

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA E
TECNOLOGIA FARMACEUTICHE



TESI DI LAUREA
**STUDIO DEL PROFILO FARMACOLOGICO
DI ANALOGHI DELL'ENDOMORFINA-2
SUL RECETTORE MU OPIOIDE**

RELATORE: CHIAR.MO PROF. GIROLAMO CALÒ

CORRELATORE: DOTT. DAVIDE MALFACINI

LAUREANDA: ELENA VITELLA

ANNO ACCADEMICO: 2023/2024

INDICE

<u>LISTA DELLE ABBREVIAZIONI</u>	III
<u>SOMMARIO</u>	V
<u>CAPITOLO I - INTRODUZIONE</u>	1
1.1 Recettori accoppiati a proteine G	1
1.2 Vie di segnalazione dipendenti da proteina G	4
1.3 Vie di segnalazione dipendenti da β -arrestina	7
1.4 Selettività funzionale	10
1.5 Sistema oppioide classico	15
1.6 Localizzazione dei peptidi e dei recettori oppioidi	18
1.7 Effetti dei ligandi oppioidi	20
1.8 Classificazione del dolore	27
1.9 Vie di trasmissione del dolore	30
1.10 Modulazione del dolore	32
1.11 Terapia del dolore	34
1.12 Peptidi oppioidi in terapia: stato attuale delle conoscenze	35
<u>CAPITOLO II - SCOPO DELLA RICERCA</u>	37
<u>CAPITOLO III - MATERIALI E METODI</u>	39
3.1 Ligandi	39
3.2 Composizione delle soluzioni	40
3.3 Saggio BRET	41
3.3.1 Preparazione delle colture cellulari	43
3.3.2 Interazione del recettore μ con la β -arrestina 2	44
3.3.3 Interazione del recettore μ con la proteina G	45
3.3.4 Allestimento delle sostanze da analizzare	47
3.3.5 Lettura del segnale BRET	49
3.4 Analisi dei dati	50
3.5 Bias factor e bias plot	51

3.6	Saggio dell'antagonismo	52
-----	-------------------------	----

<u>CAPITOLO IV - RISULTATI</u>	<u>55</u>
---------------------------------------	------------------

4.1	Saggio BRET	55
-----	-------------	----

4.2	Bias plot e bias factor	59
-----	-------------------------	----

4.3	Saggio dell'antagonismo	62
-----	-------------------------	----

<u>CAPITOLO V - DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</u>	<u>65</u>
--	------------------

<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>71</u>
----------------------------	------------------

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

- AC: adenilato ciclasi
- ACTH: ormone adrenocorticotropo
- ADH: ormone antidiuretico
- ADP: adenosina difosfato
- ATP: adenosina trifosfato
- BCA: acido bicinconinico
- BPCO: broncopneumonia cronica ostruttiva
- BRET: Bioluminescence Resonance Energy Transfer
- BSA: albumina sierica bovina
- cAMP: adenosina monofosfato ciclico
- CL95%: limiti di confidenza al 95%
- CPS: conta per secondo
- CRH: ormone di rilascio della corticotropina
- DAG: diacilglicerolo
- Dmt: 2,6-dimetiltirosina
- DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline
- DTT: ditionitrosolo
- EC₅₀: concentrazione di agonista che produce la metà degli effetti massimi
- EDTA: acido etilendiamminotetraacetico
- EGTA: acido tetracetico etilen-glicole
- EM-2: endomorfina-2
- Emax: effetto massimo prodotto dall'agonista
- FBS: siero fetale bovino
- FDA: Food and Drug Administration
- FSH: ormone follicolostimolante
- GIRK: G protein-gated inwardly rectifying potassium channels
- GnRH: ormone rilasciante la gonadotropina
- GPCR: recettore accoppiato a proteina G
- GRK: chinasi dei recettori accoppiati a proteina G
- IP₃: inositolo trifosfato

- LH: ormone luteinizzante
- NK: Natural Killer
- N/OFQ: nocicettina/orfanina FQ
- ORL-1: recettore orfano simile al recettore oppioide
- PAG: sostanza grigia periacqueduttale
- PBS: tampone fosfato salino
- PDL: poli-D-lisina
- PDYN: preprodinorfina
- PENK: preproencefalina
- PIP₂: fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato
- PKA: proteina chinasi A
- PLC- β : fosfolipasi C di tipo β
- POMC: preproiomelanocortina
- RGFP: Renilla Green Fluorescent Protein
- RLuc: Renilla Luciferasi
- SEM: errore standard della media
- WR: working reagent

SOMMARIO

Il recettore mu oppioide è un recettore accoppiato a proteine G di tipo inibitorio. Rappresenta il bersaglio farmacologico di alcuni peptidi oppioidi endogeni e degli alcaloidi oppiacei, quest'ultimi considerati i più efficaci agenti antidolorifici. Tuttavia, la loro azione è accompagnata da gravi effetti collaterali, come costipazione, nausea, depressione respiratoria, tolleranza e dipendenza, che ne limitano l'utilizzo a lungo termine. In questa tesi è stato studiato il profilo farmacologico di 10 analoghi ciclici del peptide oppioide naturale endomorfina-2 (EM-2), con lo scopo di valutare la loro capacità di promuovere l'interazione del recettore mu con la proteina G e con la β -arrestina 2. Discriminare questi due tipi di interazione è importante non solo per affinare la conoscenza sulla trasduzione del segnale ma anche per predire ed interpretare gli effetti biologici in vivo.

Al fine di studiare l'effetto dei ligandi nel promuovere l'interazione tra il recettore mu e i due effettori intracellulari, la proteina G e la β -arrestina 2, è stato utilizzato il saggio di Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) il quale permette di misurare queste interazioni in presenza di concentrazioni crescenti di ligando. Il legame recettore-proteina G è stato studiato in membrane ottenute a partire dalle cellule SH-SY5Y di neuroblastoma umano, trasdotte stabilmente con le proteine di fusione mu-Rluc e $G\beta_1$ -RGFP; l'interazione recettore- β -arrestina 2 è stata valutata in cellule intere trasdotte con le fusoproteine mu-Rluc e β -arrestina 2-RGFP.

Sono stati determinati i valori di potenza ed efficacia dei diversi ligandi ed è stato calcolato il bias factor, un valore numerico che esprime la preferenza dei composti per attivare la via di segnalazione della proteina G rispetto a quella della β -arrestina 2. Come standard di riferimento è stata scelta EM-2.

Sulla base dei dati ottenuti si riscontra che i valori di potenza del peptide naturale EM-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) sono simili in entrambe le vie di segnalazione, mentre la sostituzione di Tyr¹ con Dmt¹ ha provocato un aumento di potenza per tutti i peptidi sulla proteina G, risultato che concorda con quanto riportato in letteratura^{1,2}. I valori di efficacia sulla proteina G di tutti i composti, normalizzati rispetto a EM-2, sono compresi tra 0.72 e 1.01, indicando che le modifiche chimiche apportate non hanno determinato variazioni notevoli dell'efficacia dei

ligandi sull'interazione recettore mu-proteina G. Per quanto riguarda il legame del recettore mu con la β -arrestina 2, si osserva una maggiore variabilità in termini di efficacia, da molto debole/inattivo (<0.1) ad agonista parziale. I risultati ottenuti dal calcolo del bias factor mostrano che tutti i composti hanno una certa selettività funzionale per la segnalazione della proteina G, mentre EM-2 attiva in egual misura anche la via della β -arrestina 2. La sostituzione di Tyr¹ con Dmt provoca una riduzione del bias. Inoltre, è interessante notare come la sostituzione di Phe² o Phe³ con l'amminoacido non naturale (R) β^3 -1Nal nei composti 514, 510 e 515 determini una completa perdita di capacità di reclutare la β -arrestina 2. In conclusione, questi composti potranno essere utili per ulteriori studi volti a determinarne il profilo analgesico in vivo e più in generale a comprendere il valore del fenomeno della "selettività funzionale" quale strategia farmacologica per generare farmaci analgesici innovativi meglio tollerati rispetto ai composti disponibili in terapia.

Capitolo I

Introduzione

1.1 Recettori accoppiati a proteine G

La maggior parte dei farmaci in uso clinico ha come bersaglio farmacologico una proteina che rientra in una delle seguenti cinque famiglie: recettori accoppiati alle proteine G (GPCR), canali ionici, chinasi, recettori nucleari degli ormoni, proteasi. I GPCR sono i bersagli più intensamente studiati, in quanto sono coinvolti nella regolazione di numerosi processi fisiopatologici e perché i siti di legame per i farmaci sono facilmente accessibili, trovandosi sulla superficie cellulare³.

I GPCR costituiscono una delle famiglie di proteine di membrana più ampie e diversificate, che conta oltre 800 membri⁴⁻⁶. Sono in grado di trasdurre segnali provenienti dall'ambiente extracellulare in effetti intracellulari fisiologici. Tra i ligandi endogeni di questi recettori sono compresi alcuni ormoni, neurotrasmettitori, stimoli odorosi, chemochine, fotoni, ammine, carboidrati, ioni, lipidi, peptidi e proteine. Tramite la percezione di questi segnali extracellulari i GPCR sono implicati nella regolazione di processi come visione, olfatto, gusto, funzioni endocrine, cardiovascolari, neurologiche, immunologiche e riproduttive⁵⁻⁷. Essi sono coinvolti anche in diverse condizioni patologiche tra le quali il cancro, la depressione, il morbo di Alzheimer, il diabete mellito di tipo 2, l'obesità, la schizofrenia e altre. Dato il loro ruolo nella regolazione di praticamente ogni processo fisiologico, non sorprende che attualmente rappresentino il bersaglio farmacologico di oltre il 30% dei farmaci approvati dalla Food and Drug Administration (FDA). Più nello specifico, tra i circa 400 GPCR non olfattivi, circa 130 membri sono possibili bersagli di farmaci (altresì

detti “druggable”) e 165 sono bersagli di farmaci approvati da FDA^{3,5,7}. A questa famiglia di recettori appartengono, ad esempio, i recettori adrenergici, dopaminergici, oppioidi, muscarinici, serotoninergici, cannabinoidi e i recettori della melatonina⁷. I GPCR umani sono suddivisi in cinque sottofamiglie, a seconda della loro sequenza amminoacidica: la classe A, anche chiamata della rodopsina, è la più abbondante, includendo oltre il 90% di tutti i GPCR; la classe B o della secretina; la classe C dei recettori metabotropici del glutammato; la famiglia dei recettori di adesione; infine la classe F dei recettori frizzled, essenziali per lo sviluppo embrionale⁶⁻⁸.

La struttura cristallografica dei GPCR è nota da pochi anni: la prima struttura cristallina ad essere stata risolta, nel 2000, è stata la forma inattiva della rodopsina di origine bovina⁸. Nel 2007 è stata risolta la struttura cristallina del recettore β 2-adrenergico umano legato ad un antagonista^{9,10}. Nel 2011 è stata risolta la struttura cristallina del recettore β 2-adrenergico umano durante l'interazione con una proteina G stimolatoria (G_s)¹¹, e nel 2015 è stata cristallizzata la rodopsina interagente con la β -arrestina¹². Mediante la risoluzione cristallografica è stato possibile comprendere il meccanismo molecolare alla base del riconoscimento dei ligandi e dell'attivazione recettoriale ed è stato anche possibile capire il meccanismo d'interazione del recettore con la proteina G e con la β -arrestina, informazioni di fondamentale importanza nel processo di scoperta di un farmaco. La caratterizzazione della struttura dei GPCR è stata impegnativa per vari motivi, tra i quali i bassi livelli di espressione dei recettori, le difficoltà estrattive e la conformazione altamente flessibile. Negli ultimi 10 anni lo sviluppo crescente di metodologie di biologia strutturale alternative/complementari alla cristallografia, in particolare di microscopia elettronica, stanno consentendo di ottenere una mappatura altamente precisa delle variazioni strutturali dei GPCR dalla forma inattiva alle diverse forme attive¹³, con particolare attenzione alle diverse vie trasduzionali e a quei recettori ancora poco noti¹⁴.

I parametri farmacologici comunemente valutati per studiare l'azione di un ligando e la selettività funzionale vengono valutati tramite approcci sperimentali in grado di misurare l'accumulo intracellulare di cAMP, i flussi del calcio, la fosforilazione di ERK, l'interazione con la proteina G o con la β -arrestina⁷.

I GPCR condividono una struttura comune altamente conservata, costituita da sette eliche trans membrana (7-TM) collegate da tre anse, o loops, extracellulari (ECLs) e tre intracellulari (ICLs). La struttura primaria contiene un terminale amminico extracellulare (N-terminale) e un terminale carbossilico intracellulare (C-terminale)^{5,6} (*figura 1*). La tasca di legame del ligando è generalmente localizzata o nel segmento N-terminale, o all'interno dei domini TM, o a livello di ECL2^{15,16}. Il C-terminale presenta dei residui di serina e treonina che possono andare incontro a fosforilazione¹⁷. Il sito di interazione con le proteine G è formato dalla combinazione della terza ansa intracellulare con il segmento C-terminale⁷.

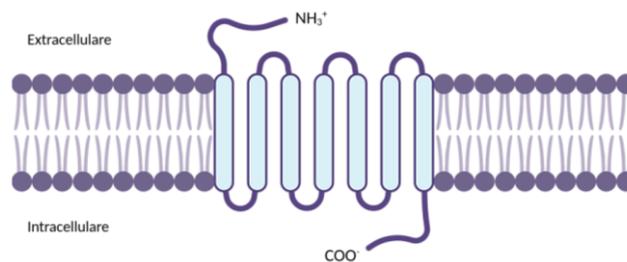


Figura 1. Struttura schematica di un GPCR.

