ, Baltos JA, Sexton PM, Scammells PJ, Christopoulos A. Separation of on-target efficacy from adverse effects through rational design of a bitopic adenosine receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(12):4614-9.

Valant C, Sexton PM, Christopoulos A. Orthosteric/allosteric bitopic ligands: going hybrid at GPCRs. *MolInterv.* 2009;9(3):125-35.

van Hecke O, Torrance N, Smith BH. Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. *BrJAnaesth.* 2013;111(1):13-8.

van Rossum J, van den Brink F. Cumulative dose-response curves. I. Introduction to the technique. *ArchIntPharmacodynTher.* 1963;143:240-6.

Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje HD, Mohr K. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₅ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *MolPharmacol.* 2003;64(1):21-31.

Wallace MS, Rowbotham MC, Katz NP, Dworkin RH, Dotson RM, Galer BS, Rauck RL, Backonja MM, Quessy SN, Meisner PD. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a glycine antagonist in neuropathic pain. *Neurology.* 2002;59(11):1694-700.

Wess J. Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *TrendsPharmacolSci.* 2003;24(8):414-20.

Yaksh TL, Rudy TA. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science.* 1976;192(4246):1357-8.

Zhou HY, Chen SR, Pan HL. Targeting N-methyl-D-aspartate receptors for treatment of neuropathic pain. *ExpertRevClinPharmacol.* 2011;4(3):379-88

Pubblicazioni e partecipazioni a congressi

Matera C, Flammini L, Quadri M, Vivo V, Ballabeni V, Holzgrabe U, Mohr K, De Amici M, Barocelli E, Bertoni S, Dallanoce C. Bis(ammonio)alkane-type agonists of muscarinic acetylcholine receptors: synthesis, in vitro functional characterization, and in vivo evaluation of their analgesic activity. EurJMedChem. 2014;75:222-32.

Bertoni S, Arcaro V, Vivo V, Rapalli A, Tognolini M, Cantoni AM, Saccani F, Flammini L, Domenichini G, Ballabeni V, Barocelli E. Suppression of inflammatory events associated to intestinal ischemia-reperfusion by 5-HT_{1A} blockade in mice. PharmacolRes. 2014;81:17-25.

XVII Seminario Nazionale Società Italiana Farmacologia Dottorandi ed Assegnisti di Ricerca

Rimini 15-18 Settembre 2014

“New hybrid muscarinic agonists: in vitro functional characterization and in vivo analgesic activity evaluation”

XXXVI Congresso della Nazionale Società Italiana Farmacologia

Torino, 23-26 Ottobre 2013

“Role of 5-HT in intestinal ischemia-reperfusion: suppression of inflammatory events by 5-HT_{1A} blockade in mice”

XVI Seminario Nazionale Società Italiana Farmacologia Dottorandi ed Assegnisti di Ricerca

Rimini, 16-19 Settembre 2012

“Preliminary study of metabolic and behavioural effects induced by Monosodium glutamate and Inosine 5'-monophosphate subchronic intake by C57BL6/J mice”