



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

Scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche

XXIV Ciclo – a.a. 2010/2011

**BIODISPONIBILITÀ E FARMACOCINETICHE NELLO
STUDIO DEL PROFILO FARMACOLOGICO DI MOLECOLE
AD AZIONE CANNABINOIDERGICA**

Settore scientifico disciplinare di afferenza

BIO/14 Farmacologia

Presentata da: Dott. Giuseppe Peddio

Coordinatore Dottorato: Prof. ssa Alessandra Concas

Tutor/Relatore: Prof. Walter Fratta

Esame finale anno accademico 2010 - 2011

*A chi ha creduto in me
A chi ancora ci crede
A chi ci crederà*

Prefazione

Lo studio presentato in questo lavoro di tesi, nasce dall'esigenza di innovazione e dalla necessità di trovare valide alternative ai farmaci attualmente in commercio per la cura di diverse tipi di patologie. Il lavoro, che si colloca nell'ambito del progetto Cannabinoidi e Obesità, risulta essere variamente articolato e si compenetra di nozioni e competenze che spaziano dalla Chimica, alla Farmaceutica, alla Farmacologia e non in ultimo alle Neuroscienze. Il lavoro è stato inteso e sviluppato come un'occasione di confronto, come punto di arrivo e di partenza nello studio di nuovi farmaci. Inoltre questo sistema organizzato ha permesso di seguire le orme che ogni nuovo farmaco deve ricalcare in molte delle fasi della ricerca pre-clinica. Queste ultime rappresenteranno la carta d'identità del farmaco e come tali saranno decisive per stabilire la sua adeguatezza alle successive fasi sperimentali fino all'eventuale entrata in commercio. La forza di questa tesi è data anche dal lavoro di squadra, dove ciascuno con le proprie competenze ha dato un contributo sostanziale alla crescita e allo scambio culturale e umano.

L'indagine prende il via dalla letteratura specialistica, passando per studi di relazione struttura attività, per poi approdare alla sintesi dei nuovi derivati. Le molecole ottenute, sono state caratterizzate attraverso diverse tecniche spettroscopiche e spettrometriche e successivamente ne sono state indagate le proprietà farmaco-recettoriali. In ultimo, i farmaci sono stati testati in vivo permettendo l'approfondimento delle conoscenze relative alla loro distribuzione nell'organismo e alla farmacocinetica.

Indice

1. Introduzione	10
1.1. La <i>Cannabis sativa</i> L. e i cannabinoidi	10
1.2. Il sistema endocannabinoide	13
1.3. Cannabinoidi e obesità	21
2. Sintesi	26
2.1. Rimonabant e sostituenti	26
2.2. Sintesi dei derivati NESS006A e NESS014A	28
3. Caratterizzazione e analisi qualitativa	30
3.1. Spettroscopia infrarossa	31
3.1.1. IR Rimonabant, NESS006A, NESS014A	32
3.2. Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)	36
3.2.1. NMR Rimonabant, NESS006A, NESS014A	37
3.3. Spettrometria di massa	48
3.3.1. Strumentazione	49
3.3.2. Lo spettro di massa	52
3.3.3. Q-micro triplo quadrupolo	52
3.3.4. Analisi qualitativa	54
3.3.5. Spettrometria di massa Rimonabant, NESS006A, NESS014A	55
4. Binding	64
5. Test <i>ex vivo</i>: Organi Isolati	66

6. Biodisponibilità e farmacocinetiche	72
6.1. Procedura Sperimentale	73
6.1.1. Animali e Chirurgia	73
6.1.2. Raccolta dei campioni	73
6.1.3. Soluzioni	74
6.1.4. Processamento campioni	74
6.1.4.1. Procedura di estrazione dei campioni di siero	75
6.1.4.2. Procedura di estrazione dei campioni di cervello	75
6.2. Analisi quantitativa	76
6.2.1. Metodo Cromatografico	77
6.2.2. Metodo MS/MS	77
6.2.3. Validazione metodo	78
6.2.3.1. Specificità	78
6.2.3.2. Limite di quantificazione	80
6.2.3.3. Limite di rilevabilità	84
6.2.3.4. Accuratezza e precisione	84
6.2.3.5. Linearità	84
6.2.3.6. Recovery e effetto matrice	85
6.2.3.7. Carry over	85
6.2.3.8. Monitoraggio metodo validato	85
6.3. Curve concentrazione/tempo	87
6.3.1. Siero curve concentrazione/tempo	87
6.3.2. Cervello curve concentrazione/tempo	89
6.4. Farmacocinetica	91
7. Materiali e metodi	93

8. Conclusioni	95
9. Bibliografia	97
10. Ringraziamenti	103

1. Introduzione

1.1. La *Cannabis sativa* L. e i cannabinoidi

I cannabinoidi sono un gruppo di composti derivati dalla *Cannabis sativa* L., comunemente conosciuta come Marijuana e utilizzata per molti secoli come droga o come agente terapeutico (1).

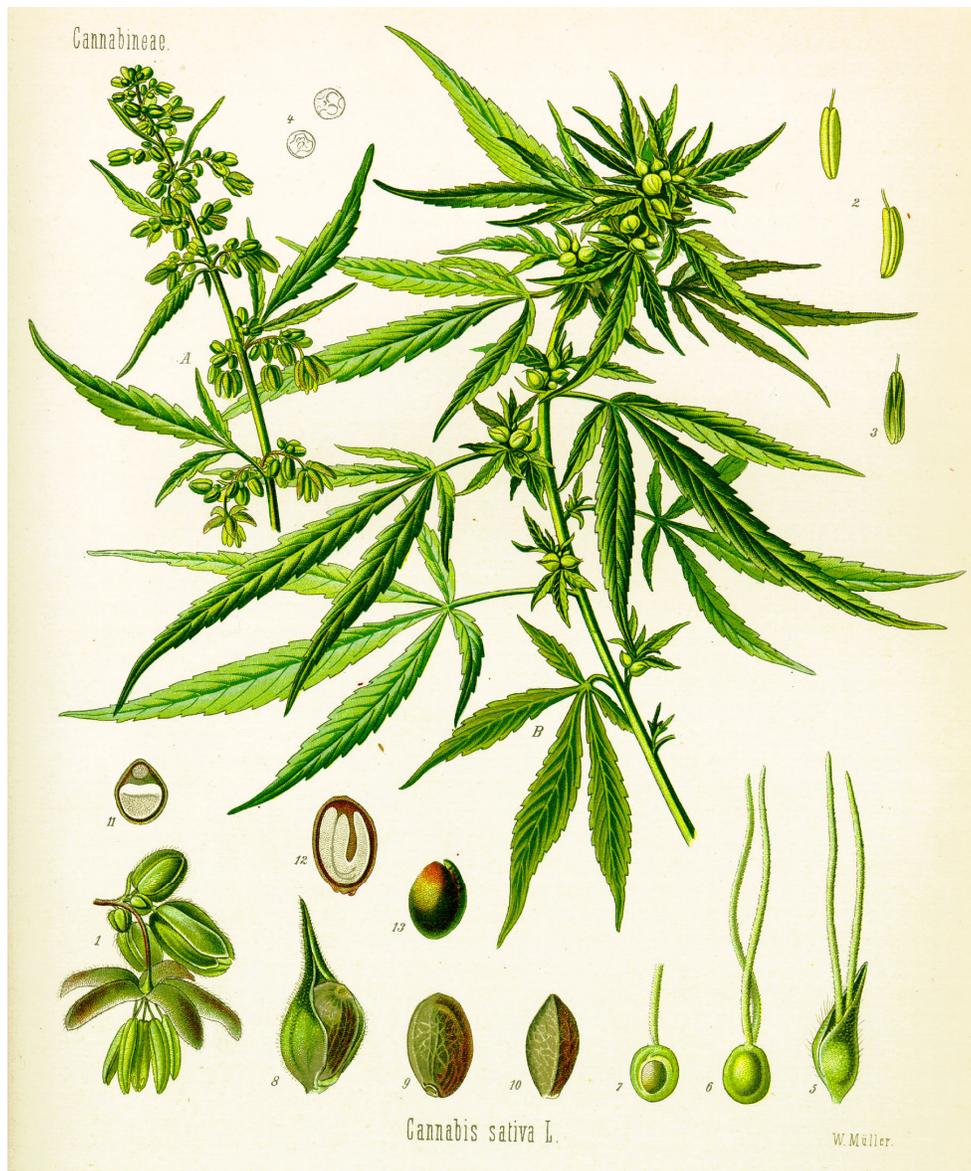


Figura.1 Rappresentazione della *Cannabis sativa* L. di W. Müller.

La cosiddetta *Cannabis* consiste nelle parti aeree della *Cannabis sativa* L. (Cannabidaceae). La pianta è annuale e cresce sia con l'apparato riproduttivo femminile che maschile e viene coltivata nelle zone tropicali e temperate per ricavare le fibre e i semi dai quali viene estratto il 30-35% degli oli per uso industriale (2). Le prime testimonianze sulle proprietà medicinali della *Cannabis*, sono relative a circa 5000 anni fa (2) e, benché non si abbia una precisa documentazione storica nei secoli successivi, si ritiene che il suo uso come sostanza psicotropa abbia subito una progressiva diffusione dalla Cina all'India e quindi all'Africa Settentrionale (3). L'uso della *Cannabis* come sostanza psicomimetica fu introdotto in Europa in tempi più recenti, probabilmente ad opera di Napoleone, che, interessato alle sue proprietà analgesiche e sedative, favorì la diffusione della *Cannabis indica* L., più ricca di principi attivi stupefacenti rispetto alla specie *sativa*, che era invece maggiormente diffusa in Europa. Il primo a dimostrare scientificamente e a divulgare il valore curativo della *Cannabis* fu Sir William B. O'Shaughnessy intorno al 1840 (4). In seguito, fino agli inizi del XX secolo, in Europa e negli Stati Uniti vennero pubblicati numerosi articoli sui molteplici usi medicinali della specie. Agli inizi del 1900 il suo uso raggiunse una tale diffusione da essere inserita nella farmacopea ufficiale americana. Nel 1937, però, in seguito ad una campagna diffamatoria volta a proteggere forti interessi economici minacciati dalle sue vaste applicazioni industriali, negli USA venne inserita nell'elenco degli stupefacenti, perciò la coltivazione e l'uso, anche a scopo terapeutico, diventarono illegali. Di conseguenza anche in Europa l'utilizzo diminuì drasticamente ed anche il numero di pubblicazioni sull'argomento si ridusse fino ad azzerarsi per interi decenni (1, 5). A tutt'oggi i derivati cannabinoidegici sono inseriti nella Farmacopea Ufficiale Italiana

nella Tabella 7, sottotabella II sezione B e possono essere utilizzati dal “farmacista che allestisce e dispensa preparazioni magistrali a base dei farmaci compresi nella presente tabella, da soli o in associazione con altri farmaci non stupefacenti, dietro presentazione di ricetta da rinnovarsi volta per volta” (6).

Nonostante l’antichissima esperienza dell’uomo riguardo gli effetti della *Cannabis*, le conoscenze chimiche e fisiologiche relative ai cannabinoidi sono relativamente recenti. Sono stati individuati almeno 66 composti cannabinoidi, detti fitocannabinoidi, nella marijuana, tra i quali i tetraidrocannabinoli (THC) ed in particolare il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (Δ^9 -THC), isolato nel 1964 da Gaoni e Mechoulam, sono considerati i più attivi (1,5).

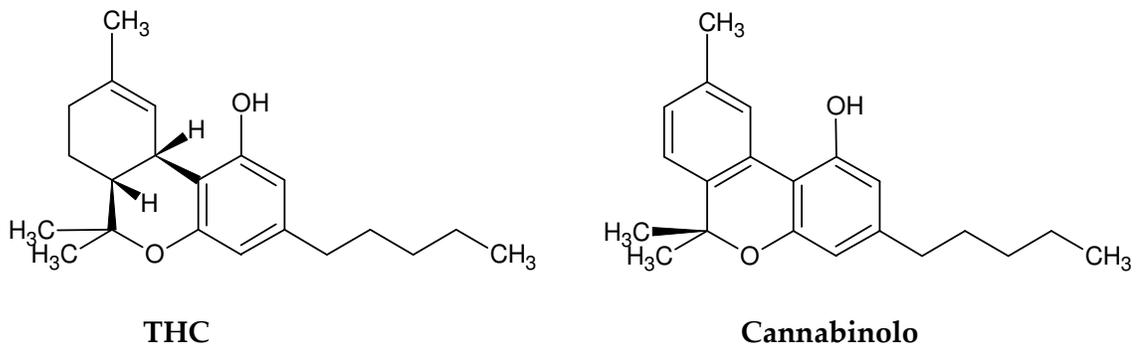


Figura.2 Struttura chimica di alcuni dei più rappresentativi cannabinoidi estratti dalla *Cannabis*.

La presenza del Δ^9 -THC nelle parti aeree delle piante è appunto la ragione dell’uso illegale della *Canapa indiana*. Il modo più comune di somministrazione è attraverso il fumo di sigarette alla *Cannabis* attraverso il quale viene assorbito il 20% del contenuto di principio attivo. I suoi effetti inebrianti inducono uno stato in cui la persona appare rilassata e

mediamente euforica, ma con alterazioni percettive, che possono includere distorsioni temporali, uditive e visive e un rallentamento delle funzioni cognitive (7). Tra le potenziali proprietà medicinali e terapeutiche, quelle che hanno suscitato interesse vertono sull'analgesia, l'attenuazione della nausea e del vomito durante la chemioterapia, le proprietà antireumatiche e antipiretiche, l'asma, attività sulla motilità intestinale, sulla regolazione dell'appetito ecc... . L'interazione dei recettori per i cannabinoidi con i ligandi come il THC, inoltre, provocano il rilascio di dopamina a livello del sistema limbico di gratificazione (8).

1.2. Il sistema endocannabinoide

Ai cannabinoidi sono correlate le proprietà che hanno portato all'uso della marijuana come agente terapeutico di origine naturale, come l'effetto analgesico, l'attività antinfiammatoria, la riduzione della pressione sanguigna ed intraoculare, l'attività antiemetica, ma anche gli effetti negativi, con particolare riferimento alla distorsione psicologica della percezione, alla perdita della coordinazione motoria, all'euforia e all'effetto sedativo. In seguito a numerosi studi, negli anni '90, si arrivò finalmente all'identificazione dei recettori per i cannabinoidi a cui poi seguirono la scoperta degli endocannabinoidi e la sintesi di composti agonisti e antagonisti selettivi.

Le due famiglie di recettori isolate sono quella dei CB₁ e dei CB₂ che hanno rispettivamente una prevalente distribuzione a livello del sistema nervoso centrale (SNC) e periferico (SNP).

I recettori CB₁ sono presenti in differenti specie di mammiferi e nell'uomo in particolare sono distribuite in modo più significativo in alcune zone cerebrali come ad esempio i gangli della base, il cervelletto, l'ippocampo e la corteccia. Una minore concentrazione è invece localizzata in altre aree per esempio nel tronco cerebrale dove sono localizzati i centri regolatori della respirazione e della funzione cardiaca. Basse densità recettoriali sono state identificate anche in alcuni tessuti periferici. I recettori CB₁ sono stati identificati come appartenenti ai recettori accoppiati a proteina G, costituiti da sette segmenti transmembrana e con le porzioni C-terminale e N-terminale intracellulari. I recettori CB₁ hanno un ruolo chiave sulla trasduzione del segnale, in particolare l'interazione tra recettore associato a proteina G inibitore e il ligando cannabinoidergico, causa inibizione dell'adenilato ciclasi, dei canali al calcio N e P/Q, attiva quelli al potassio e stimola le MAP kinasi. Anche i recettori CB₂ sono recettori associati a proteina G e sono principalmente distribuiti a livello della milza, tonsille e nelle cellule immunitarie, nelle terminazioni nervose periferiche, nelle cellule tumorali, abbondantemente nei vari tipi di cellule infiammatorie e, recentemente, sono stati identificati nel sistema nervoso centrale (cellule gliali e neuronali) (4, 9). Il recettore CB₂ è come il CB₁ in grado di modulare l'adenilato ciclasi inibendola e la MAP kinasi attivandola (2, 5, 7). Esistono evidenze dell'esistenza di altri recettori o sottotipi recettoriali di tipo cannabinoidi nel SNC detti recettore CB₃ o NON-CB₁ NON-CB₂ (8, 10).

Lo studio degli effetti biofarmacologici dei cannabinoidi ha evidenziato la presenza di un sistema cannabinoido endogeno (ECS) nell'organismo umano, costituito dai recettori CB₁ e CB₂ sopra citati, oltre che dai ligandi endogeni per questi recettori, l'anandamide (AEA)

e il 2-arachidonil-glicerolo (2-AG), detti appunto endocannabinoidi, e dalle loro molteplici vie metaboliche per la sintesi, la degradazione ed il reuptake. La produzione degli endocannabinoidi avviene all'interno delle cellule neuronali, indotta, prevalentemente, da elevate concentrazioni intracellulari di Ca^{2+} (come per esempio durante la depolarizzazione della membrana postsinaptica), anche se sono stati proposti dei meccanismi Ca^{2+} indipendenti, quali l'attivazione dei recettori metabotropici del glutammato e dell'acetilcolina (11). Per quanto riguarda la secrezione di entrambi i mediatori, in particolare, non avverrebbe in seguito ad accumulo in vescicole sinaptiche, ma passivamente o attraverso il legame con alcune proteine. Il recupero potrebbe essere dovuto all'intervento di un classico meccanismo mediato da un trasportatore di membrana, che sarebbe confermato dal comportamento riscontrato in seguito a somministrazione di un inibitore, l'AM404, che causa un aumento sensibile della concentrazione di AEA nello spazio intersinaptico (7).

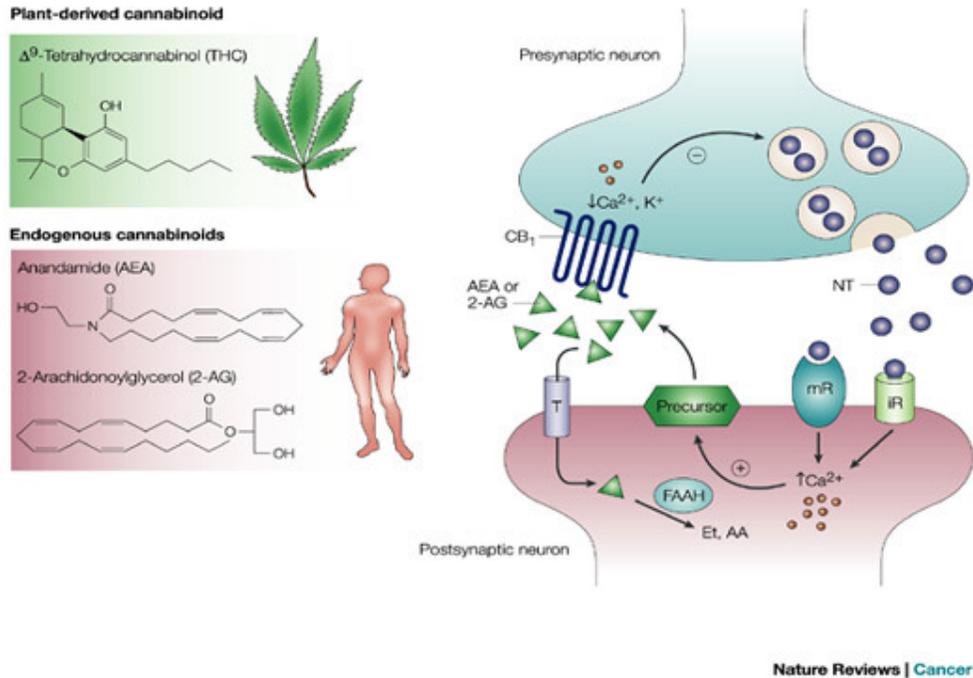


Figura.3 Ligandi endogeni e naturali, schematizzazione del sistema recettoriale cannabinoide (12)

I cannabinoidi esogeni derivati dalle piante e quelli sintetizzati chimicamente, sono stati importanti per scoprire i bersagli, a cui la scoperta del Δ^9 -THC ha gettato le basi, per l'identificazione dei substrati endogeni nell'organismo (9). Recentemente sono stati identificati nuovi potenziali endocannabinoidi tra i quali la virodamina il noladin-etene e l'*N*-arachidonoildopamina (11). Il sistema endocannabinoide è coinvolto in molteplici sistemi di controllo e di adattamento dell'organismo e ha in generale una funzione di riequilibrio dell'organismo in risposta a perturbazioni o stress.

Sulla base di quanto noto si può ipotizzare un ruolo centrale in numerose funzioni (1, 9, 13):

- Coinvolgimento nei meccanismi che modulano l'appetito, aspetto che è stato recentemente evidenziato da un significativo aumento dei livelli di endocannabinoidi in tre differenti modelli animali di obesità. Questi effetti potrebbero essere spiegati con l'interazione del sistema cannabinoide con i più importanti sistemi neurotrasmettitoriali e vie metaboliche che sono coinvolte nel controllo del consumo di cibo.
- Stimolazione del sistema neuronale mesolimbico dopaminergico che si trova alla base del circuito che regola l'azione dei farmaci d'abuso ed in particolare della nicotina. I risultati ottenuti sui recettori CB₁ suggeriscono che il sistema cannabinoide incrementa la predisposizione o sensibilità della specie animale all'assunzione di nicotina o etanolo. Per questo motivo l'utilizzo di antagonisti potrebbe essere un valido aiuto per la disassuefazione da fumo e per il trattamento dell'alcolismo.
- Coinvolgimento nei processi che regolano la memoria con particolare attenzione alla fase di estinzione di memorie avverse. E' stato infatti dimostrato come l'assunzione di Δ^9 -THC incrementi i processi di memorizzazione e consolidi la capacità di imparare nei roditori. Questi effetti sembrano essere mediati dai recettori CB₁.
- Modulazione della spasticità associata alla sclerosi multipla.
- Attività analgesica degli endocannabinoidi e le loro interazioni sinergiche con il sistema degli oppioidi endogeni.

- Regolazione dei circuiti cerebrali del vomito con conseguenti proprietà antiemetiche.
- Proprietà anticonvulsivanti. In particolare l'anandamide si è rivelata efficace in un modello animale di epilessia, indicando che probabilmente l'attività convulsiva è modulata dal tono del sistema cannabinoide endogeno.
- Azione vasodilatatoria e ipotensiva nella genesi dell'ipotensione associata a shock emorragico e endotossinico.
- Regolazione dei processi riproduttivi, in particolare l'anandamide sembra giocare un ruolo cruciale nella regolazione della fertilità, nel processo di attecchimento dell'embrione e nella progressione della gestazione.
- Modulazione della risposta immunitaria e possibile ruolo terapeutico nelle malattie infiammatorie croniche intestinali.
- Azione anti-ossidante.
- Possibile funzione "anti-stress" simile e complementare a quella esercitata dalle endorfine sia a livello centrale che periferico.
- Regolazione dei processi di proliferazione cellulare che sono alla base della crescita dei tumori.

I recettori cannabinoidei interagiscono con una varietà di composti che sono classificabili dal punto di vista chimico in:

- a. Cannabinoli triciclici (composti benzopiranicici - Δ^9 -THC)
- b. Cannabinoli biciclici (CP-55940)
- c. Aminoalchilindoli (indoli, pirroli e indeni – WIN-55,212-2)

- d. Eicosanoidi (Ligandi endogeni – anandamide) (2, 7, 14)

Dal un punto di vista dell'attività e della selettività sono suddivisi in sei diverse classi (15):

- e. Agonisti selettivi per i recettori CB₁:

In questa categoria rientrano composti analoghi dell'anandamide, ad esempio l'ACEA e l'O-1812, che presentano elevata selettività per il recettore CB₁. Sono composti in grado di legare il recettore e di attivarlo trasmettendo un segnale che viene, successivamente, decodificato.

- f. Agonisti/agonisti inversi selettivi per i CB₁:

In questo gruppo sono compresi l'SR141716A (Rimonabant), l'AM251, l'AM281, l'O-2654, composti che non hanno attività intrinseca, ma che mostrano affinità di legame per il sito recettoriale, riducendo così l'attività dell'agonista.

- g. Agonisti selettivi per i CB₂:

Questa categoria comprende diversi composti, tra cui l'HU308, l'AM1241, il JWH015 e il GW405833, che mostrano selettività per i recettori CB₂, che vengono modulati positivamente.

- h. Antagonisti/agonisti inversi selettivi per i recettori CB₂:

SR144528, AM630, JTE-907. Questi composti sono estremamente utili nella caratterizzazione del ruolo dei recettori CB₂.

- i. Agonisti non selettivi:

Appartengono a questo gruppo il CP-55-940, il WIN 55,212-2, l'HU-210 e il BAY 38-7271.

j. Agonisti parziali non selettivi:

Sono classificati in questa categoria composti come il Δ^9 -THC, l'anandamide e il BAY59-3074, molecole che interagendo con i recettori per i cannabinoidi, sono in grado di modulare importanti vie di trasduzione fisiologiche.

Nonostante la loro importanza e le loro potenzialità terapeutiche, attualmente sono disponibili per l'uso medico, in alcuni paesi, ma non in Italia, soltanto due agonisti dei recettori cannabinoidi, dronabinolo e nabilone, ed un antagonista dei recettori cannabinoidi, il Rimonabant. In particolare, il dronabinolo è il Δ^9 -THC di sintesi, commercializzato col nome di Marinol® in USA, Germania, Olanda e Israele, mentre il nabinolo è commercializzato col nome di Cesamet® in Gran Bretagna e Canada. Essi sono disponibili sotto forma di capsule, da assumere per via orale. Oltre alle indicazioni terapeutiche succitate, esistono una serie di patologie neurologiche (Malattia di Parkinson, corea di Huntington, spasticità nella sclerosi multipla), traumi cranici e l'epilessia per le quali vi è un presupposto razionale di efficacia clinica con l'uso dei cannabinoidi di sintesi (11).