Successivamente al legame di un ligando, i GPCR vanno incontro ad una modifica conformazionale che determina l'attivazione del recettore stesso e questo consente di trasmettere il segnale all'ambiente intracellulare. Quando attivati i GPCR interagiscono principalmente con tre famiglie di proteine citoplasmatiche, generando risposte biologiche diverse: le proteine G, le chinasi dei recettori accoppiati a proteine G (GRK) e le β -arrestine (*figura 2*)⁵.

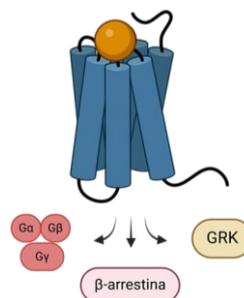


Figura 2. La segnalazione dei GPCR è regolata dall'interazione con tre famiglie di proteine: le proteine G eterotrimeriche, le β -arrestine e le GRK.

1.2 Vie di segnalazione dipendenti da proteina G

Le proteine G sono trasduttori di segnale localizzati sulla membrana plasmatica con la funzione di trasmettere le informazioni provenienti dall'ambiente extracellulare agli effettori presenti all'interno della cellula, con l'obiettivo di regolare diverse funzioni fisiologiche dell'organismo umano. Le proteine G sono eterotrimeri costituiti da tre subunità, denominate in ordine di peso molecolare decrescente α , β e γ . Ad oggi nell'uomo sono state identificate 21 subunità $G\alpha$ codificate da 16 geni, 6 subunità $G\beta$ codificate da 5 geni e 12 subunità $G\gamma$ ¹⁸. La subunità α lega il GDP o il GTP e possiede un'attività GTPasica intrinseca, mentre le subunità β e γ sono sempre associate tra loro, formando un eterodimero. Quando il recettore si trova allo stato di riposo, la subunità α lega il GDP e la sua funzione GTPasica è inibita dall'interazione con il dimero $\beta\gamma$. Il legame dell'agonista al sito di legame extracellulare determina una modifica conformazionale apicale del recettore che si trasmette alla porzione basale citoplasmatica. Questo consente l'accoppiamento intracellulare della proteina G eterotrimerica al sito di interazione del recettore, con il risultato che la subunità $G\alpha$ perde affinità per il GDP e ne acquista per il GTP. Il complesso $G\alpha$ -GTP si dissocia dal dimero $\beta\gamma$ ed entrambi possono interagire con effettori proteici citoplasmatici, regolandone l'attività. Il segnale viene interrotto quando la subunità α , in virtù della sua attività GTPasica, catalizza l'idrolisi del GTP in GDP; il complesso $G\alpha$ -GDP si riassocia al dimero $\beta\gamma$, ricostituendo l'eterotrimerico inattivo¹⁹. L'interazione tra il recettore e la proteina G può essere inibita anche tramite la fosforilazione mediata dalle GRK e il conseguente legame dell'arrestina, di cui viene discusso in seguito.

Le proteine G sono classificate sulla base della sequenza e delle similarità funzionali delle subunità α : si distinguono in questo modo quattro famiglie, chiamate G_s , $G_{i/0}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$ ²⁰.

Le proteine G_s e $G_{i/0}$ determinano, rispettivamente, l'attivazione e l'inibizione dell'adenilato ciclasi (AC), un enzima citoplasmatico dimerico che converte l'ATP in adenosina monofosfato ciclico (cAMP) in presenza di Mg^{2+} . Il cAMP è un secondo messaggero che può attivare la proteina chinasi A (PKA), che fosforila numerosi enzimi metabolici e fattori di trascrizione. Tra questi, la

trascrizione genica iniziata dalla fosforilazione di CREB (cAMP-responsive element binding protein) potrebbe aumentare l'espressione di proteine che mediano il dolore, come il recettore della neurochinina-1 (NK1R). Il ligando endogeno di questo recettore è la sostanza P, un neuropeptide rilasciato in risposta a stimoli dolorifici che, legando NK1R, innesca la trasmissione del dolore²¹, quindi estendendo il significato dell'attivazione di G_s e $G_{i/0}$ nei meccanismi di adattamento trascrizionale al segnale doloroso.

Le proteine $G_{q/11}$ attivano la fosfolipasi C di tipo β (PLC- β), la quale media l'idrolisi del fosfatidilinositolo 4,5-bisfosfato (PIP₂) legato alla membrana in diacilglicerolo (DAG) e inositolo trifosfato (IP₃). Dopo la scissione DAG rimane legato alla membrana, mentre IP₃ diffonde nel citoplasma, dove si lega a specifici recettori localizzati sulla membrana del reticolo endoplasmatico liscio, causando il rilascio di calcio nel citoplasma. L'aumento della concentrazione intracellulare del calcio e il DAG agiscono come secondi messaggeri e promuovono l'attivazione della proteina chinasi C (PKC)²².

Le proteine $G_{12/13}$ attivano una piccola GTPasi monomerica chiamata proteina Rho attraverso il fattore di scambio dei nucleotidi guaninici Rho-GEF. RhoA trasmette segnali al nucleo mediante l'attivazione di chinasi proteiche²³.

I recettori oppioidi sono accoppiati a proteine $G_{i/0}$ (sensibili alla tossina della pertosse). Quando il recettore viene attivato da un agonista, la proteina G eterotrimerica si separa in subunità α e $\beta\gamma$. Negli ultimi anni diversi gruppi di ricerca hanno indagato il ruolo fisiologico della subunità $\beta\gamma$, inizialmente ritenuta essere unicamente coinvolta nell'inattivazione della subunità $G\alpha$ e nella sua adesione alla membrana plasmatica. Oggi l'eterodimero è riconosciuto come una molecola di trasduzione del segnale a sé stante, in quanto regola direttamente l'attività dell'AC, della PLC- β , dei canali del potassio GIRK e dei canali del calcio voltaggio-dipendenti. Inoltre il dimero $G\beta\gamma$ può reclutare alcune GRK, che mediano il processo di desensibilizzazione del recettore¹⁷ (figura 3). È stato anche osservato che la subunità $\beta\gamma$, diversamente dalla subunità α , non va incontro a modifiche conformazionali quando si dissocia dall'eterotrimerico.

Più in dettaglio, la subunità $\beta\gamma$ può attivare i canali del potassio GIRK, determinando l'uscita di potassio dal neurone, che provoca l'iperpolarizzazione cellulare e quindi l'attenuazione dell'eccitabilità. La subunità $\beta\gamma$ interagisce, poi, direttamente con i canali del calcio voltaggio-dipendenti, provocandone l'inibizione. Da ciò risulta una riduzione del rilascio di neurotrasmettitori coinvolti nella trasmissione dolorosa (sostanza P e glutammato). È stato dimostrato che la PLC- β può essere attivata, oltre che dalla proteina $G_{q/11}$, anche dalla $G_{i/o}$: in questo caso l'attivazione non è mediata dalla subunità α , ma proprio dalla $\beta\gamma$. L'eterodimero è anche in grado di reclutare le GRK2 e 3, le chinasi dei recettori β -adrenergici, sulle quali la subunità α non ha effetto, mentre non attiva GRK1. Infine, diverse isoforme di AC possono essere modulate dalla subunità $\beta\gamma$ ²⁴.

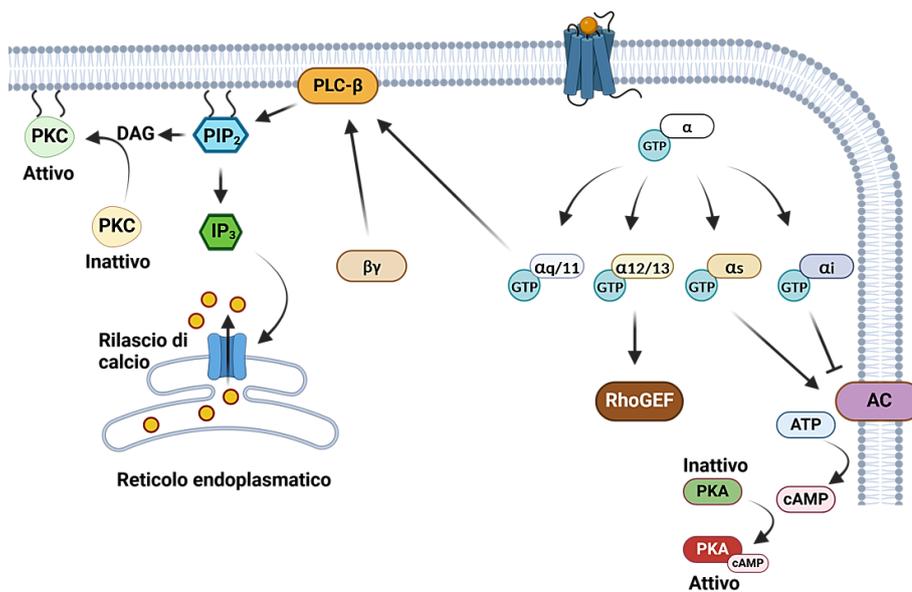


Figura 3. Vie di segnalazione della proteina G.

1.3 Vie di segnalazione dipendenti da β -arrestina

Una caratteristica comune a tutti i GPCR riguarda la responsività decrescente alla ripetuta stimolazione con un agonista, un fenomeno denominato “desensibilizzazione”. Questo processo rappresenta il meccanismo principale di terminazione della segnalazione di un GPCR e avviene in due stadi: dapprima si verifica la fosforilazione dei residui di serina e treonina localizzati in specifici siti del recettore ad opera delle GRK; successivamente viene reclutata la β -arrestina, una proteina citoplasmatica.

Le chinasi dei recettori accoppiati a proteine G, GRK, sono delle serina-treonina chinasi di cui sono stati identificati sette membri: GRK1 e GRK7 sono denominate chinasi visive, in quanto si trovano esclusivamente nelle cellule della retina; GRK2 e GRK3 si trovano in associazione ai recettori β -adrenergici, dunque ci si riferisce ad esse come β -AR chinasi; GRK4, GRK5 e GRK6 sono raggruppate assieme perché sono strutturalmente simili. Le GRK fosforilano i residui di Ser e Thr che si trovano nel terzo loop intracellulare, oppure gli stessi residui localizzati nella sequenza C-terminale del recettore attivato.

La fosforilazione mediata da queste chinasi promuove il legame del recettore con la β -arrestina, che termina il segnale mediato dalla proteina G provocando la desensibilizzazione del recettore. Successivamente il recettore viene internalizzato in vescicole di clatrina e può essere degradato nei lisosomi o defosforilato e riciclato nella membrana cellulare¹⁷ (*figura 4*).

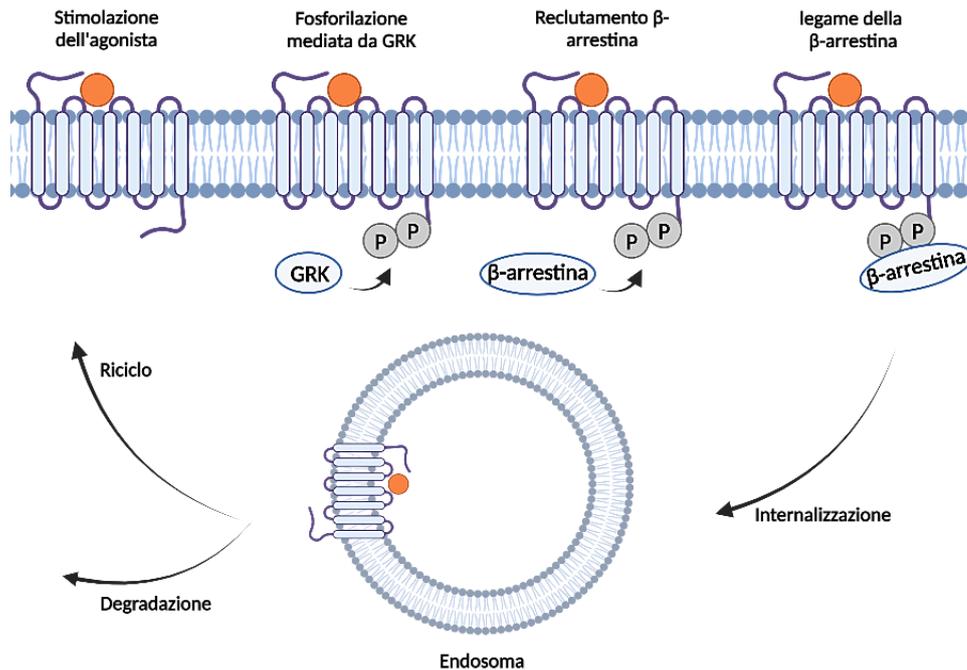


Figura 4. Schema degli eventi intracellulari che avvengono dopo attivazione della proteina G. La fosforilazione del recettore ed il legame con la β -arrestina terminano il segnale della proteina G e provocano l'internalizzazione del recettore.

Nei mammiferi la famiglia delle β -arrestine è composta da quattro membri: le arrestine 1 e 4 sono implicate nel processo della visione e si trovano, rispettivamente, nei coni e nei bastoncelli della retina; l'arrestina 2 (anche chiamata β -arrestina 1) e l'arrestina 3 (chiamata anche β -arrestina 2) sono arrestine non visive distribuite in modo ubiquitario nell'organismo. Legano la maggior parte dei GPCR e sono coinvolte nei processi di desensibilizzazione, internalizzazione, degradazione e riciclo del recettore^{17,25}.

Negli ultimi vent'anni alcuni gruppi di ricerca hanno scoperto che la β -arrestina non svolge solo un ruolo di "arresto" del segnale, ma il complesso recettore fosforilato/ β -arrestina può interagire con diverse proteine intracellulari, innescando vie di segnalazione alternative: una di queste è la cascata delle mitogen-activated protein kinase (MAPK). La trasduzione del segnale mediata dalle MAPK regola diversi processi cellulari, come la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e la sintesi proteica. Nei mammiferi sono state identificate tre classi di MAP-chinasi: ERK 1 e 2 (chinasi regolate da segnali extracellulari), JNK 1-3 (chinasi N-terminali c-Jun 1-3) e p38.

Il legame della β -arrestina ai GPCR sembra, quindi, che possa attivare una seconda via di segnalazione intracellulare oltre a quella mediata della proteina G e rappresentare un nuovo meccanismo di trasduzione del segnale di questi recettori, sebbene l'attivazione delle MAPK indotta dal recettore mu non sia ancora pienamente compresa²⁶.

1.4 Selettività funzionale

Quando attivati, i GPCR possono interagire con almeno 3 famiglie di trasduttori del segnale intracellulari (le proteine G eterotrimeriche, le β -arrestine o le GRK^{5,7}) e generare risposte biologiche differenti. Quando un agonista attiva preferenzialmente una via di segnalazione tra le varie coinvolte nello stesso sistema cellulare viene definito selettivamente funzionale, o “biased”. Se l’attivazione di una via provoca per lo più gli effetti terapeutici e un’altra gli effetti collaterali, è d’interesse clinico ricercare dei composti biased per la prima via, così da migliorare il profilo di sicurezza della sostanza (figura 5). Questo concetto è stato finora applicato al drug discovery riguardante i recettori mu e kappa oppioidi, β -adrenergici, AT2R e molti altri. Il recettore mu oppioide è tra i più studiati per comprendere questo processo⁵.

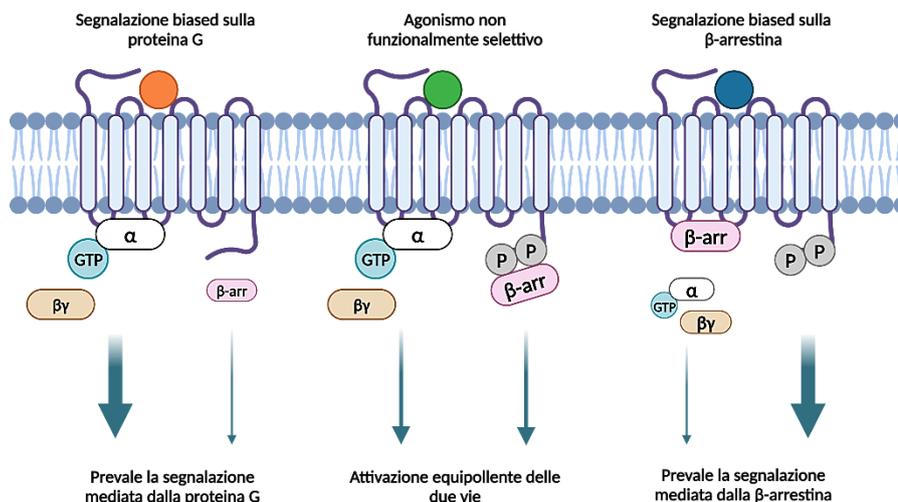


Figura 5. Schema dell’agonismo biased concernente i GPCR.

L’interazione della β -arrestina 2 con il recettore mu ha suscitato grande interesse negli ultimi anni, a causa del possibile coinvolgimento negli effetti collaterali derivanti dall’utilizzo di oppioidi. Il concetto della selettività funzionale ha acquistato grande interesse farmacologico, perché può fornire la possibilità di sviluppare farmaci che, in seguito al legame con il recettore, attivano selettivamente vie di segnalazione che determinano principalmente gli effetti terapeutici, senza stimolare quelle che si ritiene possano essere responsabili degli

effetti collaterali. Uno studio condotto da Bohn *et al.* ha dimostrato un incremento dell'effetto analgesico (*figura 6.A*) della morfina in topi geneticamente modificati in cui è stato soppresso il gene per la β -arrestina 2, con una riduzione della comparsa di costipazione (*figura 6.B*) e depressione respiratoria (*figura 6.C*)²⁷.

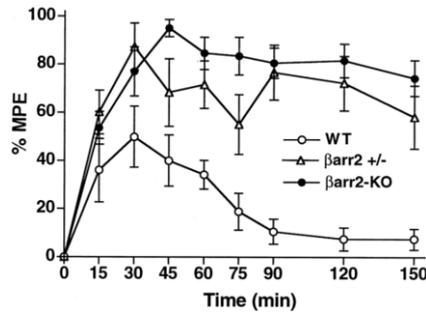


Figura 6.A. Nei topi knockout l'effetto analgesico della morfina è più intenso e più prolungato rispetto ai topi wild-type e ai topi eterozigoti. Risultati dell'hot plate test.

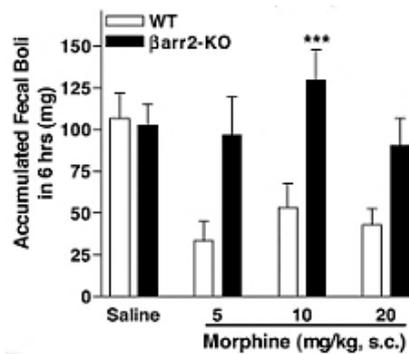


Figura 6.B. Nei topi privati del gene per la β -arrestina 2 la funzionalità intestinale non è compromessa, mentre nei topi wild-type si riscontra diminuzione del transito, ossia costipazione. Risultati ottenuti con il saggio "fecal boli accumulation".

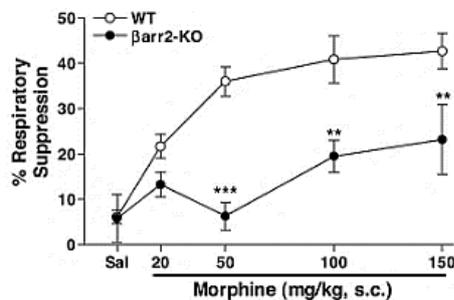


Figura 6.C. Nei topi knockout si osserva minor sviluppo di depressione respiratoria.

Questi risultati hanno consentito di formulare l'ipotesi per cui gli effetti indesiderati degli oppioidi derivino principalmente dall'attivazione della segnalazione intracellulare mediata dalla β -arrestina 2²⁸. L'ipotesi è stata messa in discussione quando alcuni studi hanno riscontrato la permanenza degli effetti avversi, inclusi la costipazione e la depressione respiratoria, in topi knockout trattati con morfina e fentanile^{29,30}. Inoltre, ci sono solide evidenze per le quali anche la segnalazione dipendente da proteina G contribuisca in modo sostanziale agli effetti collaterali degli oppioidi³¹⁻³⁵.

L'ipotesi secondo la quale l'attivazione della via di segnalazione della β -arrestina 2 nel recettore μ sia coinvolta negli effetti collaterali degli oppioidi ha portato allo sviluppo di agonisti del recettore μ con selettività funzionale per la proteina G. Il composto prototipo è oliceridina (Olinvyk), o TRV130, che dall'agosto 2020 è stato approvato negli Stati Uniti per l'uso negli adulti per la gestione del dolore acuto di gravità tale da richiedere un analgesico oppioide endovenoso e per i quali i trattamenti alternativi sono inadeguati³⁶.

Studi eseguiti sui roditori hanno dimostrato che rispetto alla morfina oliceridina presenta un buon profilo analgesico con effetti collaterali minori³⁷. Nella *figura 7* sono riportati i risultati degli studi condotti: in alto si confronta l'efficacia della morfina nel reclutare la proteina G (curva arancione, ottenuta tramite misurazione dei livelli intracellulari di cAMP) e la β -arrestina 2 (curva nera) con l'efficacia di oliceridina. Si riscontra un'efficacia molto simile tra i due farmaci per l'accoppiamento con la proteina G, mentre il reclutamento della β -arrestina 2 è ridotto nel caso di oliceridina. Nel grafico centrale sono riportati i risultati degli esperimenti volti a comprendere l'impatto nella funzione intestinale dei due farmaci (curve ciano e arancio, rispettivamente ottenute tramite i saggi "glass bead colonic motility" e "fecal boli accumulation") e l'effetto analgesico (curva nera, ottenuta con il saggio "hot plate test"). Si può osservare come oliceridina provochi una minore disfunzione gastrointestinale rispetto alla morfina a dosi analgesiche equivalenti. Nel grafico in basso si compara la funzione respiratoria (curva arancio, ottenuta misurando la pCO₂) a dosi analgesiche equivalenti dei due farmaci: per oliceridina è stata riscontrata una minor depressione respiratoria rispetto alla morfina.

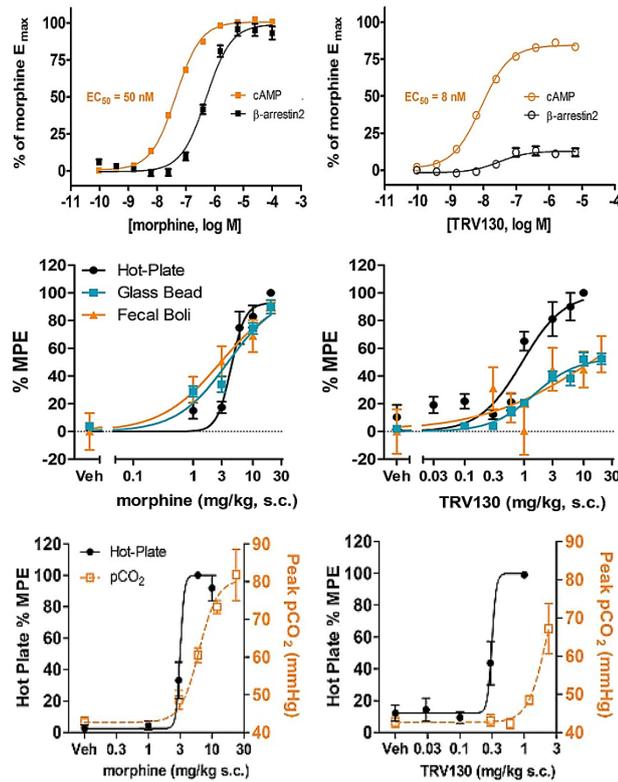


Figura 7. Risultati a supporto del miglior profilo di sicurezza di oliceridina rispetto alla morfina. Nel riquadro in alto è comparata l'efficacia dei due farmaci nel reclutare la proteina G o la β -arrestina. Al centro sono confrontati gli effetti antidolorifico e gastrointestinale di oliceridina e morfina. In basso, studio dell'effetto analgesico e della capacità respiratoria.

Infine, l'efficacia dell'oliceridina è stata confermata in due studi clinici randomizzati e controllati di fase III³⁸.

Nel 2020 è stato pubblicato un articolo, da Gillis e colleghi, che mette in discussione il meccanismo alla base del migliorato profilo di tollerabilità di oliceridina rispetto alla morfina. Viene ipotizzato che esso derivi non tanto dalla riduzione della segnalazione mediata dalla β -arrestina, quanto dalla ridotta attività intrinseca di oliceridina. Lo studio evidenzia come sussista una relazione inversamente proporzionale tra l'efficacia dei ligandi oppioidi e la loro finestra terapeutica (figura 8A). Un composto come il fentanile, che è un agonista pieno, ha una finestra terapeutica molto stretta, dunque variando la dose sarà facile andare incontro a tossicità. La buprenorfina è un agonista parziale e ha una finestra terapeutica più ampia, quindi è maggiormente sicura. Nello studio viene anche evidenziato come il calcolo del bias factor tra la segnalazione della proteina G e il reclutamento dell'arrestina non consenta di prevedere l'indice terapeutico

(figura 8B). Non è, dunque, del tutto chiaro se l'aumento dell'intervallo terapeutico derivi dall'agonismo biased o dall'agonismo parziale. L'ottenimento di un composto biased per la proteina G che si comporti da agonista pieno sulla proteina G potrebbe essere d'aiuto nel discriminare le due diverse ipotesi³⁵.

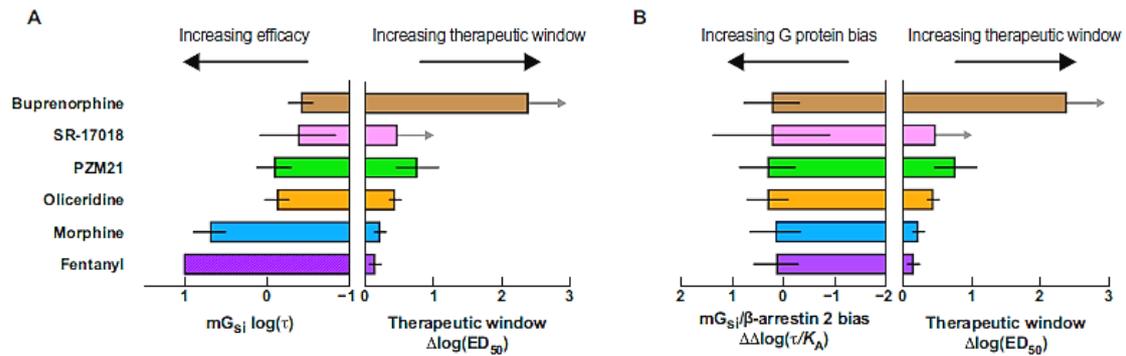


Figura 8. *A*: relazione tra efficacia e finestra terapeutica. *B*: relazione tra bias e finestra terapeutica.