L'antagonista dei recettori cannabinoidi Rimonabant è stato autorizzato per il trattamento dell'obesità, con il nome di Acomplia®.

Infine un estratto naturale della *Cannabis*, commercializzato con il nome di Sativex®, viene utilizzato in molti paesi per il trattamento sintomatico del dolore neuropatico nella sclerosi multipla: il Sativex è formulato come spray ad assorbimento oromucosale e contiene circa le stesse quantità di dronabinolo (THC) e cannabidiolo (CBD) (3).

1.3. Cannabinoidi e obesità

Nel corso degli ultimi anni la percentuale di popolazione obesa è cresciuta in modo preoccupante, principalmente a causa del cambiamento di stile di vita che sempre più spesso combina una dieta ipercalorica con la sedentarietà e al momento l'obesità rientra tra i dieci principali problemi sanitari globali riconosciuti dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità (OMS). Questo perché in individui con una elevata percentuale di grasso corporeo è stato riscontrato un elevato rischio di mortalità o di insorgenza di patologie gravi come coronaropatie, diabete di tipo 2 e alcune forme di tumori (16,17).

Studi preclinici e clinici hanno dimostrato che sia i cannabinoidi endogeni che quelli esogeni, agiscono sui recettori CB₁ ipotalamici stimolando l'appetito e la preferenza di cibi ricchi di grassi e carboidrati. Nell'ambito del controllo alimentare, è noto che a livello postsinaptico il neurotrasmettitore GABA garantisce il senso di sazietà. L'attivazione endocannabinoide a livello del neurone postsinaptico, che può essere indotta dalla sensazione di piacere provocata dalla visione o dal breve assaggio di un gustoso dolce, attenua la sensazione di sazietà provocata dal GABA e stimola di conseguenza la tendenza alla ripresa dell'alimentazione. Questo spiega in termini fisiologici le azioni oressizzanti attribuite ai cannabinoidi di origine vegetale (18). Oltre a influenzare i comportamenti legati alla gratificazione, nella pulsione verso l'apporto nutrizionale il sistema endocannabinoide è in relazione con il sistema oppioide e con il sistema serotoninergico, visto il coinvolgimento della serotonina nel controllo del comportamento alimentare (18). Al momento i possibili trattamenti per pazienti obesi con sindromi metaboliche sono prevalentemente chirurgici, come il bendaggio gastrico e i vari tipi di bypass gastrico, che presentano comunque controindicazioni, come nausea e coliche fino al rischio di perforazione gastrica e ad una seppur bassa percentuale di morte peri operatoria.

Nonostante i grandi sforzi prodotti dalla ricerca negli ultimi anni nel campo del controllo del peso, pochissimi agenti farmacologici per il trattamento a lungo termine dell'obesità, sono stati immessi con successo sul mercato, tra i quali la sibutramina (strutturalmente simile alle anfetamine, che agisce da inibitore della ricaptazione della noradrenalina) e

l'orlistat (inibitore della lipasi gastrointestinale), i quali evidenziano comunque un'attività limitata accompagnata da significativi effetti collaterali. Inoltre all'inizio del 2010, l'European Medicines Agency (EMA) ha bandito le preparazioni a base del farmaco anoressizzante sibutramina dal mercato europeo a causa dell'elevato rischio di malattie cardiovascolari. Vista l'attuale assenza sul mercato di farmaci anti-obesità con reali effetti benefici, visto l'impatto che l'obesità ha sulla salute e sull'economia pubblica, e considerato il coinvolgimento che il sistema endocannabinoide ha nell'assunzione e nel controllo alimentare, si rende necessariamente urgente lo sviluppo di nuovi composti sia attraverso lo studio dei farmaci su modelli animali il più possibile predittivi delle alterazioni fisiologiche e patologiche nell'uomo, sia attraverso la sintesi di nuove molecole. Molti dei modelli di obesità finora utilizzati si basano su mutazioni a carico di geni che controllano il bilancio energetico. In particolare, i ratti Zucker (*fa/fa*) e i topi *db/db*, che presentano una mutazione nel gene codificante per il recettore per la leptina, non sono in grado di riceverne il segnale per un difetto a livello del recettore cellulare di superficie specifico per la leptina, pur producendo una quantità di segnale proporzionale alla loro massa adiposa; i topi *ob/ob* sono knock out per la leptina stessa.



Figura.4 Alcuni modelli animali di obesità. a) Ratto Zucker (*fa/fa*); b) Topi *db/db*; c) Topi DIO (diet-induced obesity).

Dal punto di vista fenotipico questi animali sono obesi, iperfagici e iperinsulinemici e hanno quindi rappresentato sinora un modello adeguato per lo studio delle alterazioni metaboliche associate all'obesità. Una limitazione all'impiego dei modelli descritti è che sono poco rappresentativi della reale condizione clinica. Infatti, l'obesità nell'uomo non è

causata da mutazioni monogeniche ma è il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici e ambientali, primo fra tutti il tipo di alimentazione. Secondo questa ottica, negli ultimi anni sono stati sviluppati i modelli di topi e ratti DIO (diet induced obesity).

Gli animali non possiedono nessuna mutazione, ma sono sottoposti ad una dieta ad alto tenore di grassi che determina lo sviluppo dell'obesità, rappresentando quindi un modello altamente predittivo delle alterazioni metaboliche riscontrabili nell'uomo. Questi modelli sono stati utilizzati con successo per lo studio degli effetti metabolici degli antagonisti del recettore CB₁ (19-22). Il primo promettente candidato al trattamento clinico dell'obesità, l'antagonista CB₁ selettivo SR141716A più noto come Rimonabant (23, 24), trasmettendo un segnale di sazietà al cervello prima dei pasti con conseguente diminuzione dell'appetito e riduzione del consumo di cibo, fu commercializzato in Europa nel 2006, come detto precedentemente, con il nome di Acomplia®. Numerosi studi, mediante l'utilizzo di diversi paradigmi sperimentali, hanno dimostrato che nei modelli animali Zucker (*fa/fa*) e i topi *db/db* la somministrazione acuta di Rimonabant riduce il consumo di cibo, e un trattamento cronico con il composto è in grado di ridurre il peso corporeo (25-29). Attraverso questi modelli sono stati esplicitati i principali meccanismi centrali sui quali il Rimonabant esplica la sua efficacia: l'inibizione della trasmissione mediata dai recettori CB₁ nel sistema mesolimbico e della melanocortina, il potenziamento della colecistochinina (CCK) e dei segnali vagali di sazietà nel tronco encefalico. Invece tra i meccanismi periferici si ha l'inibizione della lipogenesi nel tessuto adiposo e in quello epatico, un miglioramento nell'ossidazione degli acidi grassi nel muscolo scheletrico e un aumento dell'adiponectina che modula la formazione degli adipociti con effetti pleiotropici sull'infiammazione e sulla protezione da aterosclerosi che invece si hanno nell'obesità (14, 26, 30). Il Rimonabant fu approvato per il solo trattamento dell'obesità di pazienti in sovrappeso con sindromi metaboliche, benché si fosse rivelato efficace per diverse altre applicazioni terapeutiche, come per esempio il diabete di tipo 2 e per il ruolo svolto nella disassuefazione da fumo o da alcool, suggerendo che i recettori CB₁ potessero rappresentare un versatile target per nuovi farmaci. In seguito, la scoperta dell'elevato rischio di gravi conseguenze psichiche, come dimostrato dall'aumento dei casi di

depressione e suicidio, legate all'assunzione del Rimonabant ne ha causato il blocco della commercializzazione nel 2008 da parte dell'EMA (23, 24, 31). In ogni caso sin da quando il composto fu identificato nel 1994 come il più potente e selettivo antagonista CB₁ (31), è stata prodotta una grande varietà di composti mimetici, prevalentemente generati rimpiazzando il pirazolo centrale con analoghi anelli eteroaromatici. In alcuni casi queste modificazioni molecolari hanno fornito degli efficaci bioisosteri (31-33).

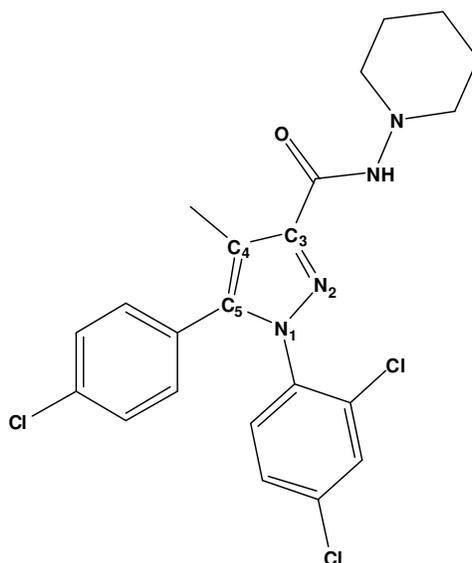


Figura.5 Rimonabant (modello di struttura con *core* pirazolico centrale).

In particolare nuove classi di composti sono state ottenute attraverso:

- Sostituzione sul fenile in posizione C5 del pirazolo
- Allungamento della catena alchilica in C4

Nel primo caso, la sostituzione è avvenuta con anelli eterociclici che presentano caratteristiche steriche ed elettroniche equivalenti, come ad esempio la *N*-piperidinil-5-(5-

clorotiofen-2-il)-1-(2,4-diclorofenil)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carbossamide (K_i CB₁, 35.0 ± 2.9 nM; K_i CB₂, 476 ± 3 nM) e suoi analoghi in cui è stato inserito in C5 un anello tiofenico (34). Nel secondo caso invece l'allungamento della catena alchilica in C4 ha portato alla formazione di una struttura tricyclica (14, 35-38), come nel caso della 8-cloro-1-(2,4-diclorofenil)-*N*-piperidin-1-il-1,4,5,6-tetraidrobenzo[6,7]cicloep[1,2-*c*]pirazol-3-carbossammide (NESS0327) in cui la catena alchilica in C4 è stata allungata e saldata con una delle posizioni *orto* del sostituente benzenico in C5 del pirazolo. L'aumento delle dimensioni dell'anello centrale dell'unità tricyclica comporta un significativo cambiamento dell'attività: composti 1,4-diidroindeno[1,2-*c*]pirazolici mostrano una maggiore affinità verso i recettori CB₂ rispetto ai CB₁, quelli benzo[*g*]indazolici hanno maggiore affinità per i recettori CB₁ ma non hanno elevata selettività, mentre i composti con struttura 1,4,5,6-tetraidrobenzo[6,7]cicloep[1,2-*c*]pirazolica, dei quali fa parte il NESS0327, mostrano sia affinità che una selettività elevate nei confronti dei recettori CB₁. Pertanto, aumentando la lunghezza del ponte carbonioso tra il C4 del pirazolo ed il gruppo fenilico in C5, da una a tre unità carboniose, si ottiene un marcato aumento nell'affinità e selettività per i recettori CB₁ (14, 35-38).

2. Sintesi

In seguito alla sua identificazione nel 1994 e alle solide evidenze sperimentali ottenute relativamente ai recettori per i cannabinoidi, sono stati condotti una grande quantità di studi sul Rimonabant e su tutta una serie di composti ad esso assimilabili, consentendo di identificare le caratteristiche strutturali determinanti per l'attività nei confronti dei recettori CB₁ (31).

Studi incrociati struttura-attività (SAR) e computazionali hanno evidenziato l'importanza del gruppo carbossiammidico legato al C3 dell'anello pirazolico nell'interazione tra l'antagonista e il recettore. E' stato infatti osservato che l'ossigeno carbonilico forma un ponte idrogeno con il residuo di Lis192, mentre il ciclo dell'amminopiperidina viene ospitato in una tasca lipofila delimitata da residui di valina, fenilalanina, leucina e metionina. Anche il gruppo 2,4-diclorofenile stabilizza il complesso con il sito recettoriale (39).

2.1. Rimonabant e sostituenti

Da studi di correlazione struttura-attività risulta che la funzionalizzazione dell'arile legato al C5 del pirazolo riveste una notevole importanza: in composti analoghi del Rimonabant privi di sostituenti arilici si riscontra una evidente diminuzione dell'affinità verso i recettori CB₁ (31-33). E' stato inoltre dimostrato che anche il sostituente alchilico legato al C4 del pirazolo esercita un'influenza sostanziale sull'attività nei confronti dei recettori CB₁ (32).

A parità di tutti gli altri sostituenti, l'inserimento di un piccolo gruppo alchilico al posto dell'alogeno sull'arile non influenza in maniera significativa l'affinità, mentre si è notato che l'introduzione nella stessa posizione di un sostituente arilico o comunque ingombrato, incrementa significativamente la selettività verso i recettori CB₁, sebbene non aumenti l'affinità.

Come evidenziato nel brevetto US7659407B2 (34), la sostituzione bioisosterica dell'arile legato al C5 dell'anello pirazolico del Rimonabant con una porzione 2-tienilica convenientemente sostituita porta alla produzione di potenti antagonisti selettivi per i recettori CB₁ e per i quali si sono rivelate valide le stesse considerazioni strutturali suddette per i derivati arilici (32-34).

2.2. Sintesi dei derivati NESS006A e NESS014A

La figura 6 riporta schematicamente la sintesi completa con la quale sono stati ottenuti il NESS006A e il NESS014A. Le molecole sono due nuovi derivati del Rimonabant recanti il nucleo piridinico e sintetizzati presso i laboratori di sintesi della PharmaNess.

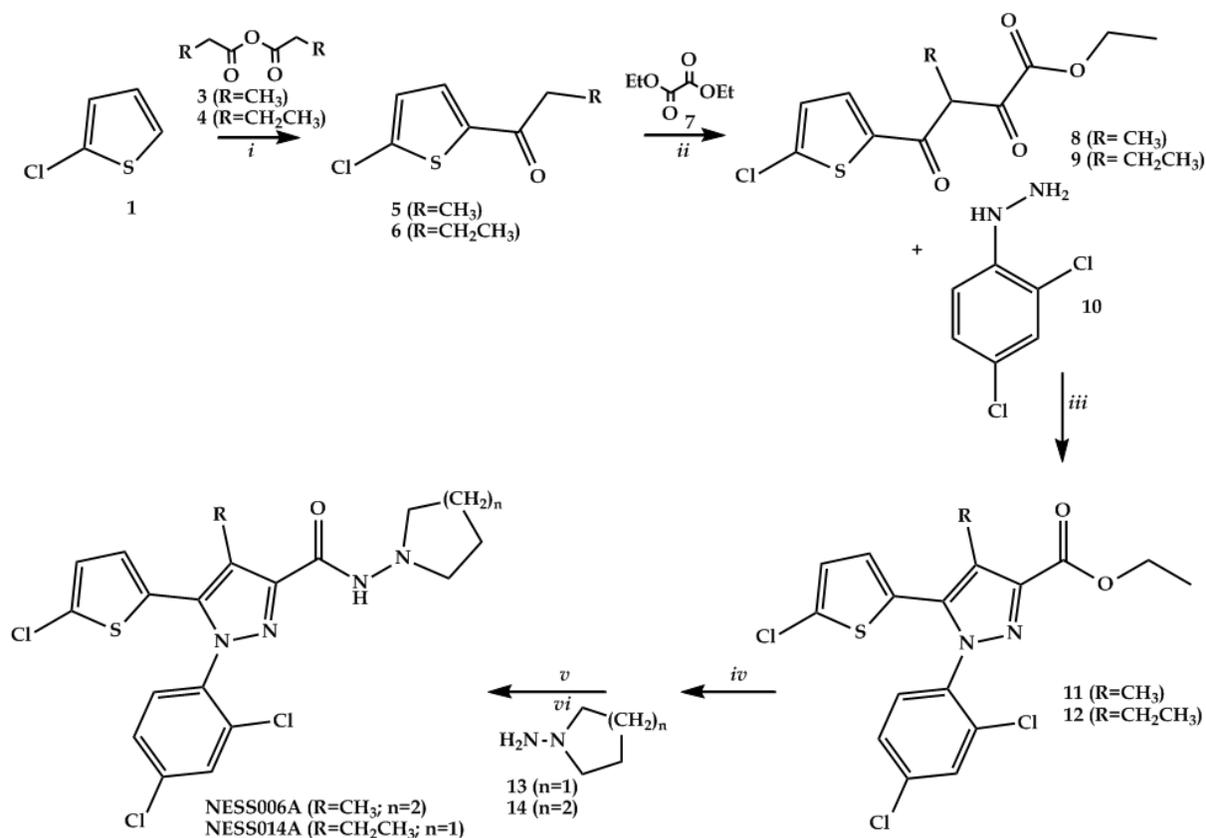


Figura.6 (i) BF₃OEt₂, 70°C/1,5h; (ii) abs.EtOH/Na, R.T./22h; (iii) CH₃COOH, Δ/1h; (iv) KOH/MeOH, Δ/14h; (v) HOBt-H₂O, EDC-HCl, DCM, R.T./1/2h; (vi) DCM, suitable amine, R.T./20h.

La reazione di Friedel-Crafts, nella quale è stato fatto reagire il clorotiofene con l'anidride propionica, in presenza di BF₃ eterato ha portato all'ottenimento del corrispondente prodotto acilato. In seguito attraverso la condensazione di Claisen con dietilossalato ed etossido di sodio si ha la produzione dell' α,γ - dichetoestere corrispondente. In presenza

di acido acetico, l' α,γ - dichetoestere è stato addizionato con 2,4-diclorofenilidrazina con l'ottenimento dell'anello pirazolico centrale. Il prodotto finale si ottiene per attivazione dell'acido mediante idrolisi basica, seguita da coupling con opportuno amide.

Tutti i prodotti sono stati purificati e caratterizzati in ciascuno stadio mediante cromatografia su colonna (VLC) cromatografia su strato sottile (TLC), spettroscopia infrarossa (IR), risonanza magnetica nucleare (NMR) e spettrometria di massa (MS e MS/MS).

3. Caratterizzazione e analisi qualitativa

In seguito all'isolamento e alla purificazione, i prodotti ottenuti sono stati sottoposti a tutta una serie di esperimenti atti a delucidare le caratteristiche strutturali e spaziali delle molecole stesse. In particolare i campioni sono stati analizzati e i dati ottenuti sono stati confrontati con quelli relativi al composto di riferimento Rimonabant. Le tecniche utilizzate comprendono:

- Spettroscopia infrarossa
- Risonanza Magnetica Nucleare
 - ^1H NMR
 - ^{13}C NMR
 - HSQC
- Spettrometria di massa
 - MS Scan
 - Daughter Scan

3.1. Spettroscopia infrarossa

La radiazione infrarossa si riferisce, in generale, a quella parte dello spettro elettromagnetico che si trova tra le regioni del visibile e delle microonde e viene diviso in tre zone che vanno dall'IR vicino a quello lontano. La zona più interessante è quella compresa fra 3.000 e 500 cm^{-1} . La spettroscopia IR è una tecnica analitica che si basa sull'interazione fra una radiazione elettromagnetica e la materia. Più precisamente, questa è una spettroscopia di vibrazione; infatti quando una molecola organica viene investita da una radiazione infrarossa la cui frequenza (espressa in termini di numeri d'onda, inversamente proporzionale alla lunghezza d'onda) sia compresa fra 10.000 e 100 cm^{-1} , l'energia ceduta dalla radiazione stessa viene convertita in energia vibrazionale. Quando queste vibrazioni determinano una variazione del momento dipolare della molecola, allora si ha una vibrazione IR attiva, maggiore è la variazione del momento dipolare, maggiore è l'assorbimento. Lo spettro IR, ottenuto diagrammando l'intensità dell'assorbimento in funzione della lunghezza d'onda, sebbene sia riferito alla molecola nella sua interezza, è caratterizzato da dei picchi riferibili a gruppi funzionali specifici, facenti parte della sua struttura. È proprio grazie alla riproducibilità di questi picchi, e soprattutto dei valori caratteristici di assorbimento, che siamo in grado di risalire alla struttura della molecola in esame (40).

3.1.1. IR Rimonabant, NESS006A, NESS014A

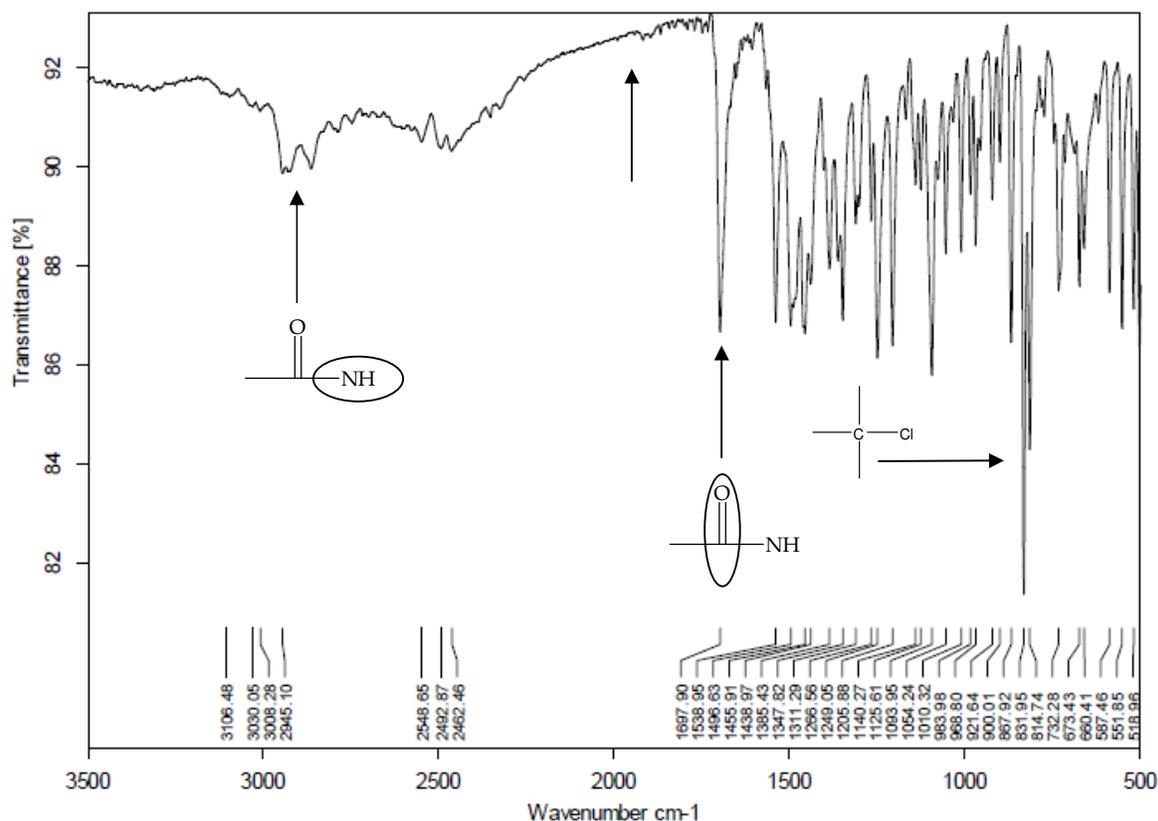


Figura.7 Spettro IR del Rimonabant

Lo spettro IR dell'SR141716A evidenzia alcune delle caratteristiche strutturali della molecola:

- 2950-3030 cm^{-1} una banda sdoppiata e una banda separata indicano a questi campi la presenza di un gruppo NH amidico.
- 1700 cm^{-1} il segnale indica la presenza di un gruppo carbonilico CO amidico.
- 2000 cm^{-1} circa sono presenti le bande di overtone caratteristiche dei gruppi fenolici.
- Nella porzione così detta di Fingerprint si possono inoltre distinguere l'intensa banda a 830 cm^{-1} corrispondente probabilmente ai cloruri fenilici e nella porzione compresa tra 1350 e 1500 cm^{-1} le bande ascrivibili ai doppi legami coniugati.

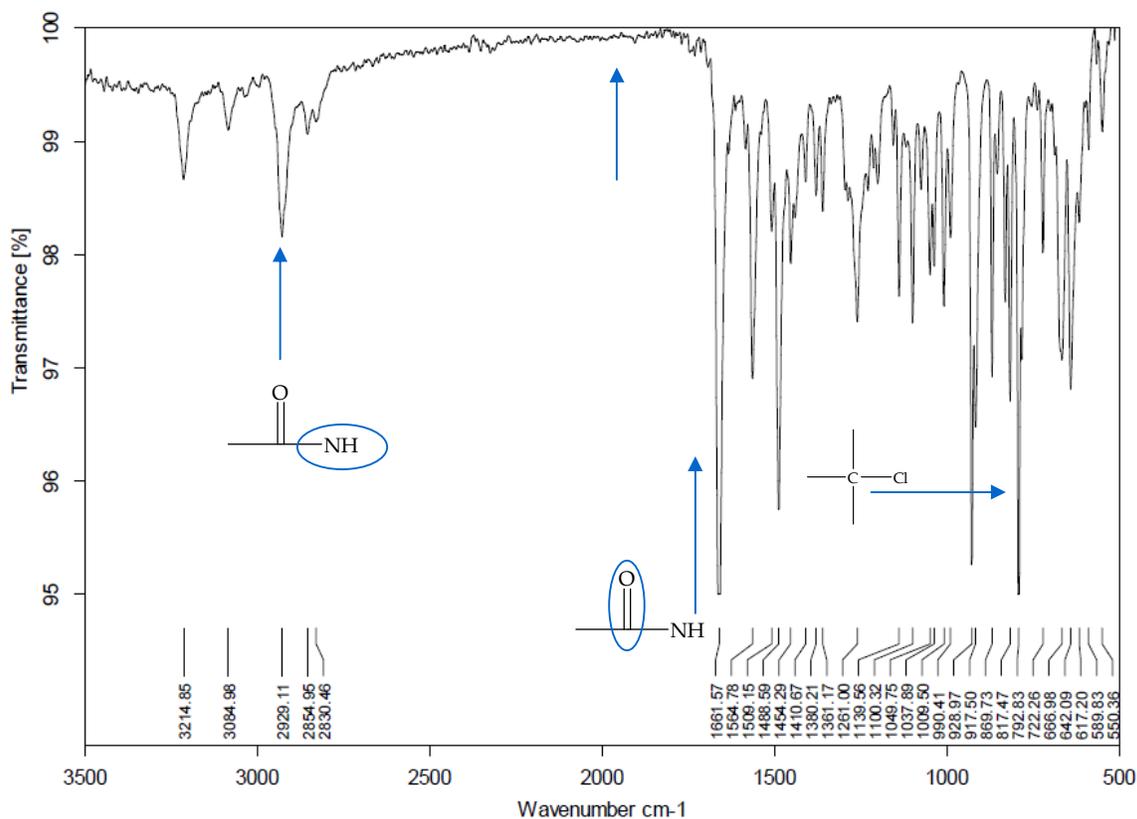


Figura.9 Spettro IR del NESS006A

Lo spettro IR del NESS006A evidenzia alcune delle caratteristiche strutturali della molecola:

- 2830-2930 cm^{-1} una banda unica e una sdoppiata indicano a questi campi la presenza di un gruppo NH amidico.
- 1660 cm^{-1} il segnale indica la presenza di un gruppo carbonilico CO amidico.
- 2000 cm^{-1} circa sono presenti le bande di overtone caratteristiche dei gruppi fenolici.