1.5 Sistema oppioide classico

Gli oppioidi sono un'ampia classe di farmaci analgesici strutturalmente correlati agli alcaloidi naturali presenti nell'oppio. La parola oppio deriva dal greco antico “ὀπός” che significa “succo vegetale” e fa riferimento al succo lattiginoso che viene estratto incidendo le capsule acerbe del *Papaver Somniferum* L. (Papaveraceae). Tale succo viene tradizionalmente essiccato all'aria e modellato in panetti, che contengono più di cento alcaloidi differenti: il principale è la morfina, utilizzata in clinica come analgesico, seguita dalla codeina, un forte antitussivo e antidolorifico, e dalla papaverina, che ha proprietà spasmolitiche e da cui viene ottenuto per semisintesi il verapamile, un antiipertensivo e antianginoso della classe dei calcio-antagonisti. È presente anche la tebaina, un alcaloide che non ha applicazioni medicinali dirette a causa della sua scarsa efficacia come antidolorifico e perché provoca convulsioni, ma costituisce il precursore della buprenorfina³⁹. L'oppio è in grado di provocare una sensazione di euforia, di benessere, riesce a ridurre la sensibilità al dolore, all'ansia e allo stress. Gli effetti dell'oppio erano noti già agli antichi Sumeri che nel 3400 a.C. descrivevano il papavero da oppio come “*Hul Gil*”, “pianta della gioia”⁴⁰.

Nel 1806 il farmacista prussiano Friederich Wilhelm Adam Sertürner isolò la morfina dall'oppio, denominandola in questo modo in richiamo a Morfeo, il dio greco dei sogni⁴¹. In seguito anche gli altri alcaloidi vennero caratterizzati e questo determinò l'abbandono dell'utilizzo dell'oppio grezzo in medicina, sostituito dagli alcaloidi puri.

Nel 1973 diversi gruppi di ricerca dimostrarono tramite tecniche di binding recettoriale l'esistenza a livello cerebrale di tre recettori oppioidi, chiamati mu, delta e kappa⁴²⁻⁴⁴. I recettori oppioidi appartengono alla famiglia di classe A (rodopsina) dei GPCR e possiedono nella loro struttura due residui di cisteina impegnati nella formazione di un ponte disolfuro. I ligandi del recettore mu sono impiegati principalmente per la terapia del dolore; i ligandi del recettore delta producono un effetto analgesico e sono coinvolti nella regolazione dell'ansia e di altri disturbi dell'umore; infine, il recettore kappa possiede effetti anti prurito e sembra essere coinvolto nella sedazione e nella diuresi. Nel 1975 Hugles *et al.* scoprirono un peptide endogeno simil-oppiaceo che chiamarono encefalina⁴⁵. In

seguito vennero identificate altre due classi di peptidi oppioidi endogeni, le endorfine e le dinorfine⁴⁶. Nel 1994 è stato identificato un quarto recettore oppioide, inizialmente denominato recettore orfano simile al recettore oppioide (ORL-1)^{47,48}. Dopo la deorfanzizzazione del recettore ORL-1, tramite l'isolamento del peptide chiamato nocicettina/orfanina FQ (N/OFQ)^{49,50}, ORL-1 è stato rinominato in recettore del peptide N/OFQ (recettore NOP)⁵¹. Nel 1997 vennero scoperti e isolati da Zadina *et al.* altri due peptidi oppioidi naturali, l'endomorfina-1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) e l'endomorfina-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂), che si sono rivelati essere i peptidi con maggiore affinità per il recettore mu⁵².

Ad oggi sono stati identificati svariati peptidi oppioidi endogeni (tabella 1). Essi vengono prodotti per scissione proteolitica di precursori polipeptidici: i principali sono la prepropiomelanocortina (POMC) per le endorfine, la preprodinorfina (PDYN) per le dinorfine e la preproencefalina (PENK) per le encefaline. Le encefaline, le endorfine e le dinorfine condividono una sequenza ammino-terminale conservata, costituita dal cosiddetto "motivo oppioide" (Tyr-Gly-Gly-Phe), essenziale per consentire l'interazione del peptide con il sito di legame del recettore. I diversi peptidi oppioidi endogeni si distinguono in base alla natura del frammento C-terminale⁴⁶.

Tabella 1. Peptidi oppioidi endogeni, selettività recettoriale e sequenza amminoacidica.

Peptidi oppioidi endogeni	Recettori	Sequenza amminoacidica
Met-encefalina	delta, mu	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Leu-encefalina	delta, mu	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
β-Endorfina	mu, delta	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
Dinorfina A	kappa, mu	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
Dinorfina B	kappa	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
α-Neoendorfina	kappa	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
β-Neoendorfina	kappa	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro
Nocicettina/Orfanina FQ	NOP	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln
Endomorfina-1	mu	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂
Endomorfina-2	mu	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂

Le encefaline sono peptidi costituiti da una corta sequenza di cinque amminoacidi. Esse si distinguono in Met-encefalina e Leu-encefalina a seconda del residuo localizzato all'estremità C-terminale. Dimostrano avere una maggior selettività per il recettore delta, sebbene siano in grado di legare anche il recettore mu.

Le endorfine sono i peptidi oppioidi endogeni con la sequenza primaria più lunga, infatti sono formate da 31 amminoacidi. All'interno di questa famiglia le β -endorfine sono le più studiate: hanno una moderata affinità per i recettori mu e delta e sono potenti analgesici con effetti a lunga durata.

Le dinorfine sono costituite da 17 amminoacidi e ne esistono tre tipologie: la dinorfina A, la dinorfina B (rimorfina) e la neoendorfina. Esse esercitano la loro attività legandosi al recettore kappa, anche se possono legare con bassa affinità anche il recettore mu e i recettori NMDA¹⁹. Il peptide N/OFQ dimostra una somiglianza strutturale elevata con la dinorfina A, ma è incapace di legare i recettori oppioidi classici⁵³.

Le endomorfine hanno una struttura composta da 4 amminoacidi e si distinguono tra loro per il residuo in terza posizione: Trp per EM-1 e Phe per EM-2. Esse non presentano la sequenza del "motivo oppioide", inoltre non sono ancora stati identificati né il precursore peptidico da cui derivano, né i geni che ne codificano la struttura¹⁹.

Per quanto riguarda la nomenclatura dei recettori oppioidi, nel 2020 è stata introdotta la terminologia MOP, KOP, DOP e NOP, tuttavia l'International Union of Pharmacology (IUPHAR) riconosce ancora la nomenclatura mu, delta e kappa⁵⁴. In questa tesi è utilizzata la seconda versione.

1.6 Localizzazione dei peptidi e dei recettori oppioidi

Le encefaline sono distribuite in tutte le aree del sistema nervoso centrale, in particolare si trovano nelle regioni correlate alla percezione del dolore (midollo spinale, nucleo spinale del trigemino, sostanza grigia periacqueduttale (PAG) e talamo), alla modulazione del comportamento affettivo (amigdala, ippocampo, locus coeruleus e corteccia cerebrale), alla modulazione del controllo motorio (nucleo caudato e globo pallido), alla regolazione del sistema nervoso vegetativo e alle funzioni endocrine⁴⁶.

Le β -endorfine si trovano principalmente nel talamo, nell'ipotalamo, nell'ipofisi, nel nucleo arcuato, nel nucleo accumbens, nell'amigdala, nel locus coeruleus e nella PAG. In aggiunta si trovano in alcuni organi periferici, come pancreas, placenta, testicoli e midollare del surrene⁵³.

Le dinorfine sono distribuite nelle stesse aree delle encefaline, ma in quantità minori. Sono più concentrate a livello dell'ipofisi, dell'ipotalamo, dell'amigdala e dello striato. Si trovano anche a livello periferico, nel tratto gastrointestinale, nel pancreas, nel fegato, nei polmoni, nei reni, nel cuore, negli organi riproduttivi.

L'endomorfina-1 (EM-1) è ampiamente distribuita in tutto il cervello, mentre l'endomorfina-2 (EM-2) è in prevalenza presente nelle regioni terminali dei neuroni afferenti primari nel corno dorsale del midollo spinale. Per questo motivo EM-2 modula il dolore in una fase più precoce della percezione rispetto a EM-1^{55,56}.

I recettori oppioidi sono ampiamente distribuiti nel sistema nervoso centrale, in particolar modo nelle aree che elaborano e modulano le informazioni dolorifiche. A livello spinale la maggior parte dei recettori oppioidi è localizzata sui terminali presinaptici dei nocicettori afferenti primari. I recettori μ e κ si trovano nella PAG, nel locus coeruleus, nella substantia nigra, nell'area tegmentale ventrale, nei nuclei del rafe e nello striato. I recettori δ si trovano maggiormente nella PAG e nel talamo. I recettori oppioidi localizzati nel sistema limbico modulano la componente emotiva del dolore. Infine, questi recettori sono espressi anche a livello di cellule non neuronali, come le cellule neuroendocrine dell'ipofisi e del surrene e le cellule immunitarie.

Il recettore μ si trova anche nel sistema nervoso periferico, lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, nel sistema nervoso enterico e nei testicoli^{19,57,58}. La struttura cristallina di questo recettore è stata descritta per la prima volta nel 2012; nel 2015 è stata risolta la struttura cristallina del recettore legato ad un agonista: ciò ha permesso di analizzare il meccanismo con cui la modifica conformazionale innescata dall'agonista consente l'accoppiamento con la proteina G. Nel 2018 è stata determinata tramite microscopia crioelettronica (cryo-em) la struttura del recettore legato alla proteina G, mediante la quale si è potuto approfondire la struttura della conformazione attiva del recettore (*figura 9*)⁵⁹.

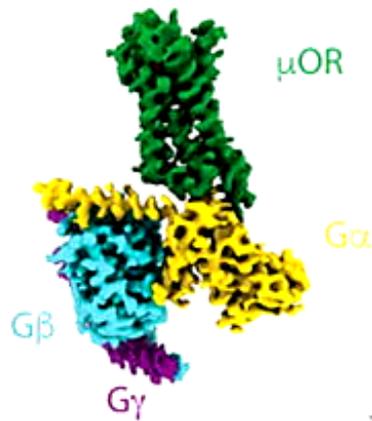


Figura 9. Struttura cryo-em del complesso μ -proteina G, colorato per subunità.

1.7 Effetti dei ligandi oppioidi

Sebbene gli oppioidi vengano utilizzati in medicina principalmente per il loro effetto analgesico, essi sono in grado di determinare numerosi altri effetti, a causa dell'ampia distribuzione dei recettori degli oppioidi a livello cerebrale, spinale e periferico (figura 10).

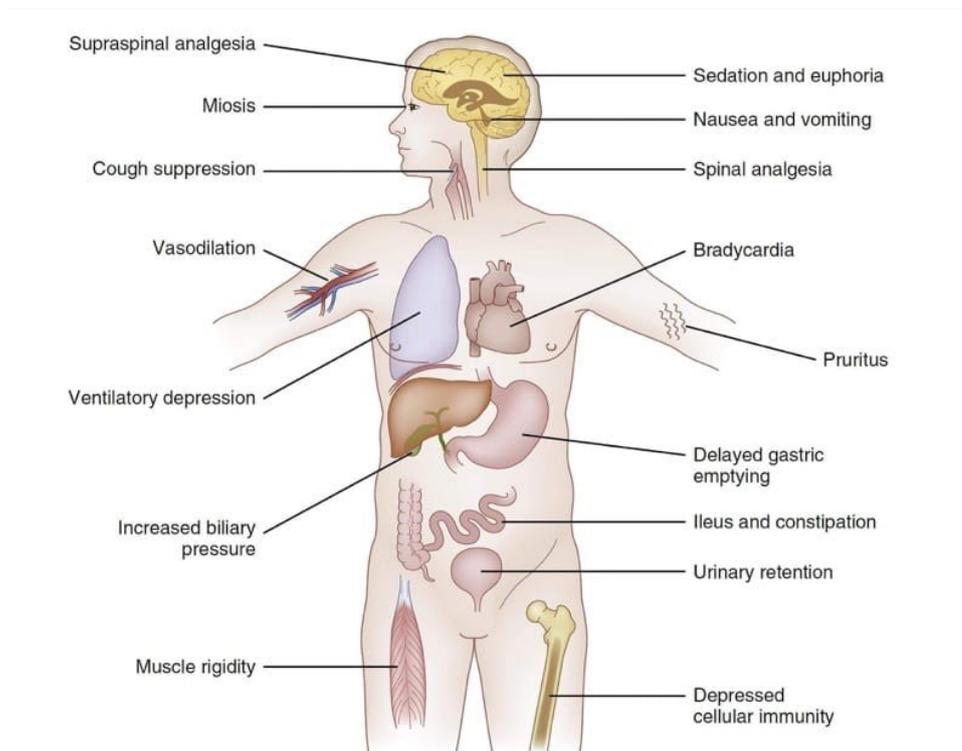


Figura 10. Effetti indotti dagli oppioidi sui principali organi dell'organismo.

Gli effetti collaterali più comuni sono la costipazione, che ha un'incidenza del 40-95%, e la nausea. Questi effetti risultano difficili da gestire e di frequente per essi non si sviluppa la tolleranza, in particolare per la costipazione. A causa della severità di questi effetti, spesso la terapia con gli oppioidi viene interrotta o viene ridotto il dosaggio, di conseguenza l'efficacia antidolorifica diviene inadeguata. Gli effetti collaterali comuni includono sedazione, sonnolenza, dipendenza fisica, tolleranza e depressione respiratoria. Effetti meno comuni sono il rallentato svuotamento gastrico, l'iperalgnesia, alcune disfunzioni endocrine ed immunitarie, rigidità muscolare e mioclonia⁴⁰.

Effetti sul sistema nervoso centrale

Analgesia – L'effetto antidolorifico deriva dall'azione degli oppioidi sul sistema nervoso centrale. Questo effetto è intenso, costante e dose-dipendente ed è mediato da un effetto combinato di azione sui terminali presinaptico e postsinaptico nel midollo spinale. A livello presinaptico gli oppioidi si legano ai recettori espressi sui terminali delle afferenze primarie di piccolo calibro (fibre C), inibendo i canali del calcio voltaggio dipendenti, da cui risulta una riduzione del rilascio di neurotrasmettitori coinvolti nella trasmissione dolorosa (sostanza P e glutammato). A livello postsinaptico gli oppioidi si legano sui neuroni di secondo ordine, provocando l'apertura dei canali del potassio GIRK, da cui derivano l'iperpolarizzazione neuronale, l'arresto dell'eccitazione neuronale e la riduzione della trasmissione del segnale dolorifico lungo il midollo spinale^{46,60}. A livello sovraspinale, in particolare nella regione cerebrale della PAG, gli oppioidi esercitano la loro azione analgesica inibendo la trasmissione GABAergica⁶¹. In aggiunta, una parte dell'effetto antidolorifico degli oppioidi è attribuita ad una componente affettiva a carico del sistema limbico, che riveste un ruolo fondamentale nella percezione e nell'esperienza dell'analgesia^{62,63}.

Depressione respiratoria – La principale causa di morte per overdose da oppioidi è dovuta alla depressione respiratoria. Gli oppioidi svolgono un'azione diretta sul centro respiratorio situato nel tronco encefalico, deprimendo tutte le fasi dell'attività respiratoria e provocando respiro irregolare e aperiodico. Questo effetto è dose-dipendente, infatti a dosi terapeutiche di morfina raramente si sviluppa una depressione respiratoria di intensità tale da risultare pericolosa per il paziente^{61,64}. Il naloxone e gli altri antagonisti del recettore mu ripristinano rapidamente la corretta respirazione. La depressione respiratoria non è un effetto desiderato degli oppioidi; tuttavia, la loro somministrazione ha un effetto terapeutico anti-dispnoico nei pazienti affetti da BPCO, per i quali talvolta vengono prescritti i farmaci oppioidi al fine di contrastare lo stato di panico che deriva dalla sensazione di "fame d'aria". L'agitazione, il disagio e l'affanno che questi pazienti provano vengono efficacemente repressi con la somministrazione di oppioidi⁴⁶.

Sedazione – Gli oppioidi possono compromettere le funzionalità cognitive provocando sonnolenza. Solitamente la sedazione si verifica all’inizio della terapia, oppure in seguito all’aumento del dosaggio del farmaco⁴⁶. Quest’effetto potrebbe essere dovuto all’inibizione dei neuroni nel locus coeruleus, dove sono localizzate le terminazioni nervose rilascianti noradrenalina⁶⁵, e all’effetto anticolinergico degli oppioidi⁴⁰. La sedazione può essere trattata riducendo la dose, cambiando l’oppioide, o somministrando psicostimolanti, come il metilfenidato⁴⁰.

Effetto bechico – Gli oppioidi deprimono il riflesso della tosse già a basse dosi, agendo sul centro della tosse localizzato nel bulbo. Questo effetto è indipendente dalla depressione respiratoria⁶⁶.

Effetti neuroendocrini – Gli effetti ormonali degli oppioidi interessano entrambi i generi e sono documentati per le somministrazioni orali, transdermiche, intravenose e intratecali. Gli oppioidi inibiscono il rilascio di numerosi ormoni dell’asse ipotalamo-ipofisi-surrene, tra cui: GnRH (ormone rilasciante la gonadotropina), CRH (ormone di rilascio della corticotropina), LH (ormone luteinizzante), ACTH (ormone adrenocorticotropo), testosterone, estradiolo, e cortisolo. Molti uomini che assumono oppioidi prescritti o illeciti soffrono di depressione, di calo dell’energia e di disfunzioni sessuali, come la disfunzione erettile ed il calo della libido. I livelli di testosterone diminuiscono nell’arco di 4 ore dopo la somministrazione di oppioidi e tornano alla normalità dopo 24 ore. Le donne possono soffrire di depressione, dismenorrea e disfunzioni sessuali. La riduzione dei livelli di estrogeni potrebbe causare una diminuzione della densità minerale ossea, avendo implicazioni nell’osteoporosi e nelle fratture. Tuttavia questa ipotesi, per quanto plausibile, non è ancora supportata da studi clinici⁴⁰. Infine, gli oppioidi alterano il processo di regolazione della temperatura ad opera dell’ipotalamo⁶⁶.

Iperalgesia – L'iperalgesia è definita come un'incrementata sensibilità al dolore, che si presenta nonostante la somministrazione di dosi crescenti di farmaci oppioidi. I meccanismi coinvolti nello sviluppo di questo effetto avverso comprendono: l'apoptosi cellulare indotta dagli oppioidi; la perdita di neuroni GABAergici in seguito all'apoptosi; l'attivazione dei recettori NMDA; l'aumentato rilascio di neurotrasmettitori eccitatori. Sono disponibili limitate opzioni terapeutiche per trattare l'iperalgesia e la tolleranza; nei topi è stato osservato che la somministrazione di ketamina, un antagonista NMDA, previene l'iperalgesia indotta dal fentanile⁴⁰.

Azioni psicoaffettive – Gli oppioidi possono provocare euforia e senso di benessere, con depressione dell'emotività e dell'aggressività. Il meccanismo attraverso il quale gli oppioidi esercitano questi effetti sembra coinvolgere il sistema dopaminergico mesocortolimbico, un pathway anatomico che si estende dall'area tegmentale ventrale, al nucleo accumbens e alla corteccia prefrontale, aree coinvolte nella motivazione e nell'affettività. Tuttavia non è ancora chiaro come gli oppioidi attivino questo sistema⁶⁷.

Nausea ed emesi – Rappresentano gli effetti secondari più comuni che si verificano dopo somministrazione di farmaci oppioidi. Sono provocati dalla stimolazione del centro del vomito situato nell'area postrema del midollo allungato⁶⁶.

Effetti sul sistema nervoso periferico

Miosi – La diminuzione del diametro pupillare è causata dalla stimolazione da parte degli oppioidi del nucleo parasimpatico del nervo oculomotore. Questo effetto viene antagonizzato dal naloxone e dall'atropina⁶⁶.

Sistema cardiovascolare – Gli oppioidi, stimolando il nervo vago, possono provocare bradicardia sinusale. La morfina è stata associata al rilascio di istamina e perciò causa vasodilatazione e ipotensione ortostatica. Questi effetti non sono molto comuni⁴⁰.

Inibizione del transito gastrointestinale – Gli oppioidi provocano una riduzione della produzione di acido cloridrico e un rallentamento della motilità gastrica, aumentando il rischio di reflusso esofageo. Riducono anche i movimenti peristaltici nell'intestino tenue e crasso e aumentano il tono muscolare degli sfinteri. La costipazione indotta da oppioidi costituisce un grave effetto collaterale che si riscontra con l'uso cronico di questi farmaci e ha un impatto negativo sulla qualità della vita dei pazienti⁶⁶. La costipazione cronica può provocare la formazione di emorroidi, dolore e bruciore a livello del retto, ostruzione intestinale; quest'ultima può potenzialmente condurre alla lacerazione dell'intestino e alla morte per setticemia. Rispetto alla depressione respiratoria, alla nausea e alla sedazione, la costipazione non migliora nel tempo, perciò deve essere anticipata e monitorata⁴⁰.

Sistema immunitario – Gli effetti immunomodulatori della morfina vennero inizialmente dimostrati dal medico e batteriologo romano Cantacuzene nel 1890. Egli somministrò il farmaco ai porcellini d'India e osservò una soppressione dell'immunità cellulare e una riduzione della resistenza alle infezioni batteriche. È oggi noto che gli agonisti oppioidi esogeni mediano l'immunosoppressione, mentre i ligandi endogeni esercitano l'effetto opposto, incrementando l'attività delle cellule Natural Killer. La somministrazione in acuto e in cronico di questi farmaci può avere effetti inibitori sulla risposta immunitaria cellulare e umorale, può ridurre l'attività delle cellule NK, l'espressione citochinica e l'attività fagocitaria. Non tutti gli oppioidi hanno gli stessi effetti sul sistema immunitario: il tramadolo, contrariamente alla morfina, aumenta l'attività delle cellule NK, la proliferazione linfocitaria e il rilascio di IL-2; la buprenorfina, un mu-agonista e kappa-antagonista, non mostra alcun effetto immunologico rispetto alla morfina^{40,68}.

Azioni sul tratto urinario – Gli oppioidi causano ritenzione urinaria, aumentando il tono delle fibre circolari dello sfintere vescicale e riducendo la tonicità e l'attività delle fibre longitudinali per via midollare⁶⁶. Questo effetto

compare maggiormente in seguito a somministrazione di morfina per via epidurale, rispetto alle vie IV e IM⁴⁰.

Prurito – Compare con gli oppioidi somministrati mediante qualsiasi via, ma è più comune con la somministrazione endovenosa e intratecale. Il meccanismo non è ancora chiaro, ma sembra essere mediato dai neuroni spinali⁶⁶.

Tolleranza – Sebbene gli oppioidi, come la morfina, rimangano gli antidolorifici di prima scelta in molti casi clinici, una limitazione importante al loro utilizzo a lungo termine è lo sviluppo della tolleranza agli effetti analgesici, che si osserva in tutti i pazienti durante la somministrazione prolungata di farmaci oppioidi. Solitamente la tolleranza non rappresenta un problema qualora la terapia antidolorifica sia necessaria per un breve periodo. Il fenomeno consiste nella marcata perdita di potenza del farmaco dopo ripetute somministrazioni, di conseguenza per ottenere lo stesso effetto analgesico si rende necessario aumentare la dose. Esistono due tipologie di tolleranza: innata, che è determinata geneticamente e compare fin dalla prima dose dell'oppioide; acquisita, che è suddivisa in farmacocinetica e farmacodinamica. La tolleranza farmacocinetica consiste nella variazione del metabolismo di un farmaco in seguito alla sua somministrazione ripetuta, ad esempio compare quando un farmaco induce l'espressione di un enzima responsabile del suo metabolismo. La tolleranza farmacodinamica, a cui sono soggetti gli oppioidi, è rappresentata dalla classica diminuzione di efficacia di un oppioide con il trascorrere del tempo, a causa della sotto-regolazione dei recettori⁴⁰. I meccanismi coinvolti nella tolleranza non sono ancora pienamente compresi e al suo sviluppo possono contribuire diversi eventi cellulari: la dissociazione del complesso recettore-proteina G, la diminuzione del numero di recettori sulla membrana conseguente alla loro internalizzazione nella cellula per endocitosi (desensibilizzazione), la sovra-espressione dell'enzima adenilato ciclasi per compensare il blocco provocato dagli oppioidi e quindi l'aumento del cAMP, infine l'incremento della sensibilità del recettore NMDA^{19,69}. Gli antagonisti del recettore NMDA (per esempio memantina e ketamina) contrastano lo sviluppo della tolleranza alla morfina⁴⁰.

Dipendenza – L'utilizzo a lungo termine degli oppioidi può causare in alcuni pazienti lo sviluppo di dipendenza fisica, un'alterazione dello stato fisiologico che si manifesta nella crisi di astinenza mediante iperattività somatica e vegetativa. Consiste nel bisogno di continue somministrazioni di dosi crescenti del farmaco per prevenire la comparsa dei sintomi di astinenza in seguito alla sospensione improvvisa dell'oppioide. Tali sintomi sono allo stesso tempo psicologici, fisici e neurovegetativi e comprendono: la perdita di controllo dell'individuo, il pensiero ossessivo e il desiderio irresistibile della sostanza (craving), l'irrefrenabile bisogno di procurarsi e assumere una nuova dose⁷⁰. I farmaci oppioidi sono spesso oggetto di abuso: negli Stati Uniti è attualmente in corso una grave crisi della salute pubblica, denominata "epidemia da oppioidi", che sta causando la morte di decine di migliaia di cittadini all'anno. La crisi è stata inizialmente innescata dalla prescrizione eccessiva di analgesici oppioidi, che ha facilitato il loro utilizzo improprio, e ora si è espansa all'eroina e al fentanile, la cui elevata potenza promuove la dipendenza e aumenta la letalità^{71,72}. Dei farmaci oppioidi si fa sovente abuso, perché la stimolazione dei recettori oppioidi localizzati nelle aree cerebrali responsabili della percezione del piacere e del benessere (area tegmentale ventrale e nucleo accumbens) provoca una sensazione di euforia che porta il soggetto a farne un uso ripetuto. La tolleranza e la dipendenza potrebbero condividere un meccanismo comune, in quanto la gravità dei sintomi di astinenza e il grado di sviluppo della tolleranza risultano correlati sia in vitro che in vivo. Inoltre, utilizzando degli antagonisti del recettore NMDA per bloccare la tolleranza, la dipendenza non si sviluppa, evento che suggerisce la correlazione tra i due processi. L'iperproduzione di cAMP intracellulare è un meccanismo comune che contribuisce sia alla tolleranza, che alla dipendenza⁶⁹. Tuttavia, esistono evidenze per una dissociazione dei due fenomeni, tolleranza e dipendenza, ad esempio i topi knockout per la β -arrestina 2 mostrano una riduzione della tolleranza ma non della dipendenza fisica^{27,73}.