Nella porzione così detta di Fingerprint si possono inoltre distinguere l'intensa banda a 790 cm^{-1} corrispondente probabilmente ai cloruri fenilici e nella porzione compresa tra 1450 e 1550 cm^{-1} le bande ascrivibili ai doppi legami coniugati. Tra 3080 e 3220 cm^{-1} si ha la presenza di due segnali che potrebbe essere ricondotti allo stiramento dei CH tiofenici.

Dall'analisi dei tre spettri IR risultano evidenti diverse analogie tra le molecole come la presenza di gruppi fenolici recanti uno o più atomi di cloro, la presenza di un gruppo NH amidico e quella di un carbonile amidico.

Tra le principali differenze merita particolare attenzione l'assenza nello spettro dell'SR141716A della banda intorno a $3000-3250\text{ cm}^{-1}$ rappresentativa dei CH tiofenici che infatti sono una caratteristica peculiare solo dei nuovi derivati. Questo in particolare avviene perché, nonostante in quella stessa zona normalmente cadano anche i segnali dei CH arilici, questi hanno dei segnali meno evidenti con un conseguente abbassamento dell'onda.

3.2. Risonanza Magnetica Nucleare (NMR)

La spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) è una tecnica analitica strumentale che permette di ottenere dettagliate informazioni sulla struttura molecolare dei composti in esame. La spettroscopia NMR misura l'assorbimento di radiazione elettromagnetica di frequenza radio in molecole immerse in un forte campo magnetico. Queste radiazioni provocano transizioni di spin nucleare in particolari atomi (tipicamente ^1H o ^{13}C). Quindi, con la spettroscopia NMR, le informazioni sulla struttura molecolare vengono dedotte osservando il comportamento dei nuclei atomici. Nei primi strumenti NMR l'analisi veniva eseguita irradiando il campione immerso nel campo magnetico B_0 con un fascio di onde radio di frequenza via via crescente in modo da eccitare in sequenza tutti i nuclei in esame e quindi veniva registrata l'entità della radiazione assorbita. Questa tecnica, però, risultava molto lenta e non trova, oggi, applicazione. Nei moderni strumenti FT-NMR il segnale viene generato con il metodo ad impulso e la trasformata di Fourier. Con questa tecnica tutti i nuclei di una specie vengono eccitati contemporaneamente da un impulso di radiofrequenza che contiene tutto l'intervallo di frequenze necessario, i dati vengono poi elaborati al computer con la tecnica della trasformata di Fourier.

Le strutture dei composti sintetizzati sono state caratterizzate mediante spettroscopia HR-NMR, combinando i dati ottenuti dagli spettri ^1H con quelli del ^{13}C disaccoppiato. L'HSQC ha consentito un ulteriore approfondimento consentendo di mettere in relazione in modo più preciso i segnali protonici e quelli del ^{13}C .

3.2.1. NMR Rimonabant, NESS006A, NESS014A

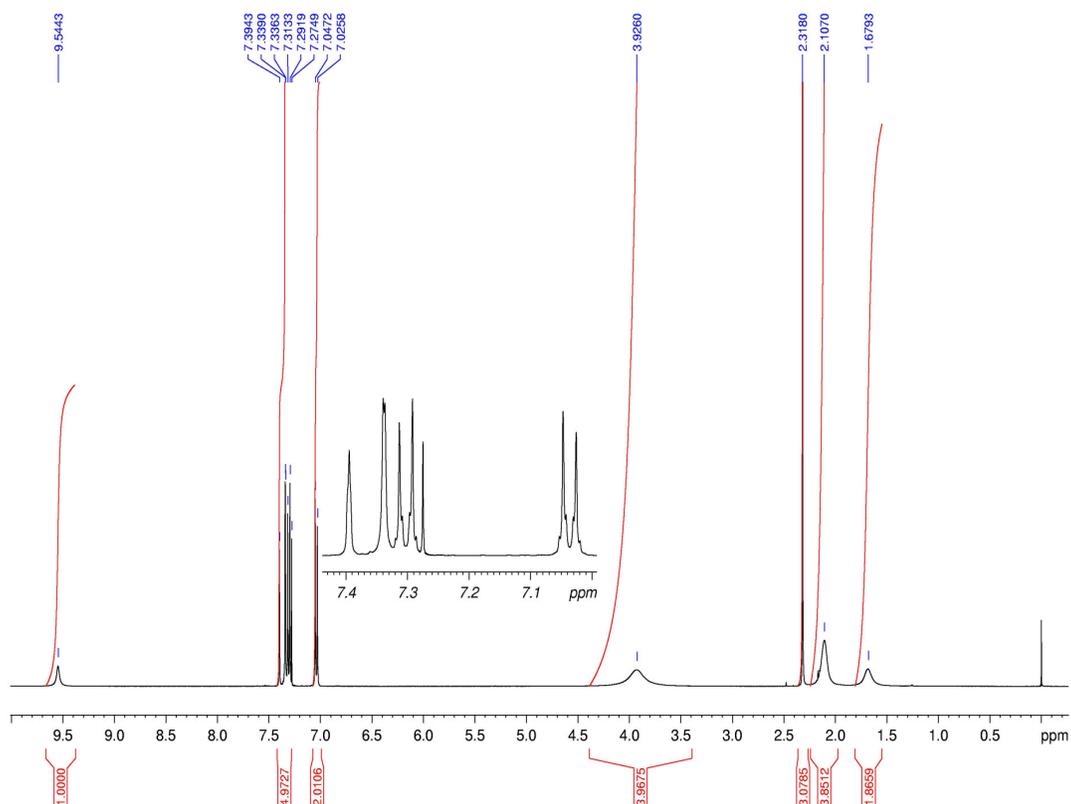


Figura.10 Spettro ¹H del Rimonabant.

Lo spettro in figura 10 rappresenta lo spettro protonico dell'SR141716A. La normalizzazione delle aree degli integrali è stata eseguita attribuendo al segnale a 9.54ppm il valore pari a 1. La presenza dell'ammide piperidinica è confermata da tre bande allargate nella zona alifatica (3.92, 2.10 e 1.68ppm, che integrano rispettivamente 4H, 4H e 2H) e da un singoletto che scambia col deuterio a 9.54ppm. I segnali relativi al diclorofenile in posizione 1 e al clorofenile in posizione 5 sono individuabili nella zona tra 7 e 7.4ppm.

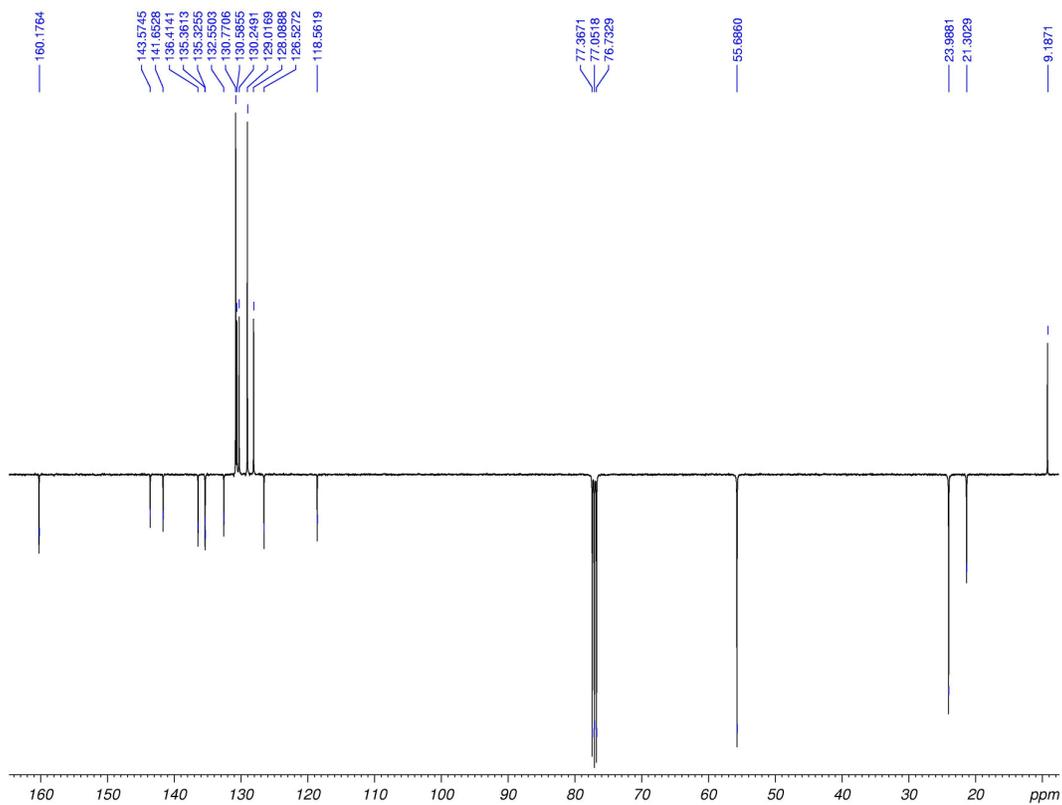


Figura.11 Spettro ^{13}C del Rimonabant.

Nella figura 11 è riportato lo spettro ^{13}C acquisito mediante esperimento APT (Attached Proton Test) il quale conferma quanto dedotto dallo spettro protonico.

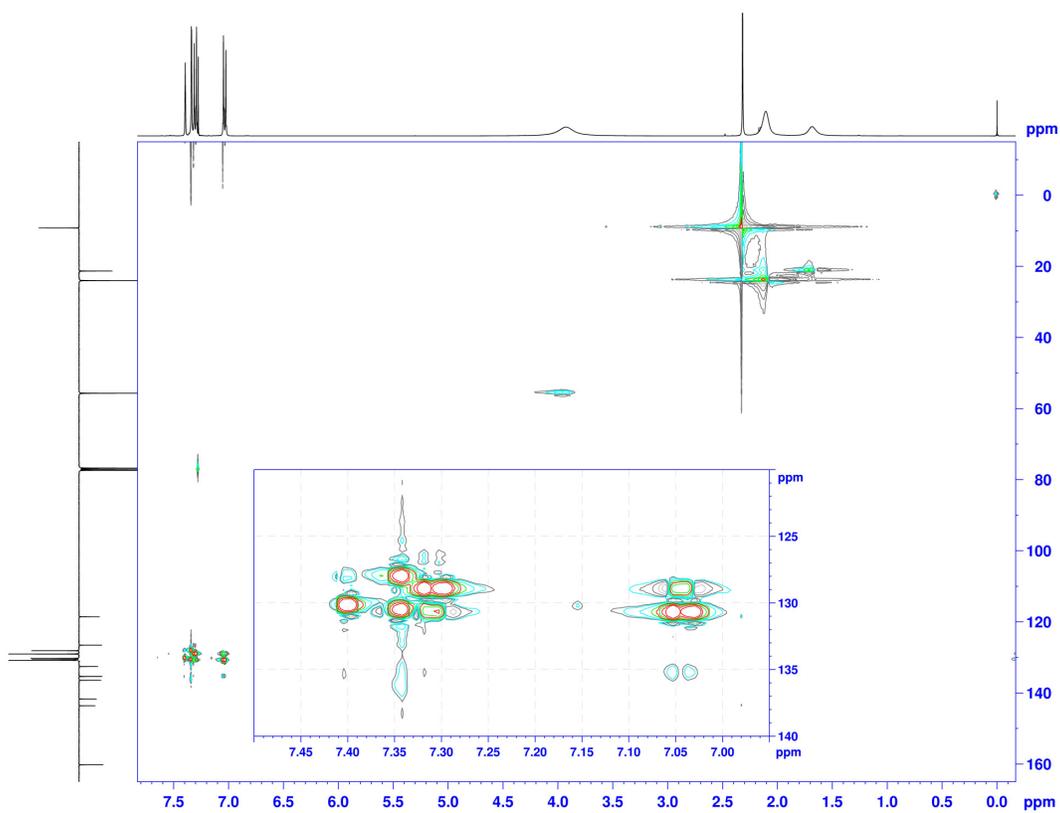


Figura.12 Spettro HSQC del Rimobant.

Lo spettro di correlazione protone-carbonio HSQC ha inoltre consentito di stabilire una corrispondenza tra i segnali dei protoni fenilici individuati in precedenza e quelli dei carboni ai quali i protoni sono direttamente legati.

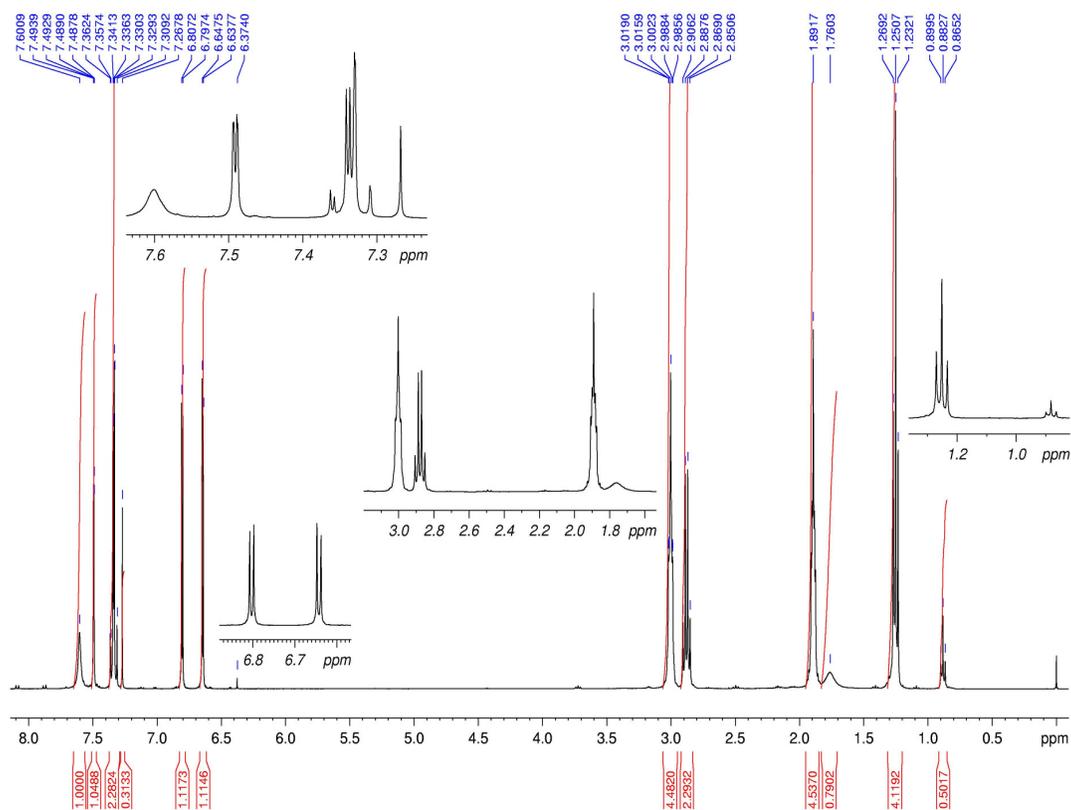


Figura.13 Spettro ^1H del NESS014A.

Lo spettro in figura 13 rappresenta lo spettro protonico del NESS014A. La normalizzazione delle aree degli integrali è stata eseguita attribuendo al segnale a 7.60ppm il valore pari a 1. La presenza dell'ammide pirrolidinica è confermata da due multipletti nella zona alifatica (2.98-3.02, 1.85-1.92ppm entrambi con area 4H) e da un singoletto che scambia col deuterio a 7.60ppm. I segnali relativi al diclorofenile sono facilmente identificabili nella zona tra 7.3 e 7.5ppm: un doppietto con $J=8.4$ a 7.31ppm, un doppietto di doppietti a 7.33ppm con $J=2.0$ e 8.4 e un doppietto con $J=2.0$ a 7.49ppm, dove la J minore corrisponde ad un accoppiamento meta tra i protoni mentre quella maggiore all'accoppiamento orto. Pertanto si assegna il doppietto a 7.49ppm al protone in posizione 3 dell'anello fenilico, che ha unicamente un accoppiamento meta col protone in posizione 5 il quale genera il segnale del doppietto di doppietti a 7.33ppm. Infatti il protone in 5

presenta anche un accoppiamento orto con il protone in 6, al quale di conseguenza viene attribuito il doppietto con J maggiore a 7.31ppm.

La presenza del cloro tiofene al posto del cloro fenile è confermata dalla presenza di due doppietti a 6.79 e 6.63ppm.

Infine identifichiamo le bande dell'etile in posizione 4 del pirazolo nel gruppo quadrupletto e tripletto rispettivamente a 2.88 e 1.25ppm.

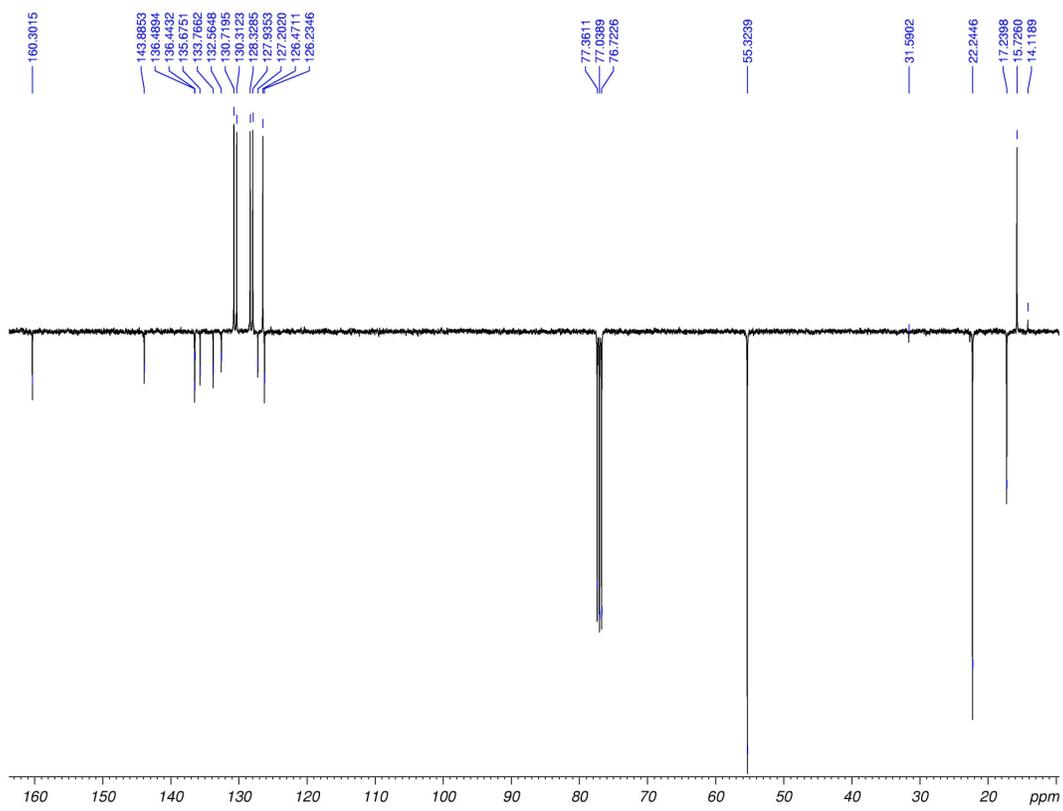


Figura.14 Spettro ^{13}C del NESS014A.

In figura 14 è riportato lo spettro ^{13}C acquisito mediante esperimento APT il quale conferma quanto dedotto dallo spettro protonico.

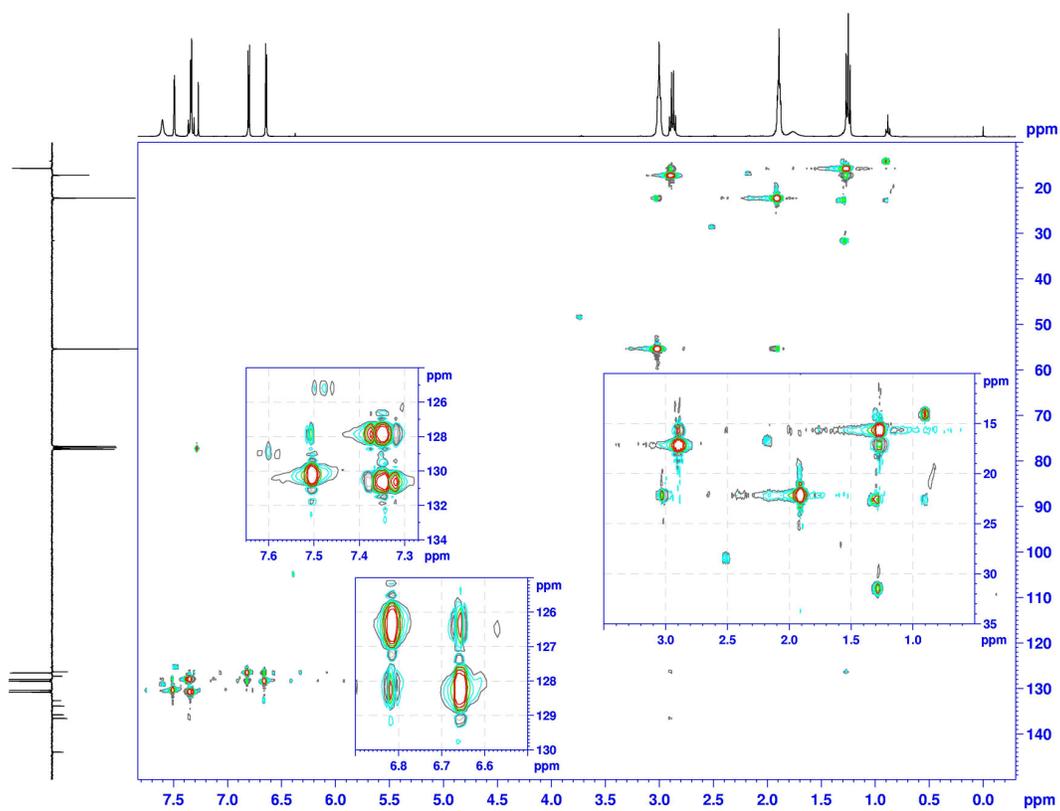


Figura.15 Spettro HSQC del NESS014A.

Lo spettro di correlazione protone-carbonio HSQC ha inoltre consentito di stabilire una corrispondenza tra i segnali dei protoni fenilici individuati in precedenza e quelli dei carboni ai quali i protoni sono direttamente legati.

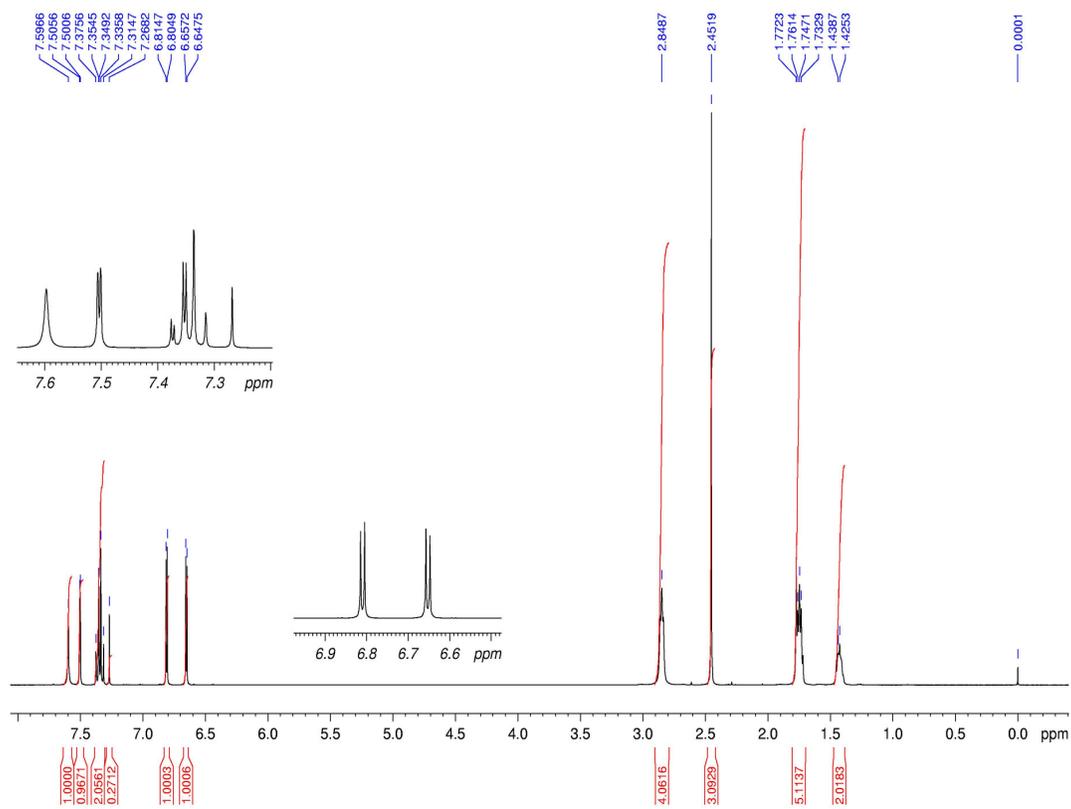


Figura.16 Spettro ^1H del NESS006A.