1.8 Classificazione del dolore

Il dolore viene classificato in nocicettivo, infiammatorio e patologico. Il dolore nocicettivo ha una funzione protettiva di allarme, essenziale per riconoscere e minimizzare il contatto con stimoli dannosi e nocivi. Questo tipo di dolore ad alta soglia viene percepito quando si tocca qualcosa troppo caldo, freddo o affilato, dunque in seguito alla presenza di uno stimolo intenso. L'organismo risponde alla sensazione dolorosa sia innescando un riflesso involontario, che consente di preservare la zona sottoposta a tale stimolo, sia generando una sensazione spiacevole, che viene elaborata tramite complesse strategie comportamentali e che porta ad evitare ulteriori contatti con lo stimolo (*figura 11*)⁷⁴. Il dolore nocicettivo viene suddiviso in somatico e viscerale: nel primo caso si ha la stimolazione dei nocicettori superficiali (cute, mucose) o profondi (articolazioni, ossa, muscoli); nel secondo caso vengono stimolati i recettori dolorifici presenti negli organi interni. Il dolore nocicettivo non rappresenta un problema clinico, ad eccezione dello specifico contesto delle operazioni chirurgiche, in cui gli stimoli nocivi devono essere soppressi con anestetici locali o generali, oppure oppioidi. Pericolose sono, invece, l'insensibilità congenita o l'indifferenza al dolore, causate da mutazioni del gene *SC9A* codificante per il canale del sodio voltaggio-dipendente $Na_v1.7$ ^{75,76}, che predispongono per fratture ossee, automutilazioni, ferite multiple, usura delle articolazioni e amputazioni. Ciò rimarca il ruolo protettivo del dolore nocicettivo per mantenere l'integrità corporea⁷⁷.

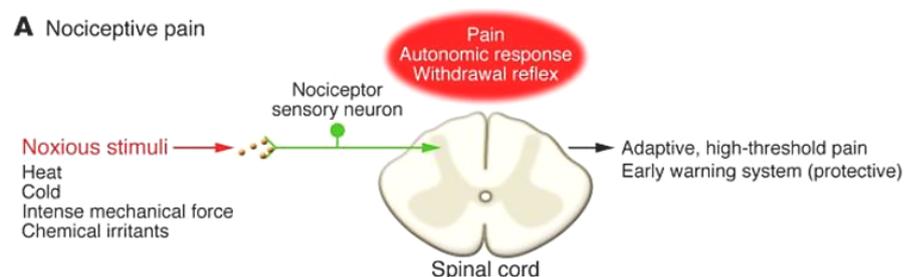


Figura 11. Dolore nocicettivo.

Il dolore infiammatorio, similmente al dolore nocicettivo, è protettivo e adattivo. Viene innescato dal sistema immunitario successivamente ad una lesione o

infiammazione tissutale. Questo tipo di dolore intensifica la sensibilità, in corrispondenza della lesione, a stimoli altrimenti innocui e non dolorosi, creando una condizione che scoraggia il contatto fisico e il movimento. In questo modo viene favorita la guarigione della ferita e viene ridotto il rischio di ulteriore danneggiamento. Sebbene questa forma di dolore sia adattiva, necessita di trattamento in quei pazienti che soffrono di infiammazione cronica, per esempio dovuta all'artrite reumatoide, o soggetti a danno tissutale molto esteso (figura 12)⁷⁷. Durante l'infiammazione avviene un fenomeno denominato "sensibilizzazione centrale", che rende il cervello ed il midollo spinale più sensibili agli stimoli nocicettivi afferenti; ne consegue la diminuzione della soglia di generazione del dolore ed il prolungamento della sua durata ed intensità⁷⁴.

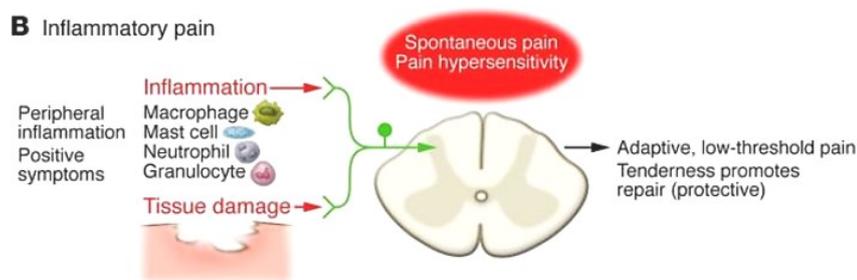


Figura 12. Dolore infiammatorio.

Il dolore patologico non è protettivo e deriva dal funzionamento anormale del sistema nervoso. Viene suddiviso in neuropatico e disfunzionale. Nel primo caso si ha un danno diretto al sistema nervoso; nel secondo caso non si riscontra un danno o un'infiammazione. Esempi di dolore neuropatico comprendono la neuropatia diabetica, la sclerosi multipla e la sindrome dell'arto fantasma. Diversi meccanismi concorrono nel generare questa forma di dolore: una componente essenziale è una lesione della via di segnalazione afferente; altri meccanismi includono la variazione della quantità e della densità dei canali ionici, la sensibilizzazione centrale e periferica, riorganizzazioni corticali, la sotto-regolazione dei recettori oppioidi e del GABA nel corno dorsale del midollo spinale. Le terapie di prima linea per il dolore neuropatico comprendono gli antidepressivi triciclici (amitriptilina), gli SNRI (duloxetina), il gabapentin e il

pregabalin. I trattamenti di seconda linea sono costituiti dal tramadolo, dai cerotti a base di capsaicina o di lidocaina. In terza linea ci sono oppioidi come morfina e ossicodone e il botox⁷⁸.

Esempi di condizioni che scatenano il dolore disfunzionale includono la fibromialgia, la sindrome dell'intestino irritabile, l'emicrania tensiva, la cistite interstiziale e altre sindromi, accumulate da una sensazione di dolore in assenza di stimoli nocivi (allodinia) o di infiammazione. Il dolore patologico è la conseguenza dell'amplificazione dei segnali sensoriali afferenti al sistema nervoso centrale ed è un dolore a bassa soglia (figura 13)⁷⁷.

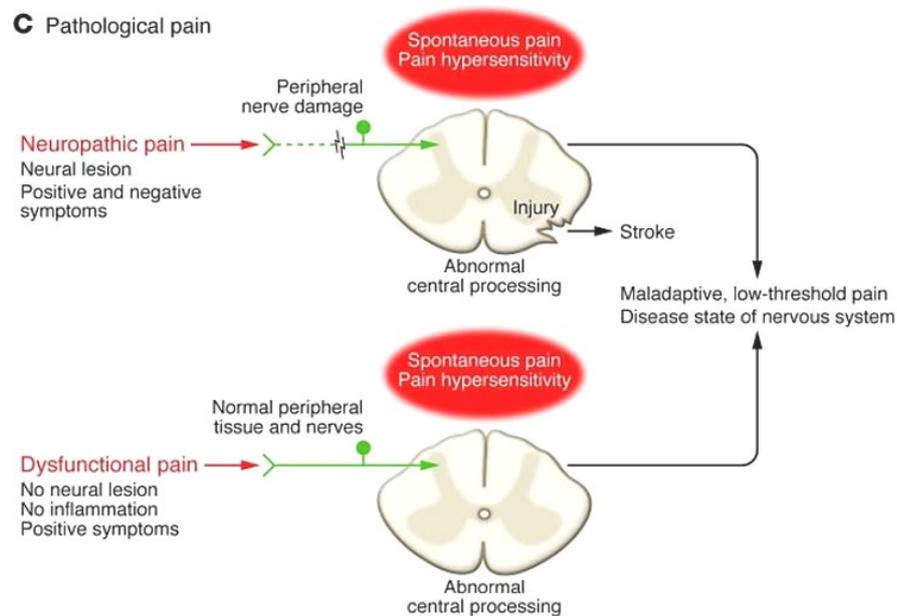


Figura 13. Dolore patologico.

Dal momento che i meccanismi alla base di queste tre tipologie di dolore sono differenti, richiederanno trattamenti diversificati⁷⁶.

1.9 Vie di trasmissione del dolore

I nervi sensoriali afferenti inviano varie tipologie di informazioni al cervello. Essi originano a livello cutaneo, muscolare e articolare, dove sono presenti recettori in grado di recepire i diversi stimoli e di produrre potenziali d'azione da propagare all'interno del nervo. Il potenziale d'azione viene trasmesso al ganglio dorsale del midollo spinale, dove il nervo periferico forma una sinapsi con un nervo spinale che porta l'informazione al cervello tramite le vie spinotalamica e spinoparabrachiale. Nel cervello la trasduzione avviene tramite la formazione di sinapsi con il midollo allungato parabrachiale, il talamo, l'amigdala, il sistema limbico e la corteccia somatosensoriale.

La trasmissione del dolore (*figura 14*) inizia in periferia a livello delle terminazioni dei neuroni afferenti primari, sensibili a stimoli meccanici, termici e chimici. Le fibre afferenti primarie sono classificate sulla base della velocità di conduzione del segnale: le fibre A β sono fibre mieliniche di grosso calibro a rapida conduzione (>20 m/s) che vengono attivate da stimoli innocui, producendo le sensazioni del tatto; sottili e mieliniche sono le fibre A δ , che conducono con una velocità tra i 2 e i 20 m/s e producono una sensazione di intenso formicolio; le fibre più abbondanti nei nervi periferici sono le fibre C, fibre a lenta conduzione (<2 m/s) non mieliniche che generano una sensazione di bruciore prolungato. Le fibre A δ sono responsabili della prima percezione del dolore, che è acuta e pungente, mentre le fibre C scatenano la successiva sensazione di bruciore prolungato.

Il primo processo coinvolto nella percezione di uno stimolo doloroso è la trasduzione, che avviene quando gli assoni periferici dei neuroni afferenti primari sono attivati da uno stimolo nocivo. Sono stati identificati vari recettori espressi a livello assonale, che includono: il recettore vanilloide 1, sensibile al calore, alla capsaicina e ai protoni; i GPCR Mas-related, che si pensa siano responsabili della recezione di stimoli nocivi di tipo meccanico.

Il secondo processo è la trasmissione, mediata da un sistema a due fibre (A δ per la conduzione rapida, C per la conduzione più lenta), le quali trasmettono gli impulsi dolorifici al corno dorsale del midollo spinale. A questo livello la plasticità cellulare consente la modulazione degli impulsi. Qui le fibre afferenti primarie

formano sinapsi con tre tipologie di neuroni di secondo ordine: i neuroni NS (nociceptive specific), WDR (wide dynamic range) e LR (low threshold). I neuroni NS rispondono a stimoli nocivi ad alta soglia, i WDR a stimoli sensoriali e i LR a stimoli innocui. I neuroni di secondo ordine trasmettono il segnale al talamo, attraverso le vie spino-talamica laterale e mediale. Il talamo elabora le informazioni somatosensoriali e le trasmette tramite neuroni di terzo ordine a varie regioni cerebrali, come la corteccia somatosensoriale primaria e secondaria, l'insula, la corteccia prefrontale e la corteccia anteriore cingolata. Nella corteccia viene elaborata la percezione del dolore, in termini di intensità, durata e localizzazione⁷⁸.

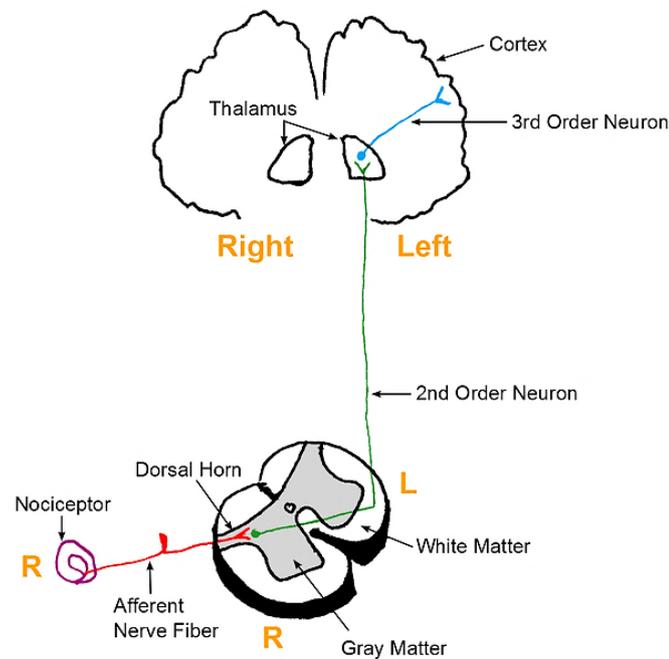


Figura 14. Rappresentazione schematica della trasmissione del segnale nocicettivo.

1.10 Modulazione del dolore

La modulazione del dolore è un processo endogeno che si ritiene fornisca un vantaggio in termini di sopravvivenza: a prova di ciò, durante la Seconda guerra mondiale l'anestesiologo Beecher osservò che alcuni soldati riportavano varie ferite di battaglia, ma provavano poco o alcun dolore. È dunque presente nell'organismo un sistema di modulazione e dissociazione della trasmissione del dolore. I meccanismi responsabili di questo fenomeno comprendono l'inibizione segmentale, il sistema oppioide endogeno e il sistema dei nervi discendenti inibitori.

L'inibizione segmentale è più nota con la denominazione di "teoria del cancello" ("gate theory") e consiste nel blocco delle sinapsi che si formano tra le fibre A δ e C e i neuroni di secondo ordine nel corno dorsale del midollo spinale. Tale inibizione avviene quando le fibre A β , che sono sensibili al tatto, dunque a stimoli non dolorifici, stimolano il nervo inibitorio nel midollo spinale, che a sua volta sopprime la trasmissione nelle fibre C. Per questo motivo quando si massaggia una parte del corpo dolorante viene ridotta la sensazione dolorosa.

Il sistema oppioide endogeno è formato dalle encefaline, endorfine e dinorfine, peptidi che si comportano da neurotrasmettitori e neuromodulatori. Legano i recettori oppioidi presenti nella via di trasmissione del dolore inducendo l'effetto analgesico. La materia grigia spinale è suddivisa in 10 lamine: le prime 5 comprendono il corno dorsale e ricevono gli input sensoriali provenienti dalla periferia, inclusi gli stimoli nocicettivi. Le lamine I, II e V sono ricche di neuroni encefalinergici, interneuroni che rilasciano encefaline localmente nel corno spinale. I neuroni dinorfinergici sono presenti principalmente nella lamina I. Nel corno spinale, oltre ai neuroni che producono i peptidi oppioidi, sono localizzati anche i recettori oppioidi: μ e κ si trovano nelle lamine I e II, regioni dove si proiettano molte fibre A δ e C; i recettori delta sono distribuiti in tutto il corno dorsale e anche nel corno ventrale⁷⁹.