Lo spettro in figura 16 rappresenta lo spettro protonico del NESS006A. La normalizzazione delle aree degli integrali è stata eseguita attribuendo al segnale a 7.59ppm il valore pari a 1. La presenza dell'ammide piperidinica è confermata da tre multipletti nella zona alifatica (2.81-2.9, 1.73-1.77 e 1.38-1.49 ppm con area 4H, 4H e 2H) e da un singoletto che scambia col deuterio a 7.59ppm. I segnali relativi al diclorofenile sono facilmente identificabili nella zona tra 7.3 e 7.5ppm: un doppietto con $J=8.4$ a 7.31ppm, un doppietto di doppietti a 7.33ppm con $J=2.0$ e 8.4 e un doppietto con $J=2.0$ a 7.49ppm, dove la J minore corrisponde ad un accoppiamento meta tra i protoni, mentre quella maggiore all'accoppiamento orto. Pertanto si assegna il doppietto a 7.49ppm al protone in posizione 3 dell'anello fenilico, che ha unicamente un accoppiamento meta col protone in posizione 5 il quale genera il segnale del doppietto di doppietti a 7.33ppm. Infatti il protone in 5

presenta anche un accoppiamento orto con il protone in 6, al quale di conseguenza attribuiamo il doppietto con J maggiore a 7.31ppm.

La presenza del cloro tiofene al posto del cloro fenile è confermata dalla presenza di due doppietti a 6.80 e 6.64ppm.

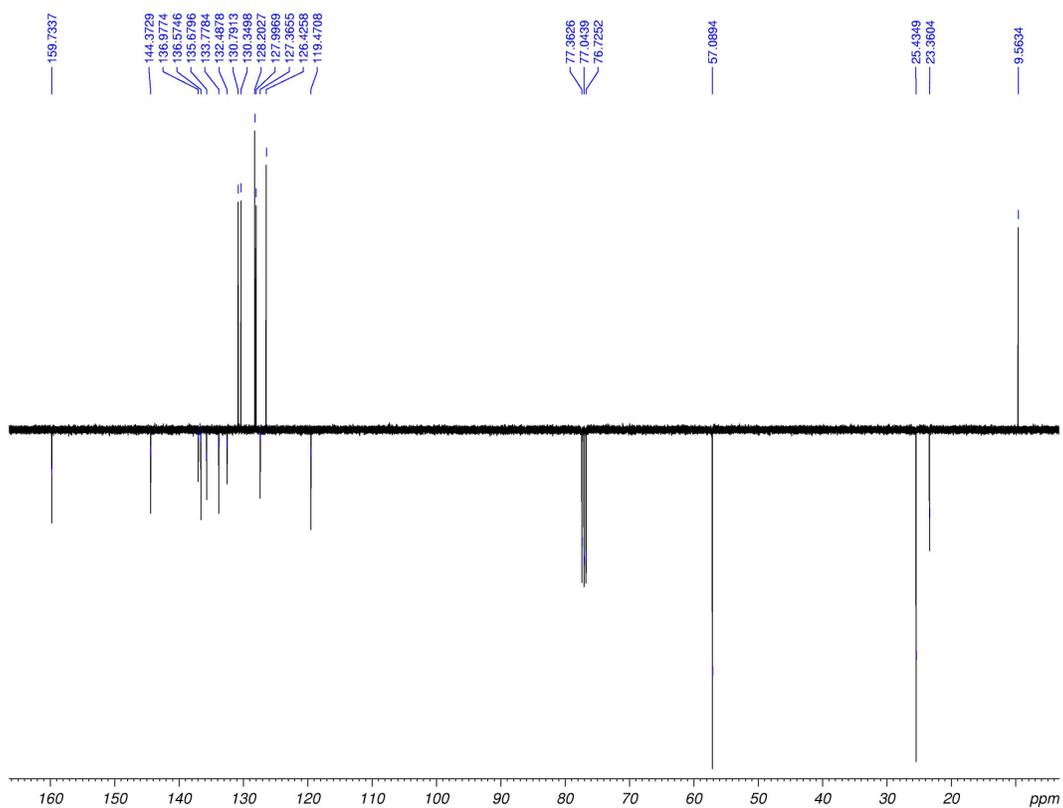


Figura.17 Spettro ^{13}C del NESS006A.

Nella figura 17 è riportato lo spettro ^{13}C acquisito mediante esperimento APT il quale conferma quanto dedotto dallo spettro protonico.

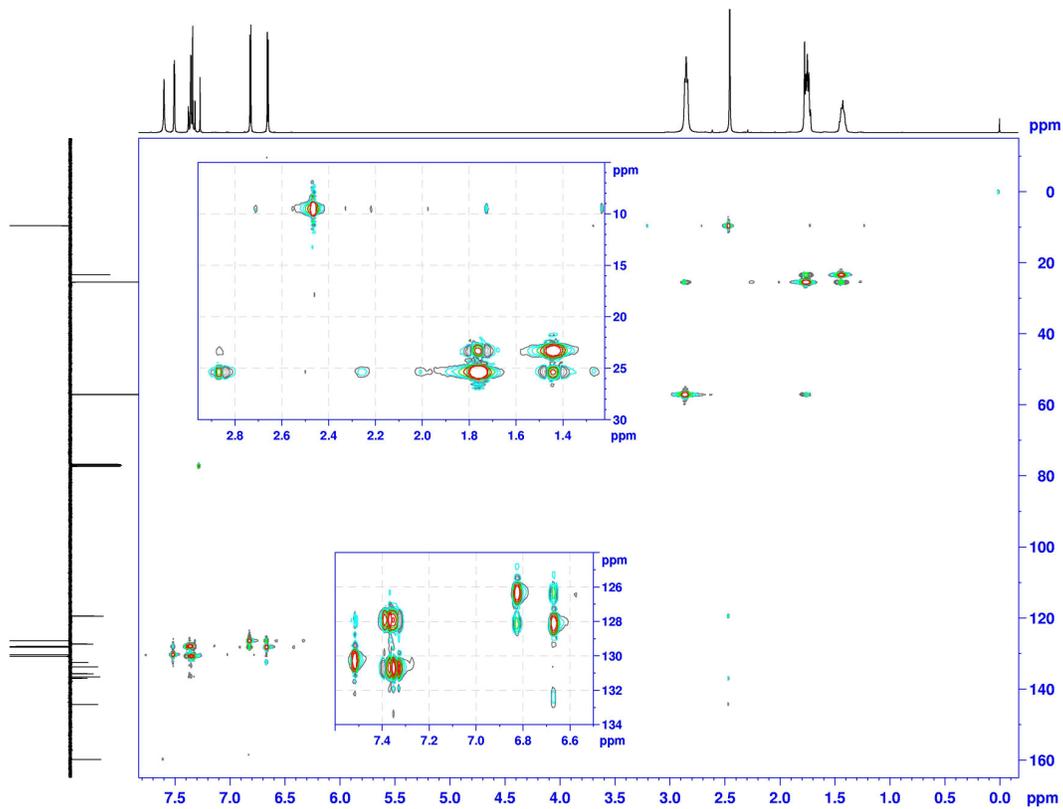


Figura.18 Spettro HSQC del NESS006A.

Lo spettro di correlazione protone-carbonio HSQC ha inoltre consentito di stabilire una corrispondenza tra i segnali dei protoni fenilici individuati in precedenza e quelli dei carboni ai quali i protoni sono direttamente legati.

3.3. Spettrometria di massa

La spettrometria di massa nasce alla fine del 1800 con la scoperta degli ioni positivi, e ha origine come tecnica di indagine sperimentale utilizzata per studiare le particelle elementari che compongono la materia. Nel 1912 J. J. Thomson, già premio Nobel nel 1906, ottiene gli spettri di massa di O_2 , N_2 , CO , CO_2 e $COCl_2$, osserva la presenza di ioni negativi e scopre la presenza di quelli metastabili. Nel 1953 Paul e Steinwedel descrivono in un brevetto l'analizzatore quadrupolare e la trappola ionica, mentre nel 1958 Paul, Reinhard e Von Zahn, dell'Università di Bonn descrivono lo spettrometro per il quale riceveranno il Premio Nobel nel 1989. Alla fine degli anni ottanta Fenn brevetta lo sviluppo dell'electrospray. Le scoperte che si sono susseguite hanno portato all'utilizzo di numerose tecniche come la Gas Cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS), l'Ion-Trap, il Maldi, il triplo quadrupolo e il Q-Trap (41).

La spettrometria di massa è una tecnica analitica di delucidazione strutturale basata sulla ionizzazione di una molecola e sulla sua successiva frammentazione in ioni con diverso rapporto massa / carica (m/z). La tecnica è di tipo distruttivo ovvero la molecola analizzata non può essere recuperata poiché non rimane intatta. Essa si basa sul principio che una molecola in fase gassosa viene ionizzata per espulsione di un elettrone dando luogo alla formazione dello ione molecolare (parent-ion) che in parte si frammenta dando molecole e/o radicali neutri (che possono essere rilevati grazie a particolari modalità di analisi come il neutral loss o analisi di perdite neutre), e in parte generando ioni frammento (daughter ions) (42). Sulla base del loro rapporto m/z vengono discriminati lo ione molecolare e i vari ioni figlio che si originano per la frammentazione, questi sono poi rivelati attraverso un detector. Ciò che risulta dagli esperimenti è uno spettro di massa, che rappresenta l'abbondanza relativa degli ioni in funzione del loro rapporto m/z . La spettrometria di massa consente di misurare le masse molecolari e di ottenere dei profili di frammentazione che sono specifici per ciascun composto, di cui costituiscono quindi

un'impronta digitale. Si può così individuare la formula di struttura di composti sconosciuti, anche avendone a disposizione piccole quantità.

3.3.1. Strumentazione

Uno spettrometro di massa è costituito come segue:

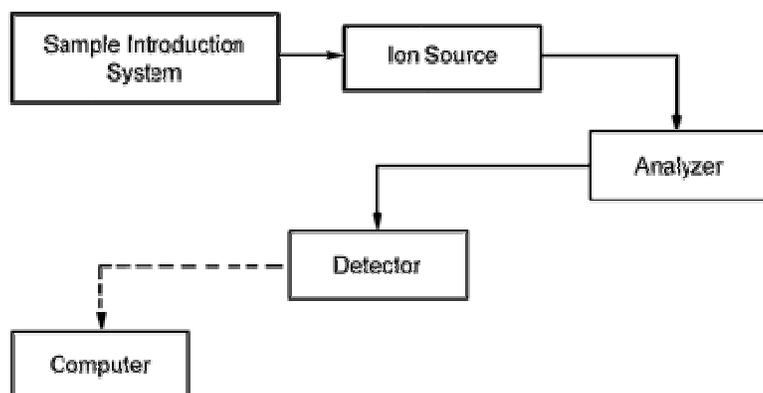


Figura.19 Schema generale dello spettrometro di massa secondo la U.S. Pharmacopeia (43)

a. Sistema di introduzione del campione

L' introduzione del campione nella ion-source può essere fatta sia allo stato solido che allo stato liquido o gassoso, usando un sistema di valvole che permettono di accedere alla camera di ionizzazione senza che questa venga a contatto con l'esterno. E' possibile interfacciare l'uscita di un sistema GC o HPLC come ingresso dello spettrometro di massa. Queste tecniche, note come GC-MS e LC-MS, sono estremamente utili nell'analisi di miscele di prodotti e nell'analisi quantitativa.

b. Sorgente

Se una molecola è investita in fase vapore da un fascio di elettroni di notevole energia cinetica (Collision Energy/CE) si può avere per l'urto la ionizzazione a ione positivo o negativo, ione che spontaneamente o in seguito all'urto porta alla produzione di daughter ions di massa inferiore. La frammentazione di ciascuna molecola dipenderà quindi dalle condizioni operative di ionizzazione e dalle caratteristiche chimiche della molecola stessa. Il campione viene ionizzato in un'apposita camera di ionizzazione, in cui il fascio di elettroni viene prodotto da una sorgente ionica che varia a seconda della tecnica utilizzata. Gli ioni ottenuti vengono successivamente accelerati e convogliati fino all'analizzatore. Il sistema di ionizzazione svolge un ruolo essenziale nella spettrometria di massa, perché da esso dipende anche il numero, la natura e l'abbondanza dei frammenti molecolari che compaiono nello spettro di massa. Il tipo di sorgente utilizzato provoca un diverso tipo di ionizzazione, in particolare le più diffuse sono la ionizzazione a impatto elettronico (E.I.), la ionizzazione chimica (C.I.) e la ionizzazione electrospray (E.S.I.). Quest'ultima in particolare viene utilizzata per l'analisi di campioni disciolti in un solvente polare che viene nebulizzato a pressione atmosferica dentro la camera di ionizzazione attraverso un ago tenuto ad un alto potenziale elettrico. Le goccioline di spray, che si sono caricate positivamente per azione del campo elettrico, vengono attratte verso un sistema di estrazione di ioni costituito da un capillare mantenuto sotto vuoto e a un potenziale negativo; in tal modo il solvente evapora e gli ioni carichi sono accelerati verso l'analizzatore. Questa tecnica di ionizzazione è largamente usata negli strumenti HPLC-MS.

c. Analizzatore

L'analizzatore consente di differenziare gli ioni generati in base al loro rapporto massa/carica. I più comuni sono: l'analizzatore magnetico, l'analizzatore a doppia focalizzazione, l'analizzatore a quadrupolo e l'analizzatore a trappola ionica. Uno dei più utilizzati è l'analizzatore a quadrupolo che è costituito da quattro barre cilindriche

metalliche che delimitano il "cammino" percorso dagli ioni provenienti dalla camera di ionizzazione e diretti al detector. Le barre sono mantenute ad un potenziale elettromagnetico oscillante, in modo che quando le due sbarre verticali hanno potenziale positivo quelle orizzontali l'hanno negativo, e viceversa.

Gli elettroni, accelerati dalle piastre acceleratrici, entrano nel tunnel delimitato dalle barre e vengono respinti dai poli positivi ed attratti dai negativi. Tuttavia, a causa dell'oscillazione del quadrupolo gli ioni assumono una traiettoria a zig zag e finiscono con lo scaricarsi su una delle barre, tranne quelli che, per un certo valore di frequenza di oscillazione, hanno un'energia cinetica tale per cui il moto diventa sinusoidale e riescono ad uscire dal tunnel ed entrare nel sistema di rivelazione (fotomoltiplicatore). Operando quindi una scansione di frequenza di oscillazione del campo è possibile far uscire ioni a massa molecolare crescente (42).

d. Detector

I rilevatori sono dei dispositivi che, all'arrivo del fascio ionico, danno origine a un segnale elettrico proporzionale alla quantità degli ioni, segnale che può essere amplificato e registrato (42).

e. Sistema di gestione

In generale, la gestione del sistema è fatta attraverso l'utilizzo di un software caricato su un computer dedicato. Attraverso questo meccanismo l'operatore potrà procedere al controllo e al settaggio dei parametri ottimali per l'analisi dei campioni e all'interpretazione dei dati ottenuti.

3.3.2. Lo spettro di massa

Lo spettro di massa si presenta come un insieme di linee verticali (picchi) di intensità diversa, ciascuna corrispondente al valore di massa di uno ione frammento. Il picco a valore di massa più elevato è quello relativo allo ione molecolare. Dallo spettro di massa si può risalire dunque alla struttura di un composto incognito, attribuendo ai singoli ioni una composizione elementare e ricostruendo i meccanismi di frammentazione seguendo schemi tipici per le varie classi di composti. In linea generale, l'interpretazione dello spettro avviene per identificazione di:

- I. ione molecolare.
- II. ioni caratteristici.
- III. processi di frammentazione caratteristici.

3.3.3. Q-micro triplo quadrupolo

Il sistema a triplo quadrupolo può essere così esemplificato:

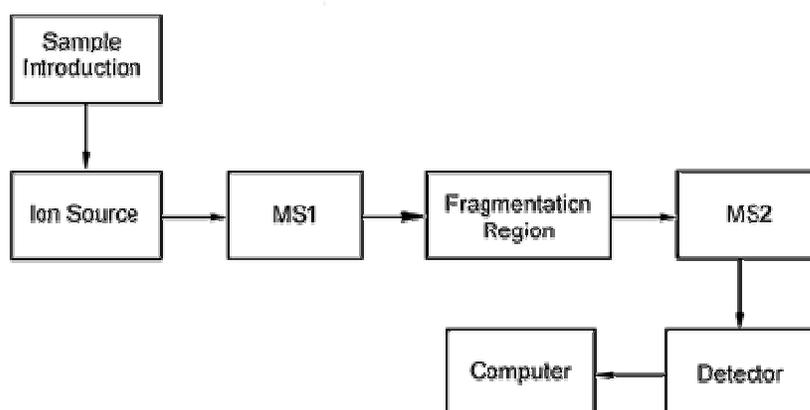


Figura.20 Schema di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo secondo la U.S. Pharmacopeia (43).

Nel triplo quadrupolo il Q1 e il Q3 sono analizzatori di massa che filtrano gli ioni (44). Il Q1 viene utilizzato per la selezione degli ioni di una particolare massa che devono arrivare alla cella di collisione. Nella cella di collisione (Q2), gli ioni collidono col gas di collisione (Argon nel caso del Q-micro) per dare origine agli ioni figlio o frammenti. Il Q3 è utilizzato per selezionare gli ioni figlio che arriveranno al detector in funzione della loro massa.

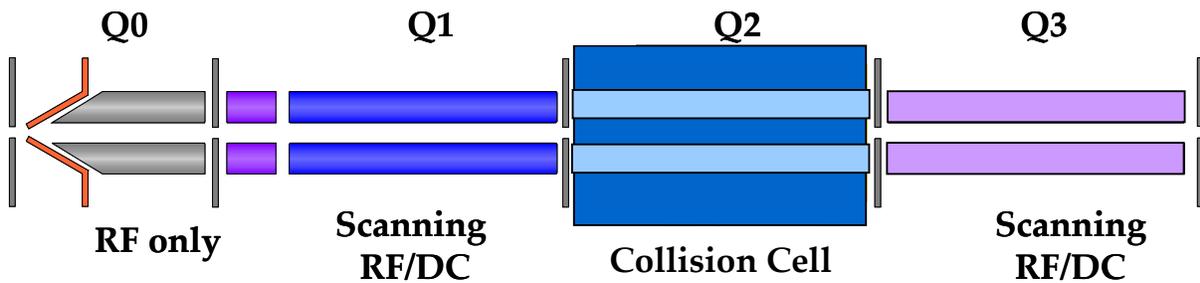


Figura.21 Schema di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo.



Figura.22 Sistema LC/MS Water Alliance 2696 HPLC accoppiato allo Spettrometro di Massa, Waters MicroMass Q-micro.

3.3.4. Analisi qualitativa

L'analisi qualitativa delle molecole oggetto del presente studio è stata condotta utilizzando le modalità elencate con i risultati che seguono.

a. MS1 Scan

Questa modalità può essere utilizzata per ottenere uno spettro completo attraverso un'infusione o in seguito all'iniezione di un campione. Il primo quadrupolo è impegnato nel filtrare gli ioni in base alla loro massa, e l'analisi avviene in un solo stadio senza l'utilizzo di energia di collisione.

b. Daughter Scan

Questa modalità provoca la frammentazione di uno ione noto. In questo caso il Q1 funziona come filtro lasciando passare nella cella di collisione solo un tipo di ione. Il processo di frammentazione avviene applicando un voltaggio alla cella di collisione in modo da accelerare gli ioni che vanno a urtare contro il gas di collisione (Argon). Gli ioni provenienti poi dalla cella di collisione passano nel Q3.

3.3.5. Spettrometria di massa Rimonabant, NESS006A, NESS014A

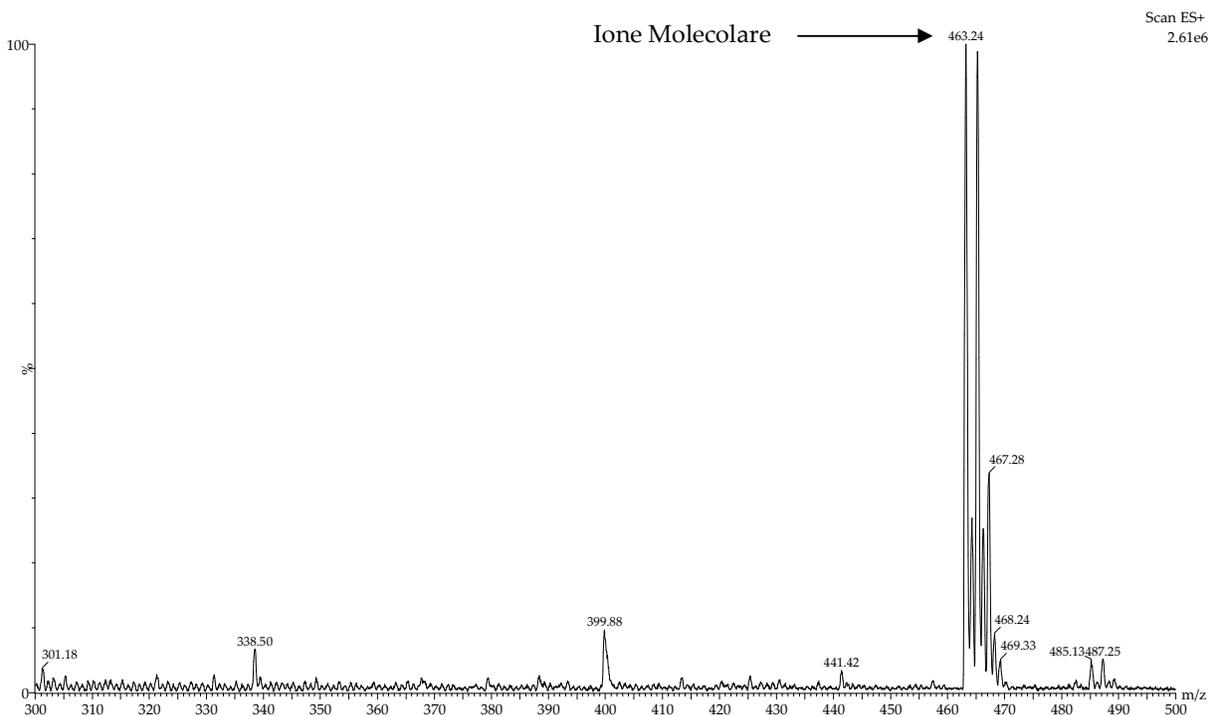


Figura.23 Spettro di massa del Rimonabant in modalità Parent Scan o MS1 Scan con Sistema LC/MS Water Alliance 2696 HPLC accoppiato allo Spettrometro di Massa, Waters MicroMass Q-micro.

Lo spettro di massa dell'SR141716A presenta una banda o picco a m/z 463.2, corrispondente allo ione molecolare.

La presenza di altri picchi ad esso associati a $[M+2]$ 465 e $[M+4]$ 467 rivela e conferma la presenza di picchi isotopici dovuti alla presenza del cloro nella struttura molecolare. Il cloro in particolare è un elemento che contiene in notevole abbondanza un isotopo che pesa due unità di massa in più rispetto all'isotopo fondamentale. Pertanto tutte le sostanze che contengono un atomo di cloro danno uno spettro in cui il picco isotopico $[M+2]$ è particolarmente intenso rispetto allo ione molecolare. La presenza del picco $[M+4]$ suggerisce la presenza di 3 atomi di cloro (42).