Nel corno dorsale i recettori μ sono espressi sia a livello presinaptico sui terminali delle fibre afferenti primarie A δ e C, sia a livello postsinaptico sui neuroni di secondo ordine. L'attivazione del recettore a livello presinaptico provoca l'inibizione dell'adenilato ciclasi per mezzo della subunità α e

l'inibizione dei canali per il calcio voltaggio-dipendenti tramite la subunità $\beta\gamma$. Questo comporta il blocco del rilascio dei neurotrasmettitori eccitatori glutammato e sostanza P. A livello postsinaptico vengono aperti i canali del potassio GIRK, con conseguente iperpolarizzazione del neurone (figura 15). Nel complesso un agonista del recettore mu inibisce l'eccitazione dei neuroni di secondo ordine⁴⁶.

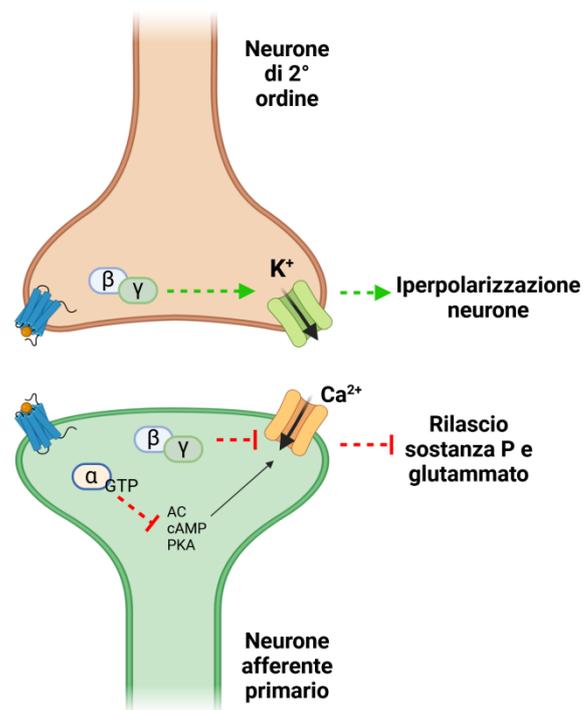


Figura 15. Effetti neuronali derivanti dall'attivazione del recettore mu.

Il sistema dei nervi discendenti inibitori controlla la trasmissione dei segnali nocivi tramite due neurotrasmettitori: la serotonina, prodotta nel nucleo del rafe magno, e la noradrenalina, sintetizzata nel locus coeruleus. Questi silenziano il segnale doloroso nel corno dorsale in tre modi: inibendo direttamente le cellule del corno dorsale che trasmettono il dolore; inibendo i neuroni eccitatori; eccitando i neuroni inibitori⁷⁸.

1.11 Terapia del dolore

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha formulato delle linee guida per la terapia farmacologica del dolore, basate sull'intensità del dolore (figura 16).



Figura 16. Scala del dolore secondo l'OMS.

Per il dolore lieve è consigliata la somministrazione di analgesici antipiretici come il paracetamolo, o FANS associati o meno a adiuvanti. Per il dolore moderato è consigliato il trattamento con oppioidi deboli, associati o meno a adiuvanti. Per il dolore severo è suggerito l'uso di analgesici oppioidi forti associati o meno a adiuvanti.

1.12 Peptidi oppioidi in terapia: stato attuale delle conoscenze

Come si è discusso nelle pagine precedenti, l'utilizzo della morfina e degli altri alcaloidi oppioidi come analgesici è legato a gravi controindicazioni, che derivano dalla contemporanea attivazione del recettore μ in tessuti diversi. Negli ultimi anni la ricerca farmaceutica si è indirizzata verso lo sviluppo di nuovi peptidi analgesici derivati dai peptidi oppioidi endogeni. L'utilizzo di peptidi come agenti terapeutici offre dei vantaggi, come l'elevata selettività e specificità per il bersaglio desiderato e una assenza di tossicità. I peptidi oppioidi endogeni in sé hanno una rilevanza terapeutica limitata, a causa della scarsa capacità di attraversare la barriera ematoencefalica e della ridotta stabilità nei confronti della degradazione proteolitica. È possibile intervenire con diversi approcci per risolvere questi limiti: modificando la sequenza peptidica con amminoacidi non naturali o destrogiri si può incrementare la stabilità, dato che questi residui non vengono riconosciuti dalle peptidasi; ciclizzando peptidi lineari si può ridurre la variabilità conformazionale, aumentare la stabilità metabolica (in uno studio di stabilità EM-2 è andata incontro a totale degradazione in 90 minuti, mentre gli analoghi ciclici sono rimasti immutati, con meno del 7% di degradazione⁸⁰) e la lipofilia, fattori che possono risultare in una emivita più prolungata e una penetrazione più semplice attraverso le membrane biologiche⁸¹. Affinché la ciclizzazione possa incrementare l'affinità recettoriale e l'attività funzionale, è necessario comprendere quale sia l'opportuno orientamento del backbone peptidico e delle catene laterali.

I peptidi oggetto di questa tesi sono analoghi dell'endomorfina-2 (EM-2), un peptide oppioide naturale lineare, ottenuti tramite ciclizzazione e modificazione con amminoacidi non naturali. Sono state indagate le proprietà farmacologiche di questi derivati di EM-2 in quanto le endomorfine, rispetto agli altri peptidi oppioidi endogeni, come le encefaline, le endorfine e le dinorfine, sono considerate i veri analgesici endogeni nei mammiferi, essendo rilasciate in risposta agli stimoli dolorifici⁵⁵.

Capitolo II

Scopo della ricerca

I farmaci oppioidi più comunemente somministrati in ambito clinico al fine di controllare efficacemente il dolore da moderato a severo sono la buprenorfina, la codeina, il fentanile, il metadone, la morfina, il tramadolo, il tapentadolo, l'ossicodone, l'idromorfone e l'idrocodone. L'utilizzo di questi farmaci è associato a molteplici effetti collaterali, che possono compromettere la qualità di vita del paziente. I più frequenti effetti derivanti dall'utilizzo in acuto sono a carico del tratto gastrointestinale, dunque la costipazione, la nausea ed il vomito; nel caso dell'utilizzo cronico si possono sviluppare tolleranza e dipendenza. In ambito ospedaliero è rara la comparsa di depressione respiratoria, la quale è invece causa di decesso nei pazienti tossicodipendenti⁸².

In questa tesi sono state determinate le proprietà farmacologiche di dieci molecole analoghe del peptide oppioide naturale endomorfina-2, il quale possiede elevata affinità e selettività per il recettore mu oppioide. L'endomorfina-2 presenta scarse proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche, che ne impediscono l'uso clinico come analgesico: viene rapidamente degradata dalle peptidasi e ha una ridotta capacità di attraversare la barriera ematoencefalica. I composti testati sono derivati ciclici di EM-2 contenenti amminoacidi non naturali che li rendono più stabili alla degradazione enzimatica.

Mediante il saggio di Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) si è valutata la capacità dei ligandi di indurre l'interazione del recettore mu oppioide con la proteina G e con la β -arrestina; in particolare si è determinato se alcuni di questi composti sono selettivamente funzionali per la via di segnalazione della

proteina G, la cui attivazione sembra essere implicata nello sviluppo dell'analgesia in misura maggiore rispetto agli effetti collaterali.

I dati sperimentali ottenuti possono fornire un utile strumento per la comunità scientifica al fine di approfondire maggiormente il meccanismo d'azione degli analgesici oppioidi e per comprendere il concetto della "selettività funzionale" la quale potrebbe avere un ruolo fondamentale nello sviluppo di nuovi farmaci aventi maggiore tollerabilità e/o efficacia.

Capitolo III

Materiali e metodi

3.1 Ligandi

I ligandi utilizzati in questa tesi sono stati sintetizzati dal gruppo di Anna Janecka e Justyna Piekielna-Ciesielska (Università medica di Łódź, Polonia) modificando la struttura chimica del peptide oppioide naturale endomorfina-2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) tramite ciclizzazione. I due amminoacidi che, interagendo, chiudono il peptide a formare un ciclo sono la D-lisina (D-Lys) in seconda posizione, che sostituisce la prolina (Pro), e l'acido aspartico (Asp) in quinta posizione, che è aggiuntivo rispetto ai quattro amminoacidi che compongono EM-2. Ciascun ligando è stato sintetizzato nella versione con una tirosina (Tyr) in prima posizione o una 2,6-dimetiltirosina (Dmt). Ulteriori modifiche sono state apportate in posizione 3 o 4, dove Phe è stato sostituito da β^2 - o β^3 -1-naftilalanina (β^2/β^3 -1-Nal). Le strutture complete dei composti sono riportate in *tabella 2*.

Tabella 2. Sequenza amminoacidica dei ligandi oggetto di questa tesi

Peptide n.	Sequenza amminoacidica	PM
152	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂ (endomorfina-2)	572
170	Tyr-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH ₂	699
336	Dmt-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH ₂	727
511	Tyr-c(D-Lys-(R) β^2 -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	763,9
512	Dmt-c(D-Lys-(R) β^2 -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	792
509	Tyr-c(D-Lys-Phe-(R) β^2 -1Nal-Asp)-NH ₂	763,9
513	Dmt-c(D-Lys-Phe-(R) β^2 -1Nal-Asp)-NH ₂	792
508	Tyr-c(D-Lys-(R) β^3 -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	763,9
514	Dmt-c(D-Lys-(R) β^3 -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	792
510	Tyr-c(D-Lys-Phe-(R) β^3 -1Nal-Asp)-NH ₂	763,9
515	Dmt-c(D-Lys-Phe-(R) β^3 -1Nal-Asp)-NH ₂	792

3.2 Composizione delle soluzioni

- **Terreno di coltura:** DMEM e HAM'S F-12 in rapporto 1:1, addizionato con 10% (v/v) di FBS, 1% di L-glutammina, penicillina (100 μ g/ml), streptomina (100 μ g/ml), igromicina B (100 μ g/ml), geneticina (G418, 200 μ g/ml), 1% di sodio piruvato, amfotericina B (2,5 μ g/ml).
- **PBS:** NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), NaHCO₃ (4,2 mM) e PO₄³⁻ (10 mM).
- **PBS-EDTA:** PBS, EDTA (300 mM).
- **DPBS:** PBS, MgCl₂ (0,5 mM), CaCl₂ (0,9 mM).
- **HB-7S:** HB-7, saccarosio (320 mM).
- **HB-7:** EGTA (acido tetracetico etilen-glicole 1 mM), TRIS (tri-idrossimetil-amminometano, 5 mM), DTT (ditiotreitolo, 1 mM).
- **Working reagent (WR):**
 - Reagente A: Q-PRO-BCA: 1% BCA/tartrato (acido bicinconinico) in tampone alcalino;
 - Reagente B: 4% CuSO₄·5H₂O in H₂O.

3.3 Saggio BRET

Il saggio di Bioluminescence Resonance Energy Transfer si basa sul trasferimento di energia non radiativo tra una molecola donatrice bioluminescente e una molecola accettrice fluorescente. L'energia viene trasferita per risonanza mediante l'accoppiamento dipolo-dipolo tra tali due specie e si verifica solamente se queste si trovano in prossimità (tipicamente entro 10 nm). Una condizione necessaria affinché si verifichi il trasferimento energetico è la sovrapposizione tra lo spettro di emissione del donatore e lo spettro di eccitazione dell'accettore: così l'accettore assorbe la luce emessa dal donatore e la riemette ad una lunghezza d'onda maggiore, determinando il segnale BRET (*figura 17*). Tale fenomeno è stato osservato in alcuni organismi marini, come la medusa *Aequorea Victoria* ed il corallo *Renilla Reniformis*. In particolare, da quest'ultimo è stata isolata una coppia di proteine che trovano applicazione nel saggio BRET: la *Renilla Luciferasi (RLuc)*, enzima bioluminescente in grado di emettere luce in presenza del substrato coelenterazina, e il fluoroforo *Renilla Green Fluorescent Protein (RGFP)*.

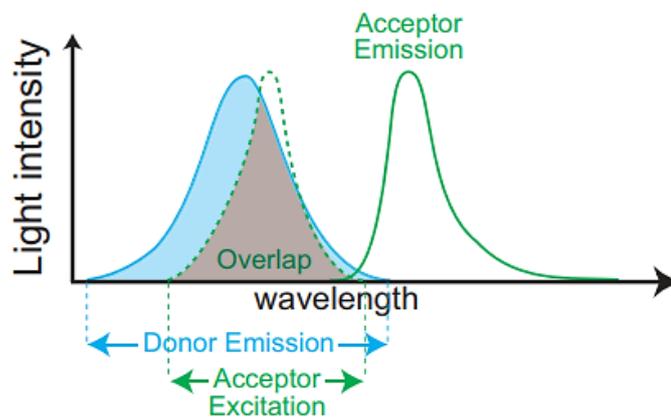


Figura 17. Nel saggio BRET il trasferimento di energia da un donatore (enzima bioluminescente) ad un accettore (fluoroforo) avviene se lo spettro di emissione del donatore si sovrappone allo spettro di eccitazione dell'accettore.

Una metodica simile a BRET si chiama FRET (Förster Resonance Energy Transfer), nella quale il donatore è costituito da una proteina fluorescente che deve essere eccitata. Dal momento che BRET non richiede una fonte di luce

esterna per eccitare il donatore, non soffre dei problemi riscontrabili talvolta in FRET, quali la diffusione della luce, il photobleaching e l'autofluorescenza, che è molto più intensa della luminescenza endogena nelle cellule di mammifero; inoltre, non si sottopongono le cellule a stress luminoso, condizione che ne previene il danneggiamento^{83,84}.