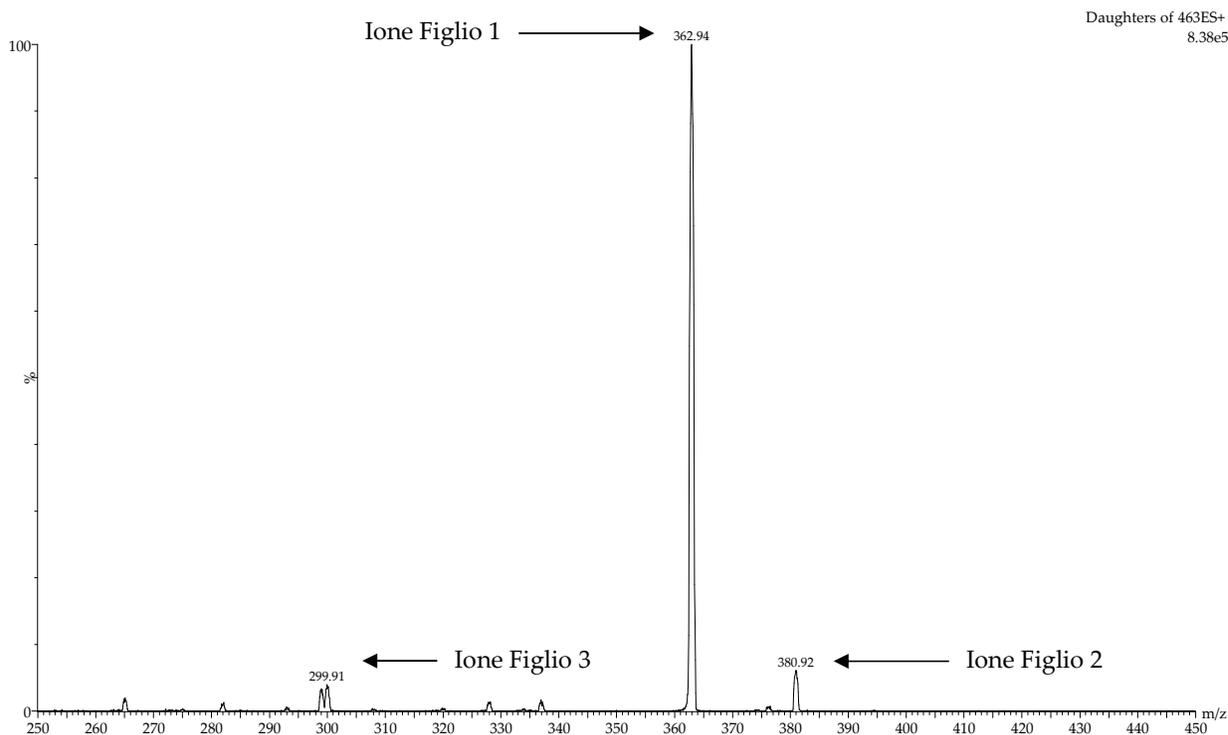


Figura.24 Spettro di massa del Rimonabant in modalità Daughter Scan o MS3 Scan.

In seguito alla somministrazione di un'energia di collisione di 35 si ha la frammentazione dello ione molecolare in ioni frammento con diversa abbondanza, il che rivela la probabilità che si abbia o meno quel tipo di rottura. Il picco figlio si trova in corrispondenza di m/z 362.9, ed è attribuibile alla perdita della porzione amminopiperidinica e di una molecola d'acqua da parte dello ione molecolare. Un altro ione individuabile è presente a 380.9 m/z attribuibile alla perdita della sola porzione amminopiperidinica. Lo ione a m/z 299 evidenziato nello spettro e altri a m/z 282 ed m/z 164 derivano da ulteriori frammentazioni a partire dalla ione a m/z 362.9. Infine frammenti a campi più bassi sono probabilmente legati ad un ulteriore frazionamento della porzione amminopiperidinica stessa (45).

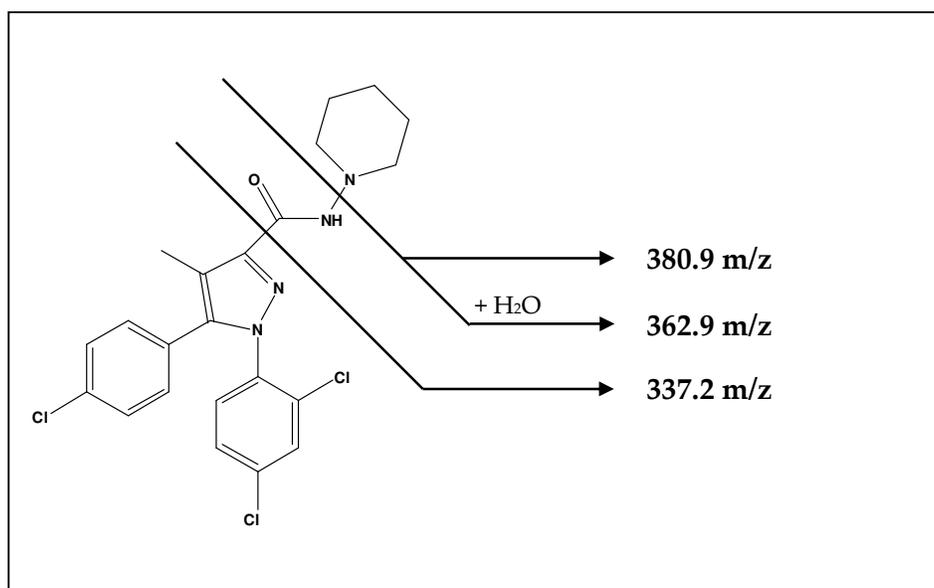


Figura.25 Schema di frammentazione del Rimonabant (46).

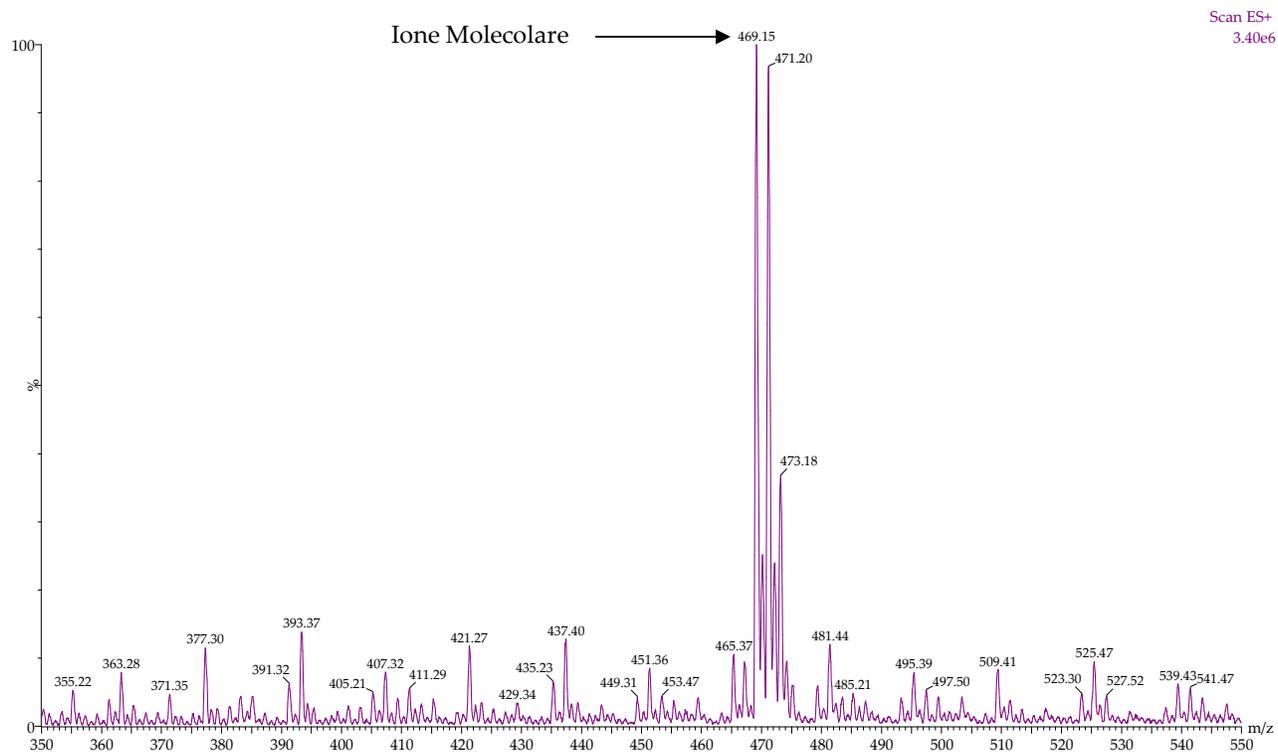


Figura.26 Spettro di massa del NESS014A in modalità Parent Scan o MS1 Scan.

Lo spettro di massa del NESS014A presenta un picco a m/z 469.1, corrispondente allo ione molecolare.

La presenza di altri picchi ad esso associati a $[M+2]$ 471.2 e $[M+4]$ 473.1 rivela e conferma la presenza di picchi isotopici dovuti alla presenza di atomi cloro nella struttura molecolare.

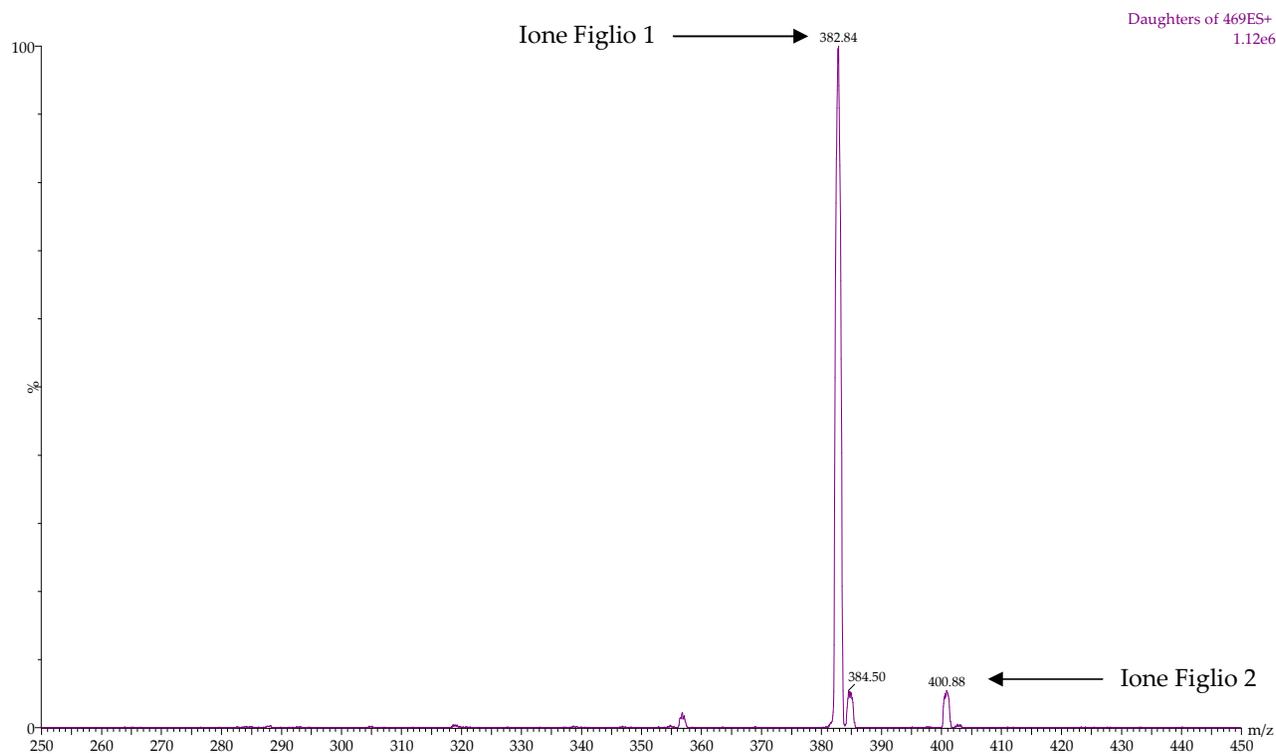


Figura.27 Spettro di massa del NESS014A in modalità Daughter Scan o MS3 Scan.

Con un'energia di collisione pari a 25 si ha la frammentazione dello ione molecolare in ioni figlio con diversa abbondanza. Il picco figlio si trova in corrispondenza di m/z 382.8, e per analogia con la frammentazione dell'SR141716A, è attribuibile alla perdita della porzione amminopirrolidinica e di una molecola d'acqua da parte dello ione molecolare. Un altro ione individuabile è presente a 400.8 m/z attribuibile alla perdita della sola porzione amminopirrolidinica. Frammenti a campi più bassi sono probabilmente legati ad un ulteriore frazionamento della porzione amminopirrolidinica stessa.

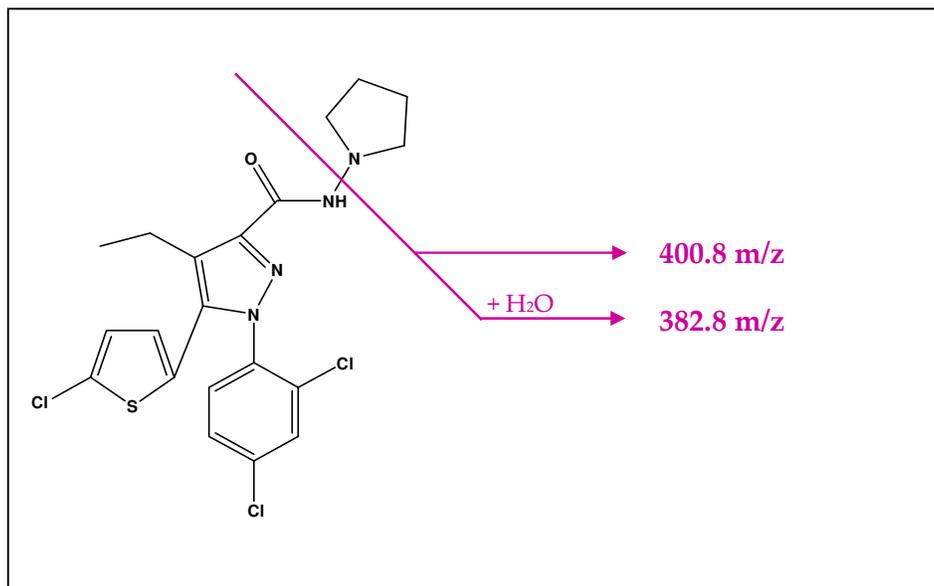


Figura.28 Schema di frammentazione del NESS014A.

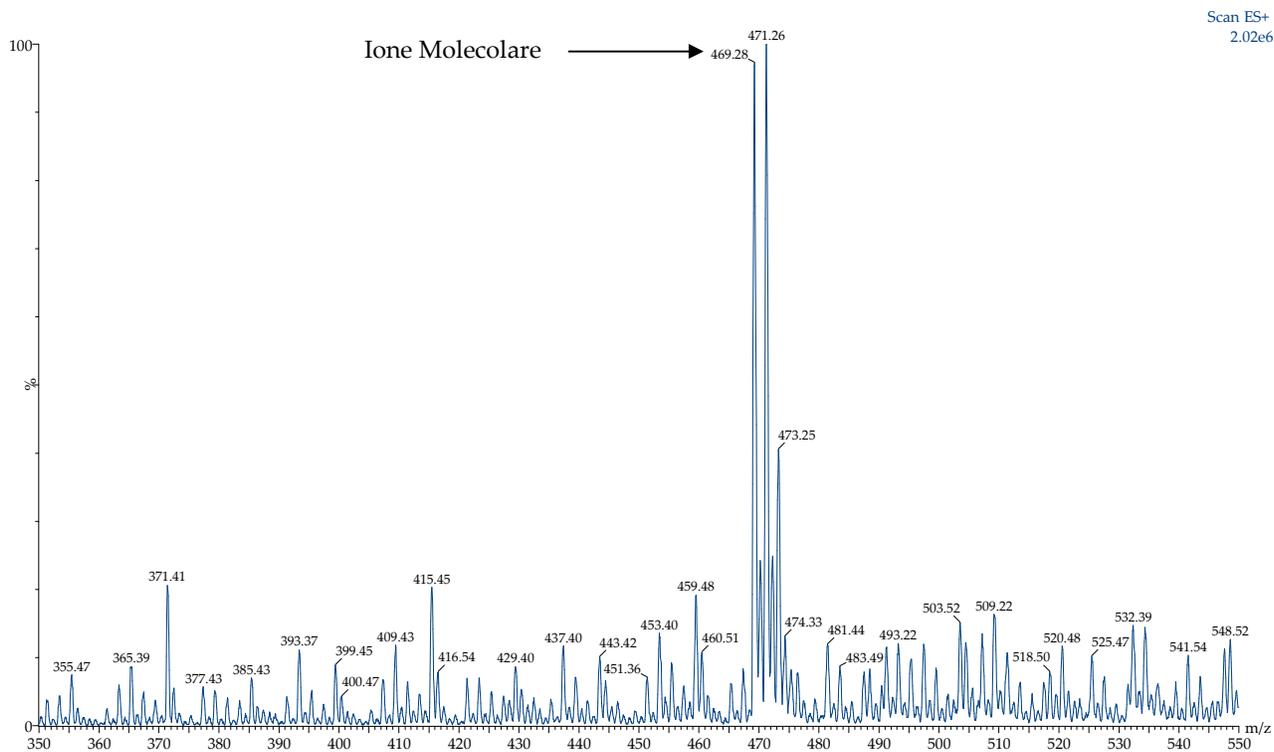


Figura.29 Spettro di massa del NESS006A in modalità Parent Scan o MS1 Scan.

Lo spettro di massa del NESS006A presenta un picco a m/z 469.2, corrispondente allo ione molecolare.

La presenza di altri picchi ad esso associati a $[M+2]$ 471.2 e $[M+4]$ 473.2 rivela e conferma la presenza di picchi isotopici dovuti alla presenza di atomi cloro nella struttura molecolare.

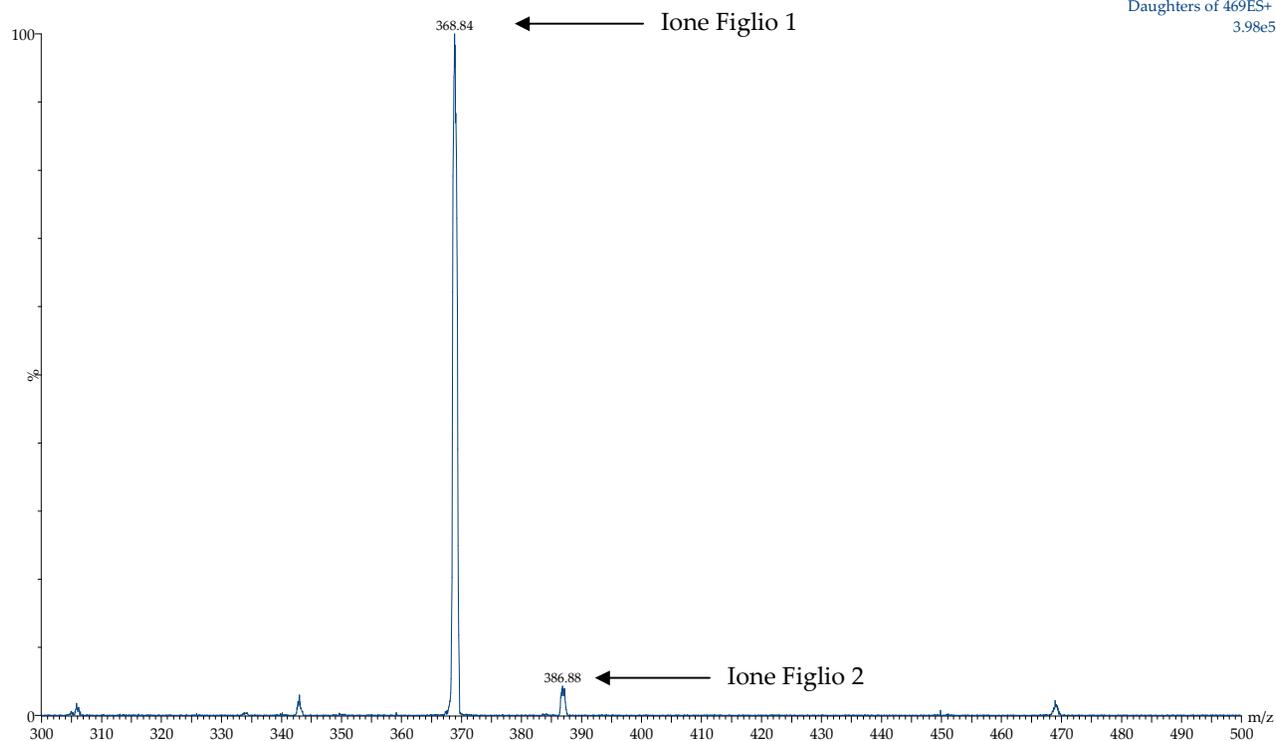


Figura.30 Spettro di massa del NESS006A in modalità Daughter Scan o MS3 Scan.

Impostando l'energia di collisione pari a 30 si ha la frammentazione dello ione molecolare in ioni figlio con diversa abbondanza. Il picco figlio si trova in corrispondenza di m/z 368.8, e per analogia con la frammentazione dell'SR141716A, è attribuibile alla perdita della porzione amminopiperidinica e di una molecola d'acqua da parte dello ione molecolare. Un altro ione individuabile è presente a 386.8 m/z attribuibile alla perdita della sola porzione amminopiperidinica. Frammenti a campi più bassi sono probabilmente legati ad un ulteriore frazionamento della porzione amminopiperidinica stessa.

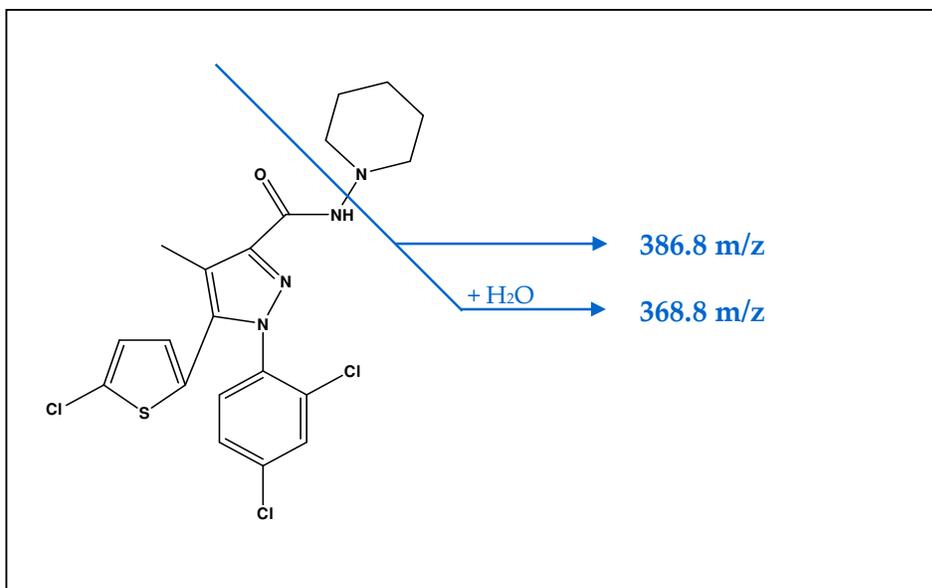
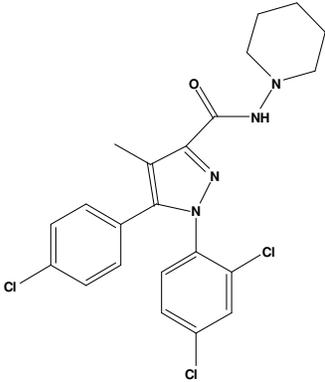
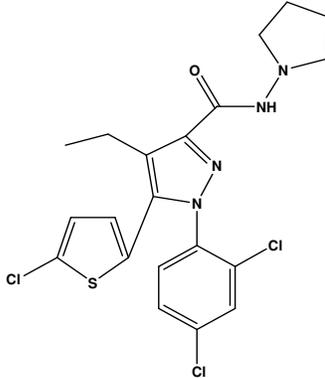


Figura.31 Schema di frammentazione del NESS006A.

4. Binding

L'SR141716A e i derivati di sintesi NESS014A 5-(5-chlorothiophen-2-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-N-(pyrrolidin-1-yl)-4-ethyl-1H-pyrazole-3-carboxamide e NESS006A 5-(5-chlorothiophen-2-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-N-(piperidin-1-yl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide sono stati testati per valutare l'affinità recettoriale nei confronti dei recettori CB₁ e CB₂. I test sono stati condotti mediante radioligand binding secondo la metodica indicata in *J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics* Vol. 306. 363-370 2003 (38).

Composto: SR141716A	Affinità
	K_i CB ₁ = 1.8 ± 0.075 nM
<p>N-piperidiny-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide</p>	K_i CB ₂ = 514 nM
Composto: NESS014A	Affinità
	K_i CB ₁ = 14.3 ± 0.7 nM
<p>5-(5-chlorothiophen-2-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-N-(pyrrolidin-1-yl)-4-ethyl-1H-pyrazole-3-carboxamide</p>	K_i CB ₂ = 1500 ± 289 nM

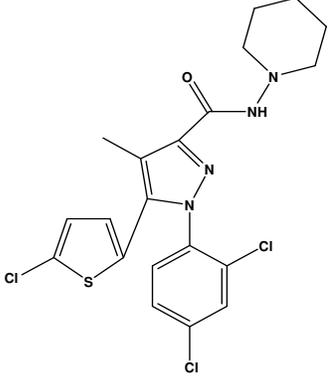
Composto: NESS006A	Affinità
	$K_i \text{ CB}_1 = 35 \pm 2.9 \text{ nM}$
<p>5-(5-chlorothiophen-2-yl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-N-(piperidin-1-yl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide</p>	$K_i \text{ CB}_2 = 476 \pm 3 \text{ nM}$

Figura.32 La tabella riporta le costanti di affinità di SR141716A, NESS014A e NESS006A relativamente ai recettori CB₁ e CB₂.

5. Test *ex vivo*: Organi Isolati

Allo scopo di investigare il profilo farmacologico dei nuovi composti sintetizzati, si è resa necessaria l'implementazione di una procedura in *ex vivo* mirata alla valutazione dell'attività CB₁ agonista/antagonista (38). La sperimentazione è stata condotta utilizzando come substrato il vaso deferente di topo e somministrando NESS006A e NESS014A prima del trattamento con WIN55,212-2 quale agonista di riferimento CB₁.

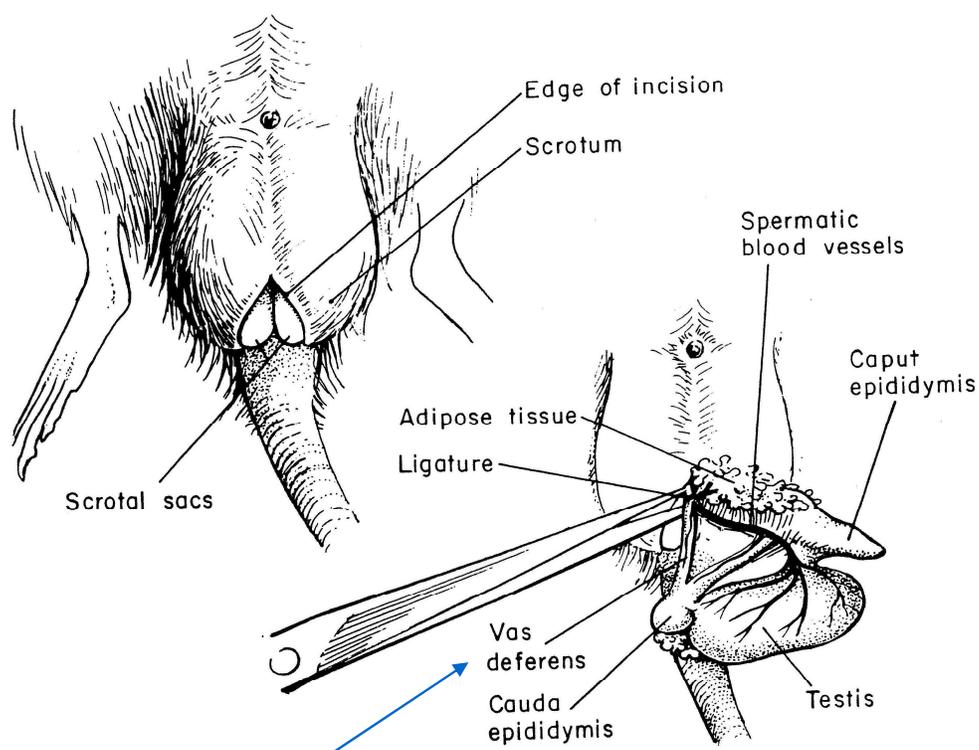


Figura.33 La figura mostra l'anatomia del Vas deferens nel ratto (47).

La metodica adottata ha previsto le seguenti fasi:

- a. prelievo dell'organo da topi CD1 (25-40g);
- b. montaggio dell'organo in un bagno per organi isolati, contenente una soluzione Krebs-Henseleit mantenuta a 37°C sotto flusso di una miscela O₂/CO₂ 95:5;
- c. induzione delle contrazioni dell'organo attraverso stimolazioni elettriche;
- d. amplificazione e monitoraggio delle contrazioni;
- e. verifica della riproducibilità della risposta contrattile;
- f. aggiunta del principio attivo da testare;
- g. valutazione della variazione dell'entità delle contrazioni rispetto al controllo.

Al fine di verificare l'attività antagonista del campione da testare, la procedura generale sopra riportata è stata ripetuta aggiungendo il composto CB₁ agonista WIN55,212-2 (composto di riferimento) venti minuti dopo l'aggiunta del NESS006A e NESS014A da testare. L'attività antagonista è stata rilevata attraverso l'osservazione di una riduzione dell'inibizione della contrazione dell'organo provocata dal composto agonista di riferimento WIN55,212-2.

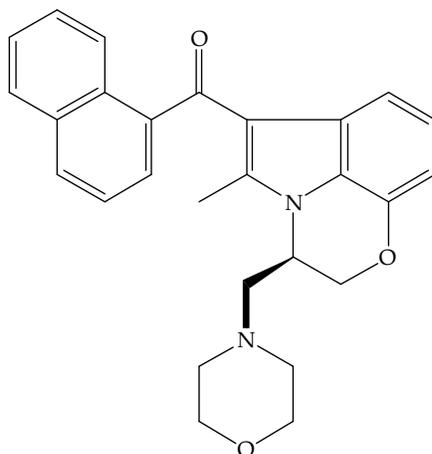


Figura.34 Formula di struttura del WIN55,212-2.

SR141716A

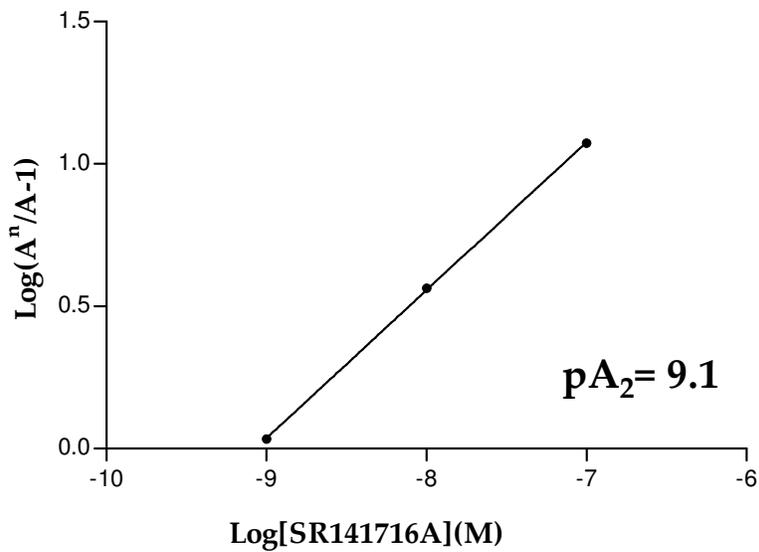
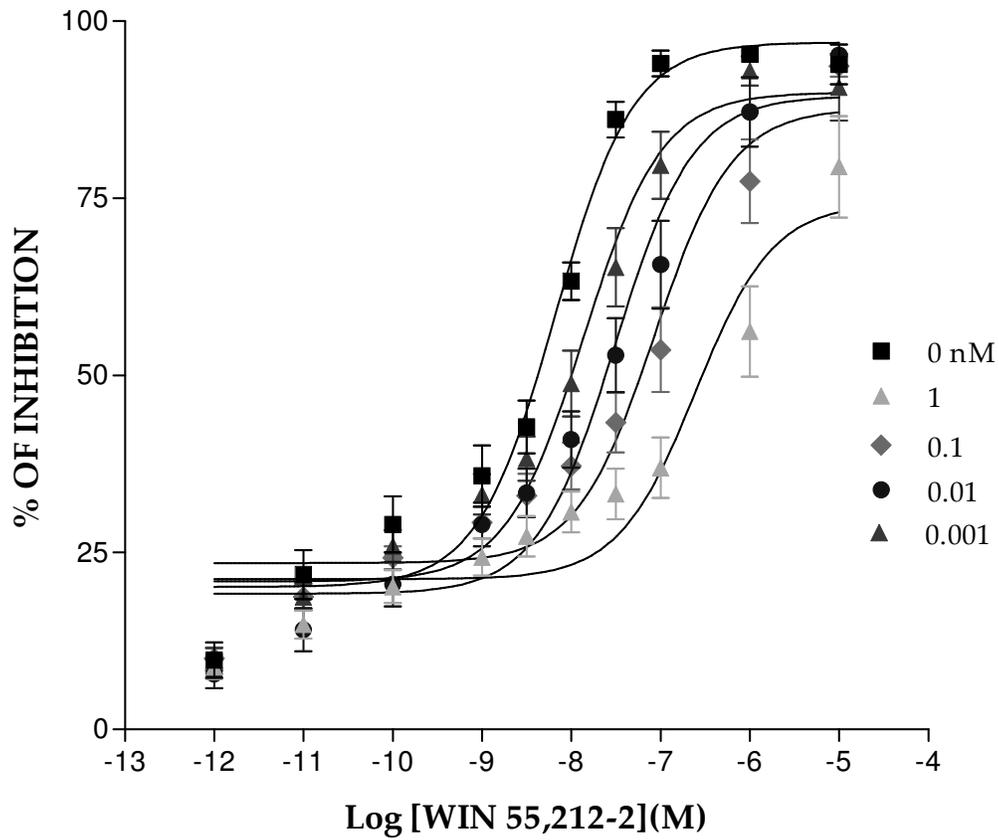


Figura.35 Curve concentrazione-risposta di WIN55,212-2 sull'inibizione delle contrazioni indotte da una stimolazione elettrica, in presenza o in assenza di differenti concentrazioni di SR141716A.

NESS014A

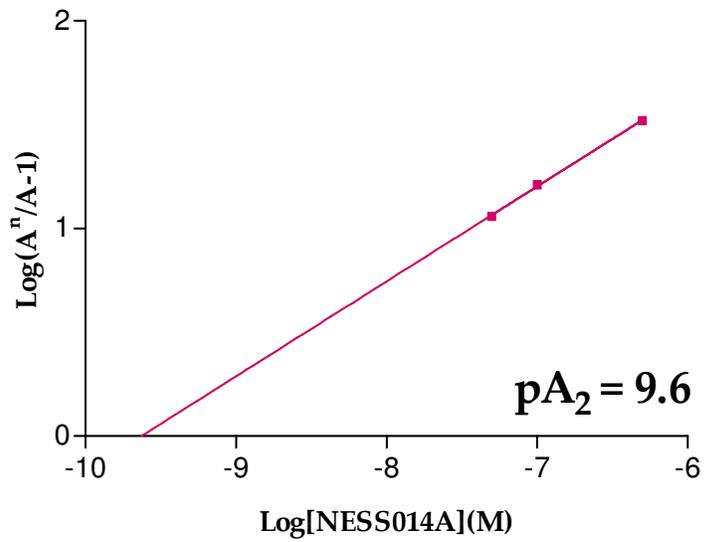
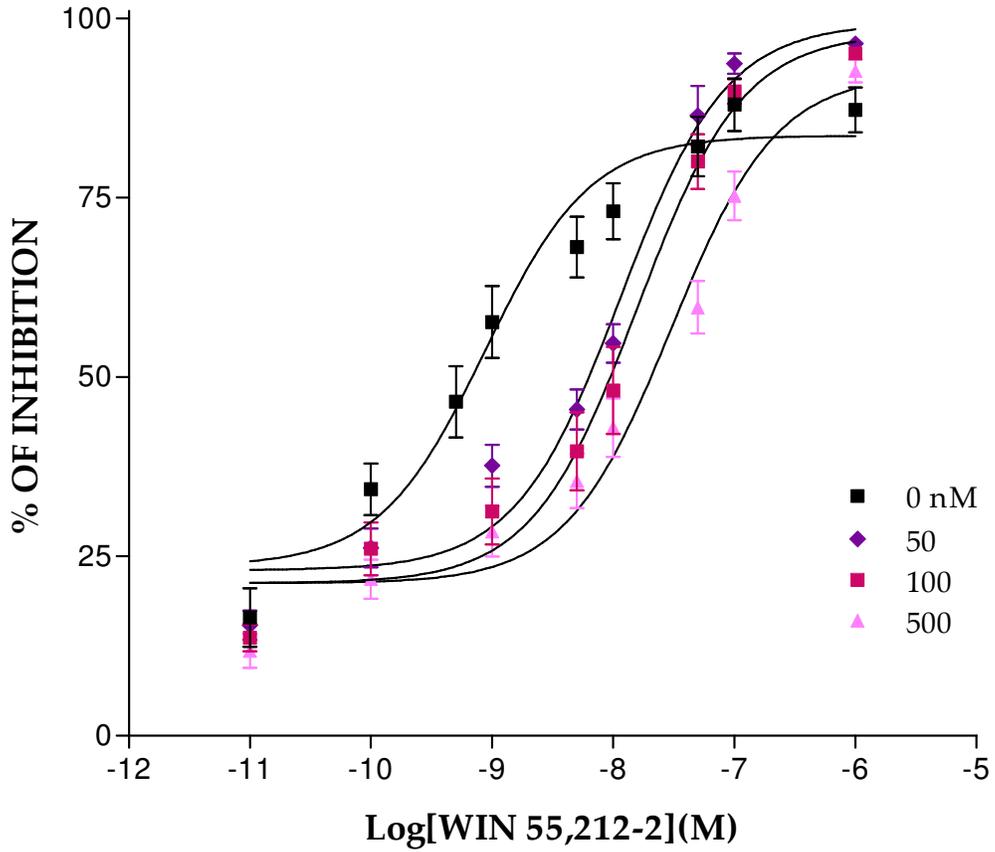


Figura.36 Curve concentrazione-risposta di WIN55,212-2 sull'inibizione delle contrazioni indotte da una stimolazione elettrica, in presenza o in assenza di differenti concentrazioni di NESS014A.

NESS006A

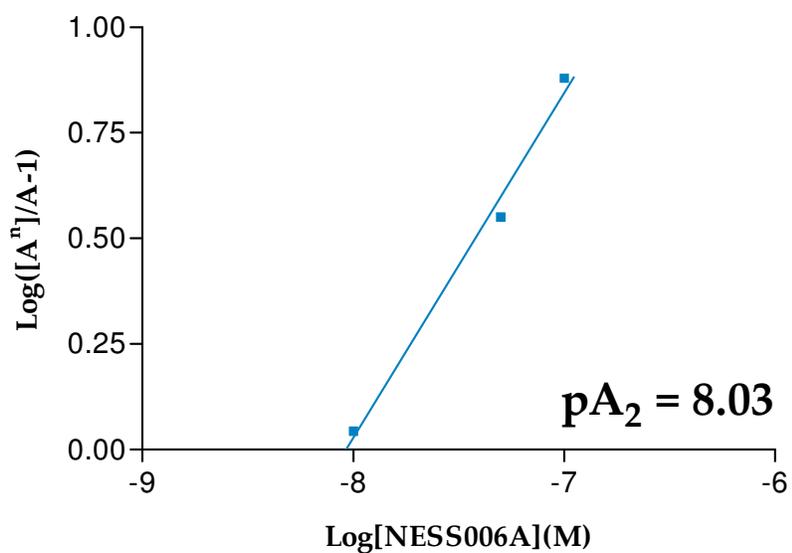
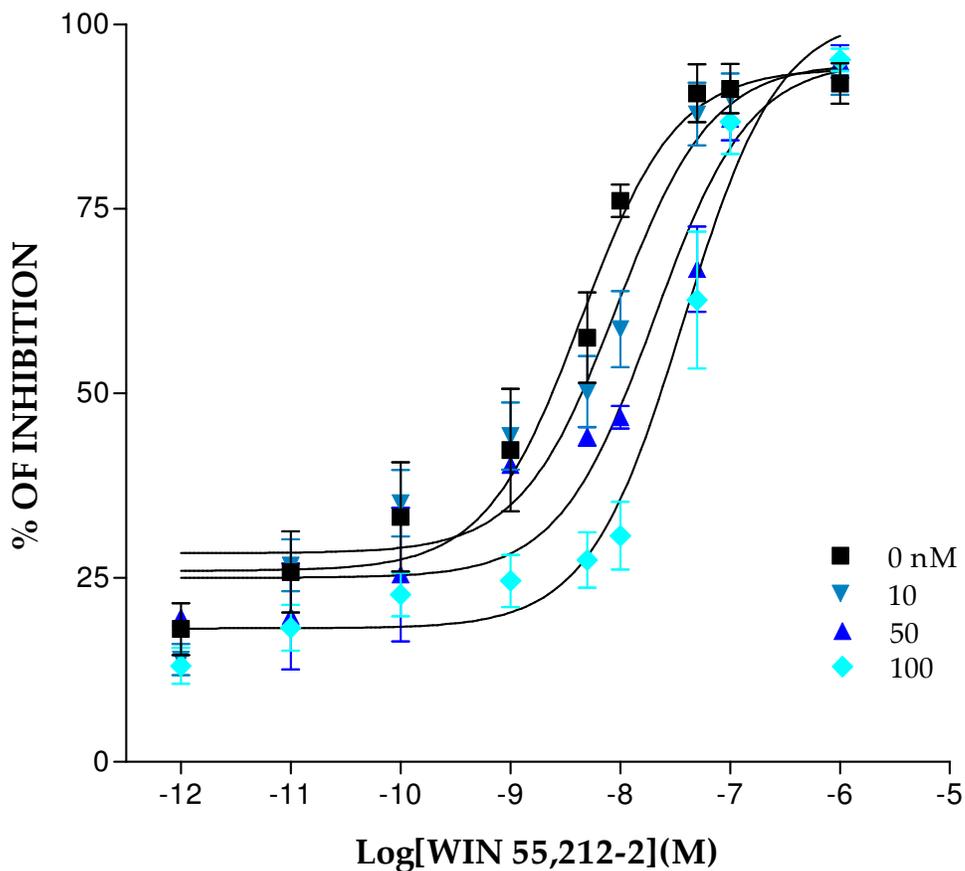


Figura.37 Curve concentrazione-risposta di WIN55,212-2 sull'inibizione delle contrazioni indotte da una stimolazione elettrica, in presenza o in assenza di differenti concentrazioni di NESS006A.

Le curve dose-effetto per i nuovi derivati sono state determinate in presenza di concentrazioni crescenti di agonista competitivo (48). I risultati sopra riportati hanno evidenziato l'attività antagonista dei nuovi derivati tiofenici nei confronti dei recettori CB₁. Inoltre si è evidenziato come la capacità dell'SR141716A di antagonizzare l'effetto del WIN55-212-2 sia maggiore rispetto ai nuovi derivati, in particolare l'attività antagonista è riscontrabile già a concentrazioni di almeno un ordine di grandezza inferiore. Lo Schild plot è stato utilizzato per il calcolo della pA₂ attraverso il quale è stata espressa la potenza relativa a ciascuna molecola testata.

6. Biodisponibilità e farmacocinetiche

Per valutare l'effetto della struttura chimica e il passaggio di membrana, in particolare la permeabilità attraverso la barriera ematoencefalica, è stato sviluppato e validato un metodo bioanalitico basato sull'utilizzo di un sistema HPLC/MS/MS. Lo studio ha portato all'ottenimento, per ciascuna delle molecole studiate, del rispettivo profilo concentrazione/tempo nel siero e nel cervello di ratto e al calcolo dei parametri farmacocinetici da esso derivanti. Lo studio è stato condotto con rigoroso rispetto delle Buone Pratiche di Laboratorio (BPL) in accordo con le linee guida FDA.

6.1. Procedura Sperimentale

6.1.1. Animali e Chirurgia

I ratti del ceppo CD Sprague Dawley di sesso maschile sono stati trattati con una soluzione 1 mg/Kg di SR141716A, NESS014A o NESS006A, attraverso iniezione in vena giugulare. Per effettuare la somministrazione si è reso necessario l'impianto di una cannula all'interno della vena giugulare. Ciascun ratto, è stato anestetizzato con una soluzione di Equitesin somministrata per via intraperitoneale. L'operazione è stata effettuata in ambienti perfettamente sterili e a temperatura e umidità controllate, inoltre durante la chirurgia sono state adottate tutte le misure precauzionali atte ad evitare possibili processi infettivi ed eventuale occlusione della cannula dovuto a sanguinamento e/o a un danno tissutale. I farmaci sono stati somministrati in seguito a dissoluzione in una formulazione composta da etanolo, cremophor e salina, nel rapporto di 1:1:18.

Il prelievo dei campioni biologici è stato effettuato in seguito a sacrificio dell'animale mediante ghigliottina, ed è stato condotto a differenti tempi di campionamento a partire dai 2 minuti fino ai 1440 minuti post dose, dopo somministrazione in acuto di SR141716A, NESS006A o NESS014A. Il campionamento è stato effettuato anche al tempo zero (pre-dose), in seguito alla somministrazione dalla sola soluzione utilizzata per la veicolazione dei farmaci. Sono state così ottenute le curve concentrazione/tempo sia nel sangue che nel cervello e le rispettive analisi farmacocinetiche.

6.1.2. Raccolta dei campioni

Il siero, prelevato dall'animale, e raccolto in tubi da 50 ml, precedentemente etichettati, viene lasciato riposare e poi sottoposto a due cicli di centrifugazione. Il surnatante ottenuto viene trasferito in nuove provette preventivamente etichettate con un codice di riferimento e conservate in freezer a -20° C. I cervelli, prelevati appena dopo il sacrificio

dell'animale, sono stati messi in un tubo preventivamente etichettato e conservati momentaneamente in ghiaccio. Successivamente sono stati lavati con soluzione salina, pesati e asciugati, se non immediatamente processati, conservati in freezer a -80°C in tubi etichettati con un codice di riferimento.

6.1.3. Soluzioni

Le soluzioni stock di SR141716A, NESS014A, e NESS006A sono state preparate in metanolo alla concentrazione di 1 mg/ml. Le soluzioni working contenenti i farmaci sono state ottenute per diluizione delle soluzioni stock con acetonitrile:acqua 90:10.

6.1.4. Processamento campioni (49, 50)

I campioni di entrambe le matrici siero e cervello sono stati purificati attraverso procedure di estrazione su fase solida (SPE) secondo la procedura riportata in figura.

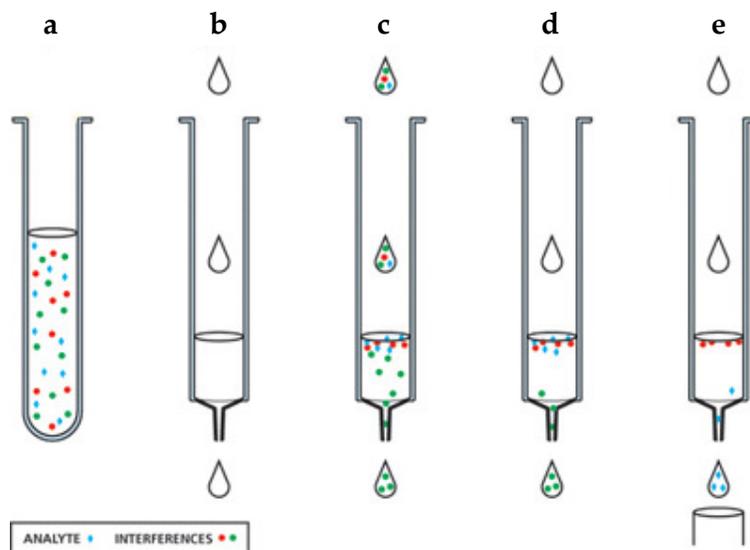


Figura.38 Schema di estrazione in fase solida di campioni in matrice siero e cervello (51).

6.1.4.1. Procedura di estrazione dei campioni di siero (52)

L'estrazione è stata effettuata attraverso l'utilizzo delle cartucce UCT 200 mg, 3 ml.

- a Preparazione del campione costituito da 1 ml di siero (compresa l'aggiunta dello Standard Interno IS), 2 ml di tampone ammonio formiato 10 mM a pH= 6.
- b Condizionamento della cartuccia con metanolo, acqua e ammonio formiato 10 mM a pH= 6.
- c Caricamento del campione.
- d Lavaggio della cartuccia con acqua, acido acetico 1 M e metanolo.
- e Eluizione con una soluzione tripla costituita da diclorometano, isopropanolo e idrossido d'ammonio.

6.1.4.2. Procedura di estrazione dei campioni di cervello (52)

I cervelli prima dell'estrazione sono stati omogenati con l'aggiunta di una soluzione di KCl al 1.15% e una di acido acetico glaciale:acetonitrile 2:98. L'estrazione è stata effettuata attraverso l'utilizzo delle cartucce Discovery 100 mg da 1 o 3 ml.

- a Preparazione del campione costituito da 1 ml di surnatante ottenuto dall'omogenato (compresa l'aggiunta dello Standard Interno IS), 2 ml di tampone ammonio formiato 10 mM a pH=6.
- b Condizionamento della cartuccia con metanolo, acqua e ammonio formiato 10 mM a pH=6.
- c Caricamento del campione.
- d Lavaggio della cartuccia con acqua, acido acetico 1 M e metanolo.
- e Eluizione con una soluzione tripla costituita da diclorometano, isopropanolo e idrossido d'ammonio.

I campioni così ottenuti sono stati poi svaporati sotto flusso di azoto e ripresi con una soluzione acetonitrile:acqua 90:10, successivamente sono stati congelati in freezer a -20°C .

6.2. Analisi quantitativa

La spettrometria di massa è uno dei sistemi più sensibili ed allo stesso tempo più selettivo. La LC/MS/MS è una tecnica altamente specifica che permette di identificare e quantificare con estrema sicurezza composti presenti in tracce (pesticidi, ormoni, vitamine, metaboliti di farmaci) in matrici complesse. Un grandissimo numero di analisi ufficiali sono basate sulla spettrometria di massa, in accoppiamento alla cromatografia. La combinazione della cromatografia in fase liquida con un rivelatore di massa può dare al chimico analitico la possibilità di analizzare praticamente ogni specie di molecola; includendo sostanze termolabili, sostanze non volatili, e composti ad alto peso molecolare ottenendo informazioni dal punto di vista quantitativo relativamente ad un analita specifico.

6.2.1. Metodo Cromatografico

La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando un sistema HPLC Waters separation module Alliance 2695. La cromatografia è stata condotta utilizzando una colonna Xbridge C18 2.1*100, 3.5µm, a 35°C. Il flusso di fase mobile è stato settato a 0.2 ml/min e 5 µl di campione sono stati iniettati per ciascuna analisi. L'iniezione è stata gestita attraverso un sistema di pescaggio automatizzato da un autocampionatore mantenuto alla temperatura di 15° C.

Il gradiente di fase mobile scelto è riportato nel seguente schema:

Time (min.)	A%	B%	Flusso ml/min
0.0	30	70	0.2
16.0	99	1	0.2
22.0	99	1	0.2

23.0	30	70	0.2
35.0	30	70	0.2

Figura.39 Schema di eluizione in gradiente per la determinazione di SR141716A, NESS014A, e NESS006A.

6.2.2. Metodo MS/MS

La quantificazione è stata effettuata in MRM mode (Multiple Reaction Monitoring). Questa modalità è quella di elezione per l'analisi di farmaci, pesticidi e inquinanti ambientali ed è quella più selettiva e a più alta sensibilità. Ciò è reso possibile grazie al monitoraggio di uno specifico ione padre che viene frammentato per produrre un solo specifico ione figlio. L'MRM permette inoltre, l'eliminazione di eventuali interferenze dovute alla presenza di una matrice nel campione, riducendo di conseguenza il numero dei campioni preparati.

L'analisi è stata condotta in positive ion electrospray mode utilizzando un Quattro Micro triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Waters).

Le condizioni impostate per la sorgente sono:

Voltaggio Capillare: 1kV

Temperatura sorgente: 120°C

Temperatura di Desolvatazione: 350°C

Gas di desolvatazione: 800L/hr

Gas del cono: 50L/hr

Pressione Gas Cella Pirani: $3/4 \times 10^{-3}$ mbar

Dwell Time: 100 msec.

Inter-Scan delay: 100 msec.

Inter-Channel delay: 0.02 sec.

Le coppie ioniche precursore/prodotto (padre/figlio) monitorate sono riportate nello schema seguente:

Composto	Transizione
SR141716A	463.2 > 362.9
NESS014A	469.1 > 382.8
NESS006A	469.2 > 368.8

Figura.40 Schema delle transizioni monitorate.

I campioni standard sono stati preparati aggiungendo una quantità nota di soluzione working nel siero o nel cervello bianco (non trattato). Le rette di calibrazione sono state ottenute interpolando il rapporto tra l'area dello standard con quella dello standard interno in funzione della rispettiva concentrazione e per ciascun punto della calibrazione. Le rette di SR141716A e NESS006A sono state ottenute utilizzando il NESS014A come standard interno, mentre la retta del NESS014A utilizzando l'SR141716A.

6.2.3. Validazione metodo

La validazione del metodo è stata applicata allo studio di tutte e tre le sostanze oggetto dello studio in entrambe le matrici sangue e cervello.

6.2.3.1. Specificità

La specificità è stata valutata attraverso l'analisi di campioni bianchi, bianchi zero (con la sola aggiunta dello standard interno) e campioni al più basso limite di quantificazione (LLOQ). Al tempo di ritenzione dell'analita, le aree delle sostanze nei bianchi e nei bianchi zero sono risultate non rilevabili o inferiori a 1/3 dell'area del LLOQ.

6.2.3.2. Limite di quantificazione

Il più basso limite di quantificazione (LLOQ) è definito come la più bassa concentrazione per la quale l'analisi sia sufficientemente accurata (80-120%) e precisa, con un coefficiente di variazione (CV%) uguale o inferiore al $\pm 20\%$ ottenuto su tre misurazioni. In figura sono riportati i valori di LLOQ ottenuti per ciascuna sostanza:

LLOQ Sostanza	Matrice siero	Matrice cervello
SR141716A	1.5 ng/ml	0.3 ng/ml
NESS014A	0.15 ng/ml	0.5 ng/ml
NESS006A	0.15 ng/ml	0.15 ng/ml

Figura.41 LLOQ di SR141716A, NESS014A e NESS006A in entrambe le matrici.

Tutte le misurazioni effettuate sono risultate accurate e precise.

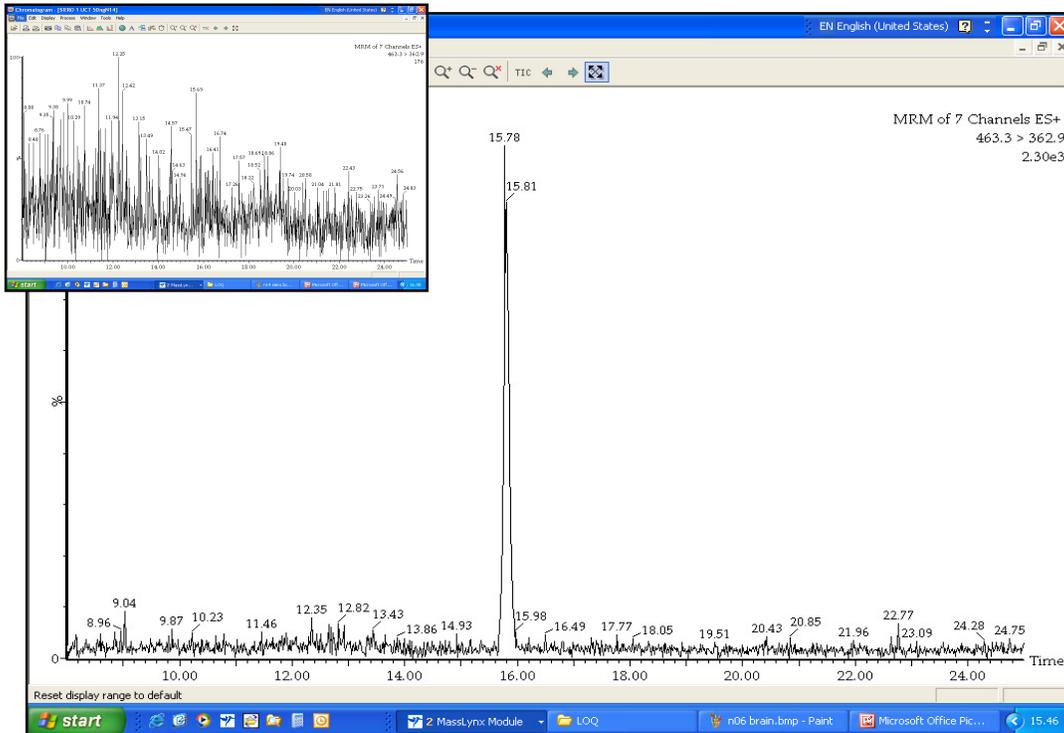


Figura.42 LLOQ e campione bianco dell'SR141716A in matrice siero.

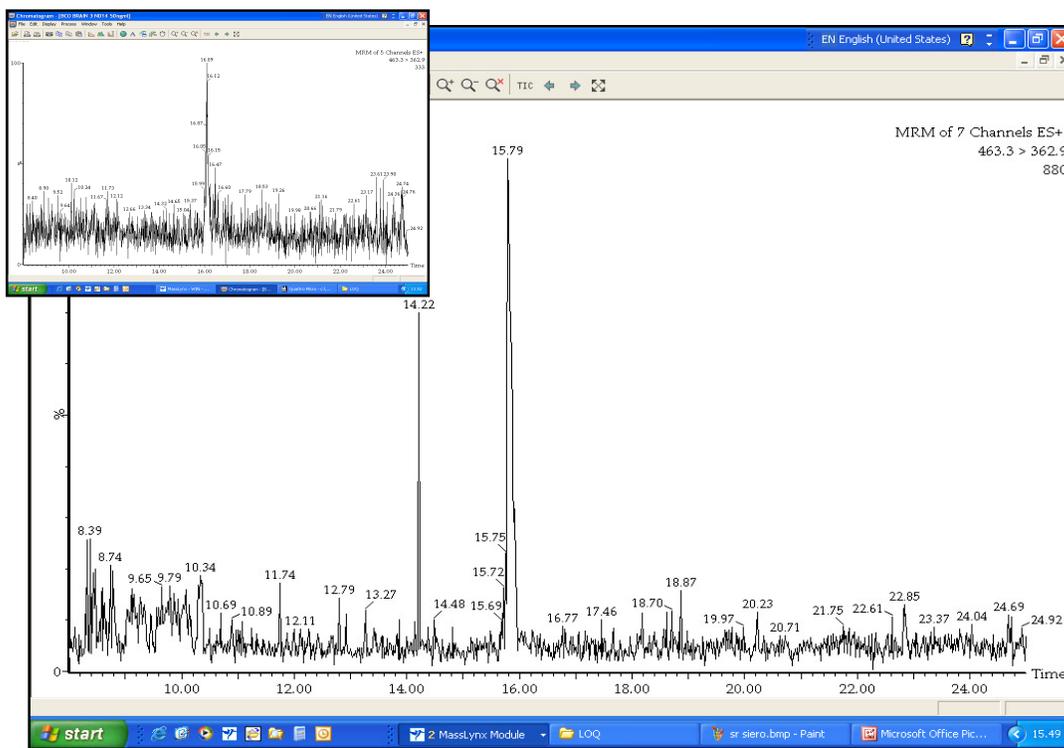


Figura.43 LLOQ e campione bianco dell'SR141716A in matrice cervello.

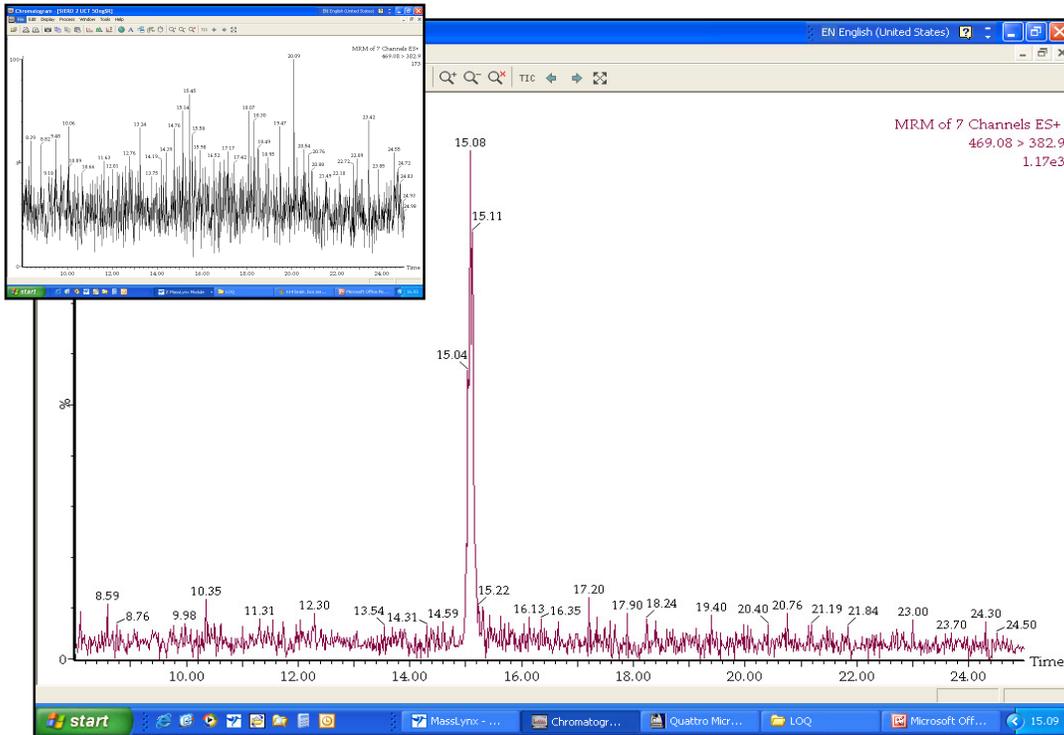


Figura.44 LLOQ e campione bianco del NESS014A in matrice siero.

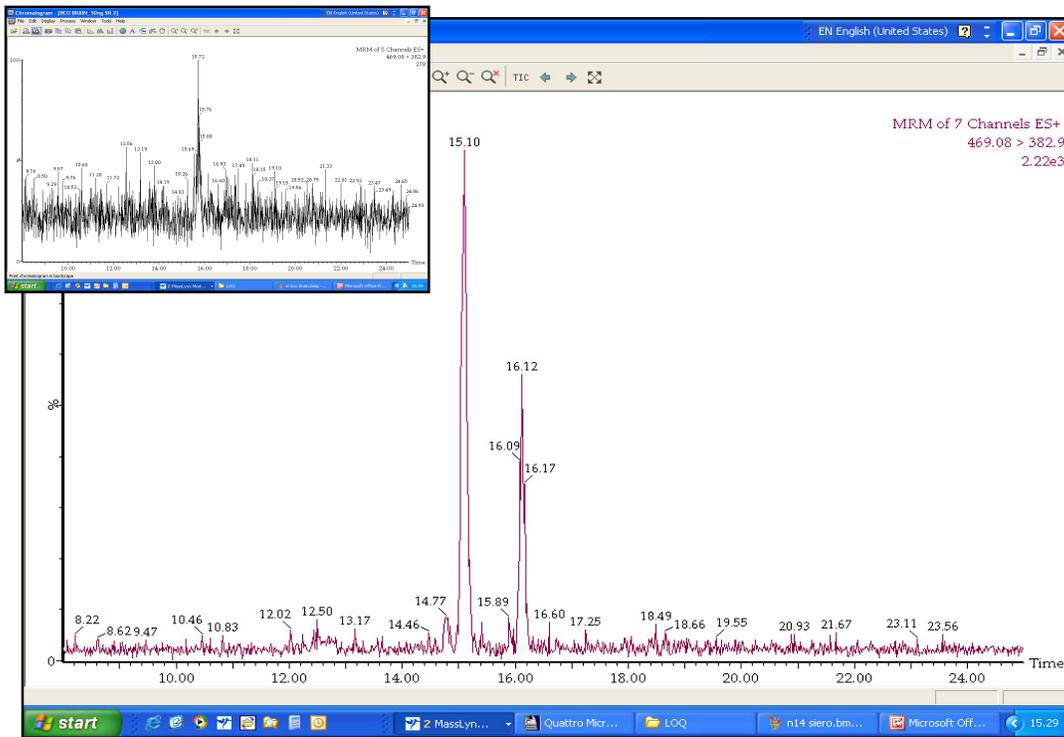


Figura.45 LLOQ e campione bianco del NESS014A in matrice cervello.

6.2.3.3. Limite di rilevabilità

Il limite di rivelabilità (LOD) indica invece la concentrazione minima alla quale è possibile affermare con sufficiente certezza la presenza o meno di un determinato analita. In figura sono riportati i valori di LLOQ ottenuti per ciascuna sostanza:

LOD Sostanza	Matrice siero	Matrice cervello
SR141716A	0.2 ng/ml	0.1 ng/ml
NESS014A	0.1 ng/ml	0.05 ng/ml
NESS006A	0.1 ng/ml	0.02 ng/ml

Figura.48 LOD di SR141716A, NESS014A e NESS006A in entrambe le matrici.

6.2.3.4. Accuratezza e precisione

I valori di accuratezza e la precisione intra-day e inter-day sono stati determinati con l'analisi di campioni standard utilizzati come controlli di qualità (QCs). I QCs sono stati analizzati in triplicato a quattro livelli di concentrazione. L'accuratezza ottenuta è risultata compresa tra l'85 e il 115% del valore nominale e la precisione entro un valore massimo di CV% del 15%, eccetto per il LLOQ con un range di accettazione pari a 80-120% e un CV% del $\pm 20\%$ rispettivamente.

6.2.3.5. Linearità

Le curve di calibrazione sono state ottenute utilizzando almeno cinque standard di calibrazione, i campioni bianchi e i campioni bianco zero. Il mantenimento della linearità è stato indagato nel range 0.15-100 ng/ml per quanto riguarda il NESS006A in entrambe le matrici e per il NESS014A in siero, mentre per il cervello il range indagato è stato 0.5-100

ng/ml. Relativamente all'SR141716A, gli intervalli di linearità studiati sono stati 1.5-100ng/ml e 0.3-200ng/ml rispettivamente in siero e cervello. L'equazione della retta è stata calcolata usando un weighting factor $1/x$. Tutte le concentrazioni retrocalcolate hanno mostrato un'accuratezza compresa tra l'85 e il 115% del valore nominale (80-120% al LLOQ). Tutte le curve hanno inoltre raggiunto un $r^2 \geq 0.99$.

6.2.3.6. Recovery e effetto matrice

Il recovery, ovvero il recupero percentuale della sostanza durante le fasi di preparazione del campione, è stato determinato confrontando l'area di QCs (bassa, media e concentrazione alta) che sono stati addizionati con l'appropriato quantitativo di soluzione working prima e dopo la procedura di estrazione. Il recovery medio dei tre analiti in entrambe le matrici si è attestato a ~ 80% con un coefficiente di variazione $\leq 25\%$. Non è stato riscontrato nessun effetto dovuto alla matrice utilizzata.

6.2.3.7. Carry over

Il carry over è stato misurato analizzando uno o più campioni di solvente immediatamente dopo l'analisi di QCs a bassa, media e alta concentrazione, per monitorare il trascinamento degli analiti. Non è stato riscontrato alcun fenomeno di carry over, il quale è stato comunque monitorato inserendo alla fine e in alcuni casi anche a metà samples list, un'analisi di solo solvente.

6.2.3.8. Monitoraggio metodo validato

Una volta validato, il metodo analitico è stato monitorato regolarmente durante le analisi di routine, perché si possa assicurare che il metodo continui ad essere soddisfacente.

Questo è stato fatto mediante l'utilizzo dei QCs, che hanno rispettato la stessa accuratezza e la precisione prevista per i test di precisione e accuratezza al paragrafo 6.2.3.4.).

6.3. Curve concentrazione/tempo

6.3.1. Siero curve concentrazione/tempo

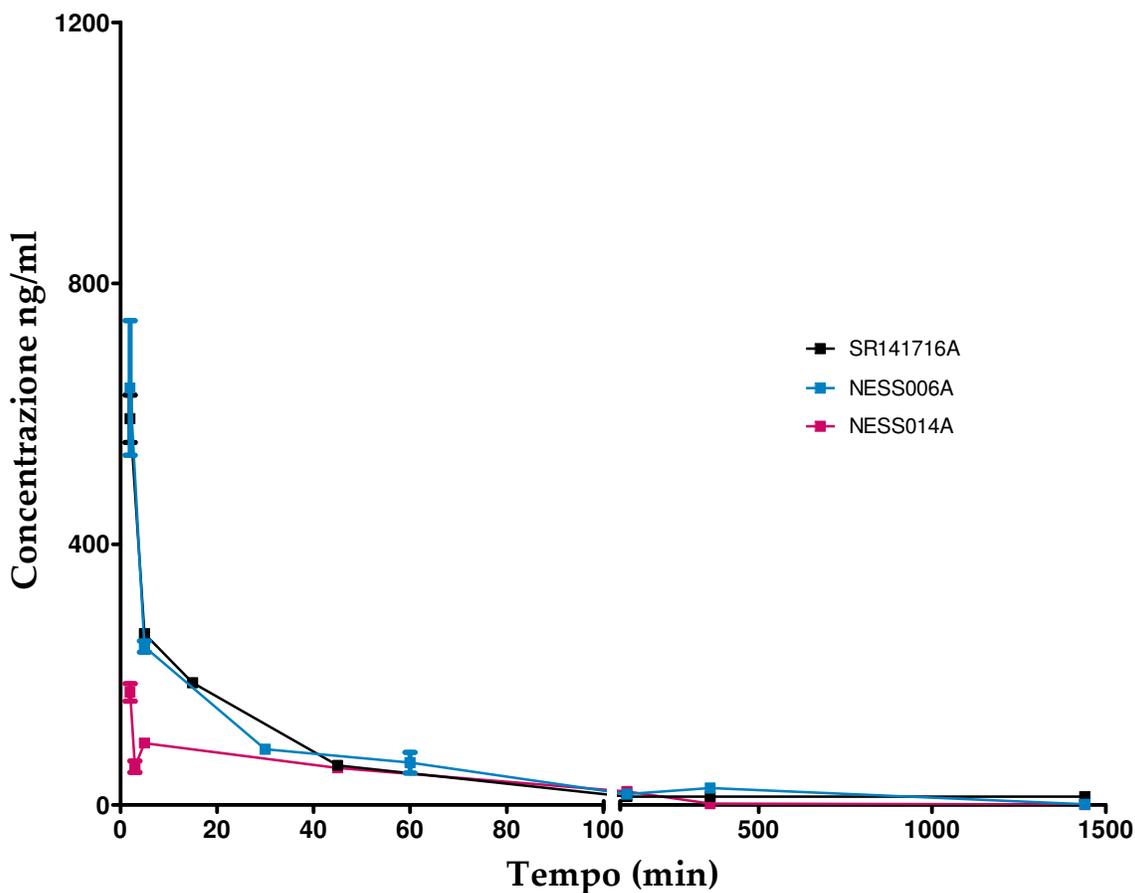


Figura.49 Profilo concentrazione/tempo di SR141716A, NESS014A e NESS006A in matrice siero.

Il profilo concentrazione/tempo dell'SR141716A, NESS006A e NESS014A in matrice siero in seguito a somministrazione in vena giugulare (1mg/kg) è mostrato in figura 49. I dati sono espressi come media di almeno tre animali per ciascun tempo di campionamento. Tutte le molecole seguono lo stesso andamento e i livelli sierici raggiungono la concentrazione massima ai 2 minuti post-dose e poi diminuiscono nel tempo. Il profilo dei nuovi derivati tiofenici appare leggermente più basso rispetto al composto di riferimento

SR141716A. In particolare il NESS014A ha evidenziato una minore distribuzione nei primi 2 e 5 minuti post-dose.

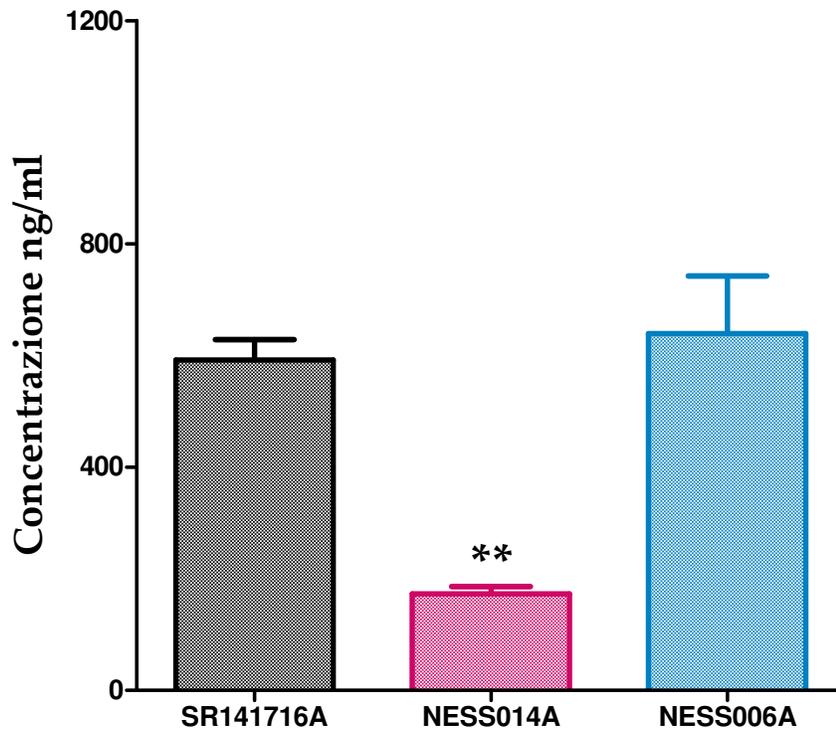


Figura.50 Concentrazione di SR141716A, NESS014A e NESS006A in matrice siero al tempo di campionamento 2 minuti.

E' da sottolineare che ai due minuti post-dose il NESS014A ha mostrato una risposta significativamente più bassa sia rispetto al composto di riferimento, sia rispetto al NESS006A. La significatività è stata calcolata attraverso i test ANOVA a una via e mediante t- test (GraphPad Prism 5.01 San Diego, CA) .

6.3.2. Cervello curve concentrazione/tempo

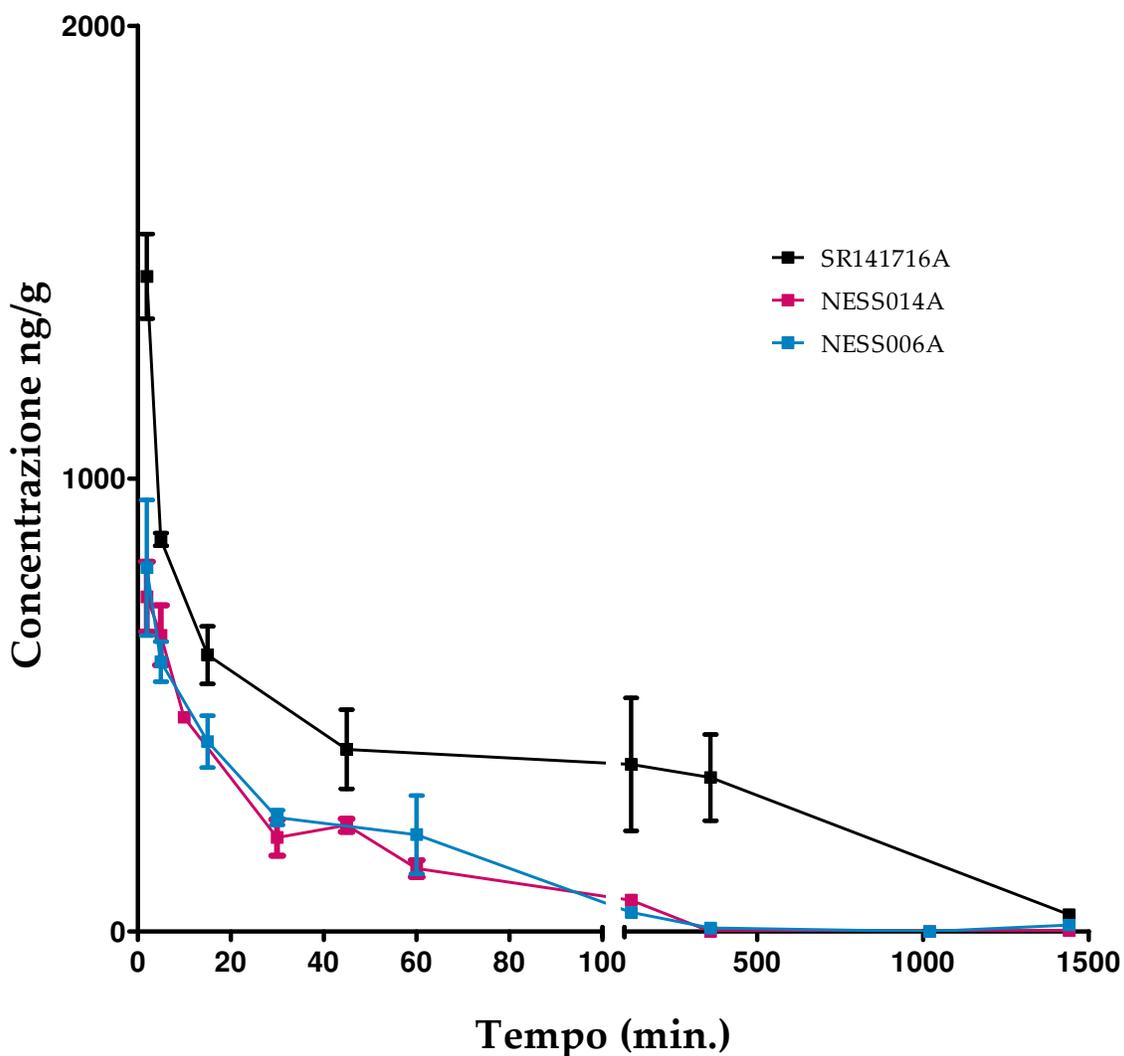


Figura.51 Profilo concentrazione/tempo di SR141716A, NESS014A e NESS006A in matrice cervello.

Il profilo concentrazione/tempo dell'SR141716A, NESS006A e NESS014A in matrice cervello in seguito a somministrazione in vena giugulare (1mg/kg) è mostrato in figura 51. I dati sono espressi come media di almeno tre animali per ciascun tempo di campionamento. Tutte le molecole seguono lo stesso andamento con una concentrazione massima che viene raggiunta ai 2 minuti post-dose e poi diminuiscono nel tempo. Il

profilo dei nuovi derivati tiofenici appare più basso rispetto al composto di riferimento SR141716A.

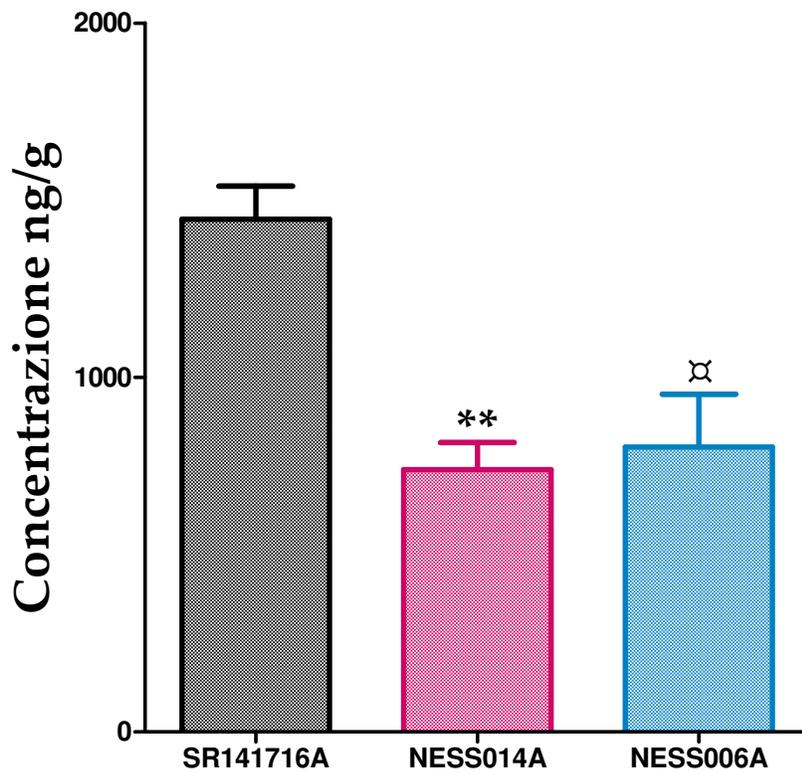


Figura.52 Concentrazione di SR141716A, NESS014A e NESS006A in matrice cervello al tempo di campionamento 2 minuti.

E' evidente come ai due minuti il NESS014A e il NESS006A mostrino una risposta significativamente più bassa rispetto all'SR141716A. La significatività è stata calcolata attraverso i test ANOVA a una via e mediante t- test (GraphPad Prism 5.01 San Diego, CA).

6.4. Farmacocinetica

La farmacocinetica si propone di studiare l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'eliminazione (ADME) dei farmaci nell'uomo o nell'animale. Assorbimento e distribuzione indicano rispettivamente il passaggio delle molecole di farmaco dal sito di somministrazione al sangue e il passaggio delle molecole di farmaco dal sangue ai tessuti. Con il processo di eliminazione si intende sia il metabolismo del farmaco in vivo, sia il passaggio delle molecole dal sangue all'esterno del corpo attraverso le urine, la bile e le feci o altre vie. Misurando le concentrazioni di farmaco nel sangue, nei tessuti o in altri liquidi e distretti dell'organismo a vari tempi dopo la somministrazione, si possono ottenere informazioni sui passaggi delle molecole di farmaco e sull'eliminazione del farmaco stesso. (53-55)

I parametri farmacocinetici sono stati stimati attraverso un'Analisi Compartmentale Bioesponenziale mediante l'applicazione del modello IV bolus ad una curva concentrazione vs tempo in cui l'intervallo di tempo investigato è 2 minuti- 1440 minuti. Il calcolo dei parametri è stato eseguito attraverso l'utilizzo del software WinNonLin 5.1.

Matrice Siero	Parametri			
	C _{max}	t _{1/2} distribuzione	t _{1/2} eliminazione	AUC
Molecole				
SR141716A	489 ng/ml	0.13 ore	5.8 ore	630 h*ng/ml
NESS006A	438 ng/ml	0.21 ore	4.9 ore	417 h*ng/ml
NESS014A	137 ng/ml	0.67 ore	3.5 ore	143 h*ng/ml

Figura.53 Calcolo dei parametri farmacocinetici di SR141716A, NESS014A e NESS006A in matrice siero nel range di campionamento 2 minuti- 1440 minuti.

Matrice Cervello	Parametri			
	C _{max}	t _{1/2} distribuzione	t _{1/2} eliminazione	AUC
Molecole				
SR141716A	1702 ng/ml	0.13 ore	7.2 ore	5879 h*ng/ml
NESS006A	809 ng/ml	0.30 ore	10.8 ore	1354 h*ng/ml
NESS014A	744 ng/ml	0.52 ore	1.0 ore	602 h*ng/ml

Figura.54 Calcolo dei parametri farmacocinetici di SR141716A, NESS014A e NESS006A in matrice cervello nel range di campionamento 2 minuti- 1440 minuti.

Da quanto emerge dai dati ottenuti, i profili farmacocinetici di SR141716A e NESS006A nel sangue sono molto simili sia in termini di C_{max} che di tempi di distribuzione, eliminazione e AUC. Il profilo del NESS014A invece, presenta una C_{max} e un valore di AUC di circa 4 volte inferiore al composto di riferimento e un t_{1/2} di eliminazione più elevato, ciò si riflette su una minore esposizione dell'organismo al farmaco. Per quanto riguarda il cervello, i nuovi derivati mostrano una C_{max} simile, ma nel caso del NESS014A, il t_{1/2} di eliminazione è 10 volte più basso rispetto a quello del NESS006A e questo provoca, come nel sangue, una più bassa esposizione del tessuto a questo farmaco. L'SR141716A invece si distacca completamente dai suoi analoghi, presentando un profilo farmacocinetico tale per cui l'esposizione del tessuto al farmaco espresso come AUC sia circa 4 volte e quasi 10 volte maggiore rispetto al NESS006A e NESS014A rispettivamente. Visti questi risultati si potrebbe sostenere che la Barriera Ematoencefalica non sia ugualmente permeabile per i derivati e per il composto di riferimento.

7. Materiali e metodi

Tutti i reagenti utilizzati, acquistati presso Sigma Aldrich Italia (MI) sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni.

Tutti i nuovi prodotti sono stati isolati, purificati e caratterizzati in ciascuno stadio mediante TLC, IR, NMR, e Spettrometria di Massa.

Lo spettro infrarosso è stato ottenuto con uno strumento Bruker ALPHA-E FTIR.

I campioni per l'analisi NMR sono stati preparati in CDCl₃ (Sigma Aldrich MI- Italia) e sono stati analizzati con uno spettrometro FT-NMR Bruker Ultra Shield Plus Avance III 400 MHz con probe multinucleare BBFO Plus (5 mm.).

Le analisi spettrometriche di massa sono state condotte attraverso un sistema LC/MS a triplo quadrupolo Waters Micromass Q-micro accoppiato ad un HPLC Water Alliance 2696.

I reagenti utilizzati durante le procedure di infusione sono stati: acetonitrile HPLC gradient PAI- ACS Panreac Nova Chimica S.r.l. MI- Italia, metanolo LC- MS PAI Panreac Nova Chimica S.r.l. MI- Italia, acqua milli-Q ottenuta con apparecchio Gradient 10 Millipore e acido Formico Riedel- de Haën 98- 100% puriss. p.a. reag. ACS, reag. Ph. Eur. MI- Italia.

I topi CD1 di sesso maschile e i ratti CD1 Sprague Dawley di sesso maschile sono stati acquistati presso Charles River, Calco, Italia.

Il Liquid scintillation counter utilizzato per la misurazione della radioattività è il Tricarb 2900; PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) (38).

Il 3165 Multiplexing pulse booster e il 4400 Four-chamber isolated organ bath sono stati utilizzati per l'analisi degli organi isolati.

Il Dimetilsolfossido $\geq 99.5\%$, il (R)-(+)-WIN55,212-2 sale di mesilato W102 - solido, $\geq 98\%$ (HPLC) e l'SR141716A sono stati acquistati presso Sigma Aldrich MI- Italia.

La soluzione di Krebs-Henseleit è stata ottenuta miscelando tutti reagenti acquistati da Sigma Aldrich MI- Italia.

L'ammonio formiato Fluka puriss. p. a. per HPLC, l'acido acetico 99.7% e l'idrossido d'ammonio soluzione Fluka puriss. p. a. Reag. Eur. Reag. ISO sono stati reperiti da Sigma Aldrich MI- Italia.

L' isopropanolo per HPLC e il diclorometano RPE sono stati acquistati rispettivamente da Lab Scan Analytical Sciences e Carlo Erba Reagenti Italia.

8. Conclusioni

Il presente lavoro di tesi ha permesso lo studio e l'approfondimento di diversi aspetti legati all'evoluzione delle conoscenze sui cannabinoidi, a partire dalle prime testimonianze sulle loro proprietà medicinali risalenti al 3000 A.C. circa, fino ai giorni nostri. In particolare sono stati indagati gli aspetti curativi che hanno portato all'approfondimento dei meccanismi di funzionamento del sistema endocannabinoide e allo studio dei recettori ad esso associati, da cui si evince il loro ruolo di primaria importanza in numerose funzioni come la modulazione dell'appetito, la regolazione dei processi di memorizzazione, i meccanismi legati all'abuso ecc... . Gli sforzi, basati su studi di correlazione struttura-attività, hanno portato alla sintesi di due nuovi derivati del Rimonabant, il NESS014A e il NESS006A. L'ottenimento di tali molecole è stato possibile attraverso modificazioni strutturali sul lead compound Rimonabant, la cui vendita è stata autorizzata in alcuni paesi per il trattamento dell'obesità. In seguito, benché il farmaco sia stato ritirato dal commercio a causa dei suoi gravi effetti collaterali a livello centrale, rimane a tutt'oggi un potente antagonista per i recettori cannabinoidergici. Tutti questi presupposti hanno portato alla sintesi dei due nuovi derivati succitati. Essi sono stati ottenuti attraverso la sostituzione sul fenile in posizione C5 del nucleo farmacoforo del Rimonabant, rappresentato dalla porzione pirazolica, e attraverso l'allungamento della catena alchilica sul carbonio in posizione 4. Le strutture molecolari prodotte, sono state successivamente e precisamente caratterizzate attraverso l'interpretazione di spettri ottenuti con diverse tecniche spettroscopiche tra cui quella infrarossa, grazie alla quale sono stati evidenziati diversi picchi riferibili a gruppi funzionali specifici e la risonanza magnetica nucleare che, attraverso la combinazione di spettri ^1H , ^{13}C disaccoppiato e l'analisi bidimensionale HSQC, ha consentito di approfondire le relazioni tra i segnali protonici e quelli del ^{13}C . La spettrometria di massa ha poi portato a un'ulteriore delucidazione strutturale attraverso lo studio dello ione molecolare e di alcuni dei suoi frammenti più caratterizzanti. Ciò si è reso possibile mediante l'utilizzo di un sistema LC accoppiato ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo. Sono stati poi effettuati i

test di binding per valutare l'affinità recettoriale, mentre per investigare il profilo farmacologico e valutare l'attività CB₁ agonista/antagonista sono state utilizzate delle procedure *ex vivo* sugli organi isolati, consentendo di valutare la potenza dei nuovi composti e dell'SR141716A in presenza di un agonista di riferimento (WIN55,212-2). I risultati così ottenuti hanno evidenziato l'attività antagonista e selettiva CB₁ di entrambi i nuovi derivati. Sono stati poi creati un nuovo metodo per il processamento ed è stata applicata una procedura di purificazione dei campioni in matrice siero e cervello con l'utilizzo della tecnica Solid Phase Extraction, inoltre è stato costruito un nuovo e selettivo metodo HPLC/MS per l'analisi quantitativa dei nuovi derivati e del Rimonabant.

Tutto lo studio comprendente la chirurgia, il benessere e trattamento degli animali, la raccolta, purificazione e analisi dei campioni sono stati condotti secondo le buone pratiche di laboratorio, attraverso l'utilizzo di procedure operative e protocolli standard. Il metodo analitico è stato inoltre validato e monitorato in accordo con le linee guida FDA, garantendo in tal modo la qualità, la precisione e la correttezza del dato ottenuto. I farmaci sono stati somministrati per via endovenosa sul ratto alla concentrazione di 1mg/Kg. Gli animali trattati sono stati in seguito sacrificati a diversi tempi dal momento dell'esposizione in acuto al farmaco, in un arco di tempo compreso tra 2 e 1440 minuti post dose. Queste operazioni sono state condotte sia per i campioni in matrice siero, sia per quelli in matrice cervello preventivamente omogenati; in questo modo è stato possibile costruire le curve concentrazione/tempo in entrambe le matrici. Tutte le molecole hanno dimostrato di seguire lo stesso andamento e sia i livelli sierici che le concentrazioni nel cervello raggiungono la concentrazione massima ai 2 minuti post-dose e poi diminuiscono nel tempo. Infine sono state condotte le analisi farmacocinetiche in entrambe le matrici nel range di campionamento 2 minuti-1440 minuti. Mediante l'interpretazione dei dati così ottenuti sono state evidenziate le analogie e le differenze tra l'SR141716A e i nuovi composti di sintesi il NESS014A e il NESS006A in relazione alla loro concentrazione massima, al $t_{1/2}$ di distribuzione ed eliminazione e all'area sotto la curva espressa come AUC.

9. Bibliografia

1. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Congy C, Martinez S, Oustric D, Péro A, et al. SR147778 [5-(4-bromophenyl)-1-(2, 4-dichlorophenyl)-4-ethyl-N-(1-piperidinyl)-1H-pyrazole-3-carboxamide], a new potent and selective antagonist of the CB1 cannabinoid receptor: biochemical and pharmacological characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2004;310:905-14.
2. Nocerino E, Amato M, Izzo AA. Cannabis and cannabinoid receptors. *Fitoterapia* 2000;71:S6-S12.
3. Lambert DM, Fowler CJ. The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *Journal of medicinal chemistry* 2005;48:5059-87.
4. Di Marzo V. A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends in pharmacological sciences* 2006;27:134-40.
5. Reggio Patricia H. Pharmacophores for ligand recognition and activation/inactivation of the cannabinoid receptors. *Current pharmaceutical design* 2003;9:1607-33.
6. Ministero della Sanità. *Farmacopea Ufficiale della Repubblica Italiana XII Edizione*. Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato, ed., Vol. XII ed: Commissione permanente per la revisione e la pubblicazione della farmacopea ufficiale. , 2009:2424.
7. Francesco Clementi, Guido Fumagalli. *Farmacologia generale e molecolare*, 2004:790pp.
8. Stahl Stephen M. *Psicofarmacologia essenziale. Basi neuroscientifiche e applicazioni pratiche*. II ed, 2002:612pp.
9. Mackie K. Cannabinoid receptors as therapeutic targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:101-22.

10. Breivogel C. S, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR. Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Molecular Pharmacology* 2001;60:155.
11. Grotenhermen F. Cannabinoids and the endocannabinoid system. *Cannabinoids* 2006;1:10-4.
12. Guzman M. Cannabinoids: potential anticancer agents. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:745-55.
13. Fernández-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolón RM, Ramos JA, Guzmán M. Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends in pharmacological sciences* 2007;28:39-45.
14. Murineddu G, Ruiu S, Mussinu JM, Loriga G, Grella GE, Carai MAM, et al. Tricyclic pyrazoles. Part 2: Synthesis and biological evaluation of novel 4, 5-dihydro-1H-benzo [g] indazole-based ligands for cannabinoid receptors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2005;13:3309-20.
15. Lange JHM, Kruse CG. Keynote review: Medicinal chemistry strategies to CB1 cannabinoid receptor antagonists. *Drug Discovery Today* 2005;10:693-702.
16. Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, et al. Explaining the decrease in US deaths from coronary disease, 1980-2000. *New England Journal of Medicine* 2007;356:2388-98.
17. Reddy KS. Cardiovascular disease in non-Western countries. *New England Journal of Medicine* 2004;350:2438-40.
18. Pagotto U, Vicennati V, Pasquali R. Il sistema endocannabinoide e il controllo del metabolismo energetico: fisiologia e fisiopatologia. 2008.
19. Cabasino S. Cannabinoidi e obesità: Ruolo degli antagonisti del recettore per i cannabinoidi CB₁ sul controllo del peso corporeo in modelli animali: Università degli studi di Cagliari, 2008.
20. Lazzari P, Sanna A, Mastinu A, Cabasino S, Manca I, Pani L. Weight loss induced by rimonabant is associated with an altered leptin expression and hypothalamic leptin signaling in diet-induced obese mice. *Behavioural brain research* 2010.

21. Poirier B, Bidouard JP, Cadrouvele C, Marniquet X, Staels B, O'connor S, et al. The anti-obesity effect of rimonabant is associated with an improved serum lipid profile. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 2005;7:65-72.
22. Thornton-Jones ZD, Kennett GA, Benwell KR, Revell DF, Misra A, Sellwood DM, et al. The cannabinoid CB1 receptor inverse agonist, rimonabant, modifies body weight and adiponectin function in diet-induced obese rats as a consequence of reduced food intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2006;84:353-9.
23. Hampp C, Hartzema AG, Kauf TL. Cost-Utility Analysis of Rimonabant in the Treatment of Obesity. *Value in Health* 2008;11:389-99.
24. Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, et al. Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 1999;42:769-76.
25. Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand J, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubrie P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells. *Molecular Pharmacology* 2003;63:908.
26. Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Batkai S, Jarai Z, et al. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *NATURE-LONDON*-2001:822-4.
27. Liu Y, Connoley I, Wilson C, Stock M. Effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 on oxygen consumption and soleus muscle glucose uptake in Lepob/Lepob mice. *International journal of obesity* 2004;29:183-7.
28. Vickers S, Webster L, Wyatt A, Dourish C, Kennett G. Preferential effects of the cannabinoid CB 1 receptor antagonist, SR 141716, on food intake and body weight gain of obese (fa/fa) compared to lean Zucker rats. *Psychopharmacology* 2003;167:103-11.
29. Manca I. Caratterizzazione farmacologica di un nuovo composto CB1 antagonista con proprietà anti-obesità Universit degli Studi di Cagliari, 2010.

30. Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2007;18:27-37.
31. Barth F, Casellas P, Congy C, Martinez S, Rinaldi M, Anne-Archard G. Pyrazole derivatives, method of preparing them and pharmaceutical compositions in which they are present. Vol. US 5624941: Google Patents, 1997.
32. Chen JZ, Han XW, Liu Q, Makriyannis A, Wang J, Xie XQ. 3D-QSAR studies of arylpyrazole antagonists of cannabinoid receptor subtypes CB1 and CB2. A combined NMR and CoMFA approach. *Journal of medicinal chemistry* 2006;49:625-36.
33. Tseng SL, Hung MS, Chang CP, Song JS, Tai CL, Chiu HH, et al. Bioisosteric Replacement of the Pyrazole 5-Aryl Moiety of N-(Piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2, 4-dichlorophenyl)-4-methyl-1 H-pyrazole-3-carboxamide (SR141716A). A Novel Series of Alkynylthiophenes as Potent and Selective Cannabinoid-1 Receptor Antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 2008;51:5397-412.
34. Lazzari P, Ruiu S, Pinna GA, Murineddu G. Pharmaceutical compounds. Vol. US 7659407. US: Google Patents, 2010.
35. Lazzari P, LG, Manca I, Pinna G. A., Pani L. Pharmaceutical Compounds. Vol. US 2010215741 A1. US, 2010.
36. Murineddu G, Lazzari P, Ruiu S, Sanna A, Loriga G, Manca I, et al. Tricyclic pyrazoles. 4. Synthesis and biological evaluation of analogues of the robust and selective CB2 cannabinoid ligand 1-(2', 4'-dichlorophenyl)-6-methyl-N-piperidin-1-yl-1, 4-dihydroindeno [1, 2-c] pyrazole-3-carboxamide. *Journal of medicinal chemistry* 2006;49:7502-12.
37. Murineddu G, Ruiu S, Loriga G, Manca I, Lazzari P, Reali R, et al. Tricyclic pyrazoles. 3. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of analogues of the cannabinoid antagonist 8-chloro-1-(2', 4'-dichlorophenyl)-N-piperidin-1-yl-1, 4, 5, 6-tetrahydrobenzo [6, 7] cyclohepta [1, 2-c] pyrazole-3-carboxamide. *Journal of medicinal chemistry* 2005;48:7351-62.

38. Ruiu S, Pinna GA, Marchese G, Mussinu JM, Saba P, Tambaro S, et al. Synthesis and characterization of NESS 0327: a novel putative antagonist of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003;306:363-70.
39. Seo HJ, Kim MJ, Lee SH, Jung ME, Kim MS, Ahn K, et al. Synthesis and structure-activity relationship of 1, 2, 4-triazole-containing diarylpyrazolyl carboxamide as CB1 cannabinoid receptor-ligand. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2009;18:1149-62.
40. Manfred Hasse HM, Bernd Zeeh. *Metodi spettroscopici in chimica organica*. 2 ed, 2010:464pp.
41. Unito.it. *Storia della Chimica. Cronologia della spettrometria di massa*.
42. Riccardo Stradi ER. *Guida al corso di metodi fisici in chimica organica*:535pp.
43. US Pharmacopoeia. *The official compendia of Standards, Vol.*, 2010.
44. Waters C. *Quattro micro Operation and Maintenance Training*, 2005.
45. Zhang Q, Ma P, Wang W, Cole RB, Wang G. In vitro metabolism of diarylpyrazoles, a novel group of cannabinoid receptor ligands. *Drug metabolism and disposition* 2005;33:508-17.
46. Delyle SG, Abe E, Devillier P, Alvarez J. Determination of rimonabant in human plasma and hair by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr, B: Anal Technol Biomed Life Sci* 2008;872:115-20.
47. Waynforth HB, Flecknell PA. *Experimental and surgical technique in the rat*: Academic Press London, 1980.
48. Arunlakshana O, Schild H. Some quantitative uses of drug antagonists. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 1959;14:48.
49. Hsieh Y, Duncan CJG, Brisson JM. Fused-core silica column high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of rimonabant in mouse plasma. *Analytical chemistry* 2007;79:5668-73.
50. Nirogi R, Kandikere V, Mudigonda K, Ajjala D. Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of rimonabant, a CB1 receptor antagonist, in human plasma. *Biomedical Chromatography* 2008;22:469-77.

51. Biotage. Practical Aspects of SPE Method Development.
52. Marchese G, Pittau B, Casu G, Peddio G, Spada G, Pira M, et al. A comparison of continuous subcutaneous paliperidone infusion and repeated subcutaneous injection of risperidone free-base in rats. *European Psychiatry* 2009;25:92-100.
53. Gabrielsson JL, Weiner DL. Methodology for pharmacokinetic/pharmacodynamic data analysis. *Pharmaceutical science & technology today* 1999;2:244-52.
54. Renato Urso GG. Introduzione alla farmacocinetica. metodi non-compartimentali, funzioni multiesponenziali e parametri farmacocinetici, Vol., 2002.
55. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine*;99:306-14.

10. Ringraziamenti

Un grazie particolare va a tutta la mia famiglia che mi ha faticosamente sopportato in questi anni, un grazie particolare va ai miei amici di sempre Peppe, Sara e Franci, in ogni occasione vigili e pronti a risvegliarmi dal torpore invernale. A tutti coloro che hanno collaborato in qualsiasi modo alla buona riuscita di questo lavoro va tutta la mia riconoscenza. Un ringraziamento speciale va a tutti coloro che hanno allietato e alleggerito le troppo spesso infinite ore di lavoro e che ancora lo fanno: Ilaria, Sabrina, Stefania e Antonella. A coloro che lo hanno fatto e che ora lo fanno da vicino e da lontano: Anna, Filippo, Matteo e Roberta. Grazie a tutto il MIO ufficio U9 e al nuovo e nuovissimo ufficio U3 e a tutti i colleghi che nel bene e nel male ci sono stati. Grazie a Cristina e ai ragazzi che hanno lavorato alla sintesi e alle analisi spettroscopiche, in particolare a Marilena per la sua preziosa consulenza. Grazie a quello che era il gruppo di chimica e a quello che è ora.

La mia gratitudine a chi ha permesso lo svolgimento di questo dottorato di ricerca nella persona della scuola di Dottorato in Neuroscienze e Scienze Morfologiche da una parte e di Pharmaness, del CNR e del Consorzio Elpro dall'altra.