L'intensità del segnale BRET è inversamente proporzionale alla distanza tra donatore ed accettore: aumentando progressivamente la distanza tra le due specie, l'intensità del segnale decresce. La distanza massima che consente il trasferimento non radiativo di energia è pari a 10 nm (*figura 18*).

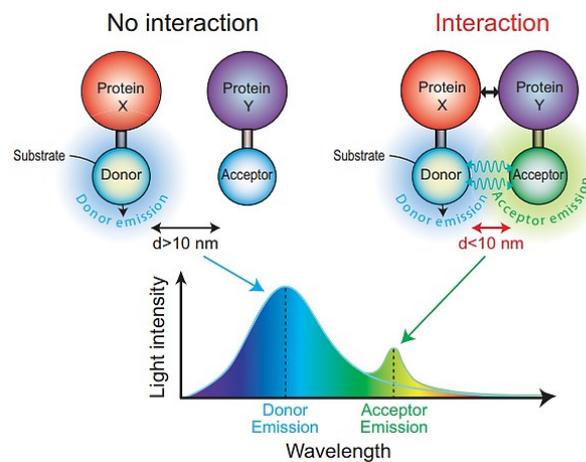


Figura 18. Il trasferimento energetico può verificarsi solo se donatore ed accettore sono sufficientemente vicini.

Per studiare l'interazione tra due proteine, una viene fusa con il donatore di energia, mentre l'altra con l'accettore. Qualora le due proteine di fusione non dovessero interagire tra loro, il trasferimento di energia non si verificherebbe e il segnale registrato corrisponderebbe alla luce emessa dal donatore. Se le proteine si avvicinano, fino a raggiungere una distanza inferiore a circa 10 nm, allora il trasferimento energetico per risonanza dal donatore all'accettore può avvenire e verrà misurato un segnale luminoso aggiuntivo, corrispondente alla fluorescenza dell'accettore⁸³. RLuc ha uno spettro di emissione con un massimo a 405 nm, mentre RGFP ha un massimo di emissione a 510 nm. Misurando il rapporto tra il segnale a 510 nm e a 405 nm si stabilisce se le due proteine hanno interagito.

Il saggio BRET è una delle tecniche farmacologiche più versatili per studiare la dinamica delle interazioni proteina-proteina o proteina-ligando nelle cellule

viventi, specialmente nel campo della ricerca sui recettori accoppiati a proteine G: in particolare è stato validato per i recettori oppioidi mu e delta⁸⁵ e per i recettori β -adrenergici⁸⁶. In questa tesi il saggio è stato sfruttato per studiare gli effetti dei ligandi sulle vie di segnalazione della proteina G e dell'arrestina. L'enzima RLuc è stato legato alla porzione C-terminale del recettore mu, mentre la RGFP è stata coniugata alla subunità β_1 della proteina G e alla β -arrestina 2. L'enzima RLuc catalizza la decarbossilazione ossidativa del substrato coelenterazina (Prolume Purple Coelenterazine), con formazione di coelenterammide, CO₂ e luce visibile con un picco nel campo del blu (*figura 19*). RGFP assorbe parte di questa energia e la riemette ad una lunghezza d'onda superiore, visibile come luce verde.

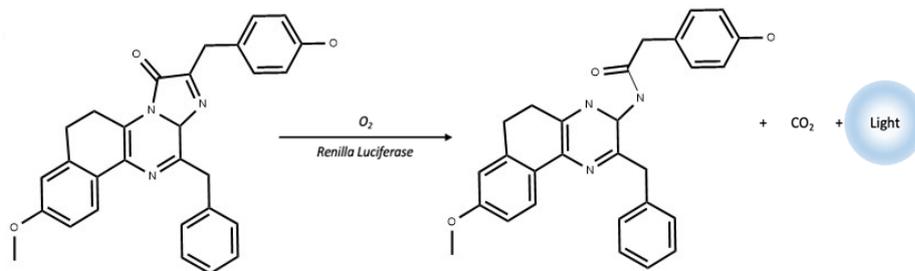


Figura 19. Reazione chimica catalizzata dall'enzima RLuc.

3.3.1 Preparazione delle colture cellulari

Sono state utilizzate due linee cellulari di neuroblastoma umano:

- **SH-SY5Y** trasdotte stabilmente con le fusoproteine ***mu-RLuc*** e ***G β_1 -RGFP***
- **SH-SY5Y** trasdotte stabilmente con le fusoproteine ***mu-RLuc*** e ***β -arrestina 2-RGFP***

Le cellule sono state coltivate in fiasche T175 sterili e mantenute in opportuno terreno di coltura arricchito con fattori di selezione. Le cellule sono state conservate in incubatore a 37°C, in presenza del 5% di CO₂ e in condizioni ottimali di umidità.

3.3.2 Interazione del recettore mu con la β -arrestina 2

Dal momento che la β -arrestina 2 è una proteina citoplasmatica, lo studio dell'interazione del recettore mu con la β -arrestina 2 è stato condotto in cellule intere (SH-SY5Y mu-RLuc/ β -arrestina 2-RGFP). Le cellule vengono coltivate fino a ottenere una confluenza del 90%. Raggiunta questa, si rimuove il terreno di coltura e si esegue un lavaggio con 5 ml di PBS sterile. Vengono poi aggiunti 2 ml di una soluzione composta da tripsina, enzima proteolitico che degrada le proteine della matrice che mantengono le cellule adese alla parete, ed EDTA, agente chelante di ioni bivalenti come Ca^{2+} e Mg^{2+} , coinvolti nell'adesione. Si lascia agire questa soluzione in incubatore per circa due minuti. Trascorso il tempo, si agita la fiasca per promuovere il distacco delle cellule e si neutralizza l'azione proteolitica della tripsina aggiungendo 8 ml di terreno di coltura. Le cellule vengono aspirate e trasferite in una falcon sterile da 15 ml. Si esegue la conta cellulare utilizzando un contatore di cellule automatizzato (Corning Cell Counter): si trasferiscono 10 μl di sospensione cellulare nella camera di conteggio, costituita da un supporto rettangolare in vetro dotato di una tasca per il caricamento della sospensione coperta con un vetrino coprioggetto.

Il numero di cellule per millilitro, determinato dallo strumento come una media di 6-7 letture in punti differenti della camera di conteggio, viene moltiplicato per il volume totale di sospensione cellulare presente nella falcon (10 ml), in modo da ottenere il quantitativo totale di cellule. La piastra è costituita da 96 pozzetti, ma se ne considerano 100 per svolgere i calcoli in eccesso, dato che i sistemi di trasferimento di liquidi comportano una perdita di volume. Vengono seminate 100'000 cellule per pozzetto, dunque sono necessari 10'000'000 di cellule per riempire l'intera piastra. Il volume di ogni pozzetto è pari a 100 μl , dunque sono necessari 10 ml di soluzione per completare la piastra.

La sospensione cellulare viene sottoposta a centrifugazione a 1260 rpm per 5 minuti; al termine del processo si scarta il surnatante e si risospesce il pellet con nuovo terreno, in un volume che dipende dall'esito della conta cellulare. A titolo esemplificativo si riporta un calcolo per la semina cellulare: se dalla conta cellulare risultano 1,4 milioni di cellule/ml, in totale nella falcon sono contenuti 14 milioni di cellule. Il pellet andrà risospeso in 14 ml di terreno, in questo modo

in ogni millilitro sarà presente 1 milione di cellule. Per la semina si useranno 10 ml di sospensione, mentre i restanti 4 ml potranno essere trasferiti nuovamente nella fiasca.

3.3.3 Interazione del recettore mu con la proteina G

La differente localizzazione della proteina G rispetto alla β -arrestina rende possibile usare un protocollo diverso per eseguire il saggio BRET. La proteina G, così come il recettore mu, è una proteina principalmente di membrana, quindi per minimizzare le interferenze con l'interazione della β -arrestina vengono estratte e concentrate le membrane prima di eseguire gli esperimenti.

Estrazione delle membrane cellulari

Le cellule SH-SY5Y mu-RLuc/ $G\beta_1$ -RGFP vengono coltivate fino al raggiungimento del 90% della confluenza. L'estrazione delle membrane viene condotta in ghiaccio, al fine di evitare la degradazione delle proteine; non essendo richiesta la sterilità, si lavora all'esterno della cappa biologica. Si scarta il terreno di coltura dalle fiasche e si lavano le cellule con 5 ml di PBS. In seguito si favorisce il distacco delle cellule mediante l'aggiunta di 5 ml di PBS-EDTA, il cui ruolo è quello di sequestrare gli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} , necessari per l'adesione cellulare: si lascia agire il PBS-EDTA per cinque minuti e si scuotono le fiasche per promuovere il distacco. Si aspira la sospensione cellulare e con essa si lava la fiasca, per raccogliere il maggior numero di cellule. Si ripete questo passaggio e si raccoglie la sospensione cellulare in una falcon da 50 ml. Le cellule vengono centrifugate a 2260 rpm per 5 minuti. Al termine del processo si rimuove il surnatante e si risospende il pellet in 1 ml di PBS, per poi conservare la falcon ad una temperatura di $-80^{\circ}C$.

Dopo 20 minuti si può procedere con la centrifugazione differenziale, che ha la funzione di separare i nuclei e gli altri organelli citoplasmatici, mantenendo solo le membrane citoplasmatiche: si scongela il pellet in 4 ml di HB-7S e si lisano le cellule con l'omogenizzatore Ultra-Turrax (Janke & Kunkel). Al fine di evitare la formazione di schiuma, il mixer viene azionato in modo alternato per circa 30 secondi. La sospensione ottenuta viene trasferita in un tubo da centrifuga con

fondo a U e centrifugata a 1000 g per 10 minuti (4°C), in modo da favorire la precipitazione della frazione nucleare. Al termine della centrifugazione si prelevano $\frac{3}{4}$ di surnatante, avendo cura di non aspirare parte del pellet, e si trasferiscono in un tubo da centrifuga contrassegnato con la scritta S1. Il pellet viene risospeso in 3 ml di HB-7S. L'operazione viene ripetuta per altre due volte, ottenendo S2 e S3. Si uniscono le soluzioni S1, S2, S3 e si procede con un'ulteriore centrifugazione a 24000 g per 20 minuti. Si scarta il surnatante, si risospende il pellet in 7 ml di HB-7 (tampone privo di saccarosio) e si effettua un'ultima centrifugazione a 24000 g per 20 minuti. Si rimuove il surnatante e si risospende il pellet in 400 μ l di acqua milliQ. Si trasferiscono le membrane in una eppendorf e si conservano a -80°C.

Quantificazione delle proteine

Determinare la concentrazione delle proteine contenute nelle membrane precedentemente estratte permette di lavorare in condizioni riproducibili. La concentrazione proteica è stata determinata utilizzando il kit QPRO-BCA: il test colorimetrico dell'acido bicinconinico (BCA) si basa sulla formazione di un complesso BCA-rame. La reazione prevede due fasi: inizialmente lo ione Cu^{2+} viene ridotto a Cu^+ ad opera delle proteine presenti nel campione, in ambiente alcalino. La quantità di ione Cu^{2+} che si riduce è dunque proporzionale alla quantità di proteine presenti in soluzione. In seguito, due molecole di BCA si complessano con lo ione Cu^+ , provocando una variazione di colore dal verde al viola⁸⁷ (figura 20).

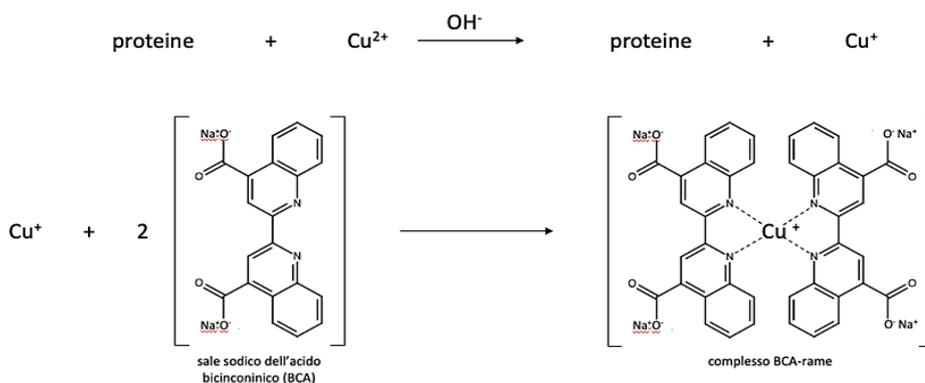


Figura 20. Formazione del complesso BCA-rame.

Si costruisce la retta di calibrazione a 8 punti, utilizzando BSA come standard: si prepara una soluzione madre di BSA in acqua milliQ (2000 µg/ml) e da questa si ottengono 8 diluizioni a concentrazione di BSA decrescente (1000 µg/ml, 500 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml). Il bianco è costituito da sola acqua milliQ. L'assorbanza dei campioni a concentrazione incognita viene misurata a tre diverse diluizioni, A, B e C, rispettivamente 1:4, 1:16 e 1:64. Le soluzioni per la retta di taratura, il bianco ed i campioni vengono disposti in una piastra trasparente a 96 pozzetti (25 µl in ogni pozzetto). Si prepara il WR miscelando il reagente A ed il reagente B in rapporto 50:1 (10 ml di reagente A e 200 µl di reagente B). Si aggiungono 200 µl di WR in ogni pozzetto e si ripone la piastra in incubatore per 30 minuti, tempo sufficiente per garantire il completamento della reazione. Successivamente si esegue la lettura dell'assorbanza utilizzando il luminometro Victor Nivo (PerkinElmer). Si costruisce un grafico in cui in ascissa vengono riportate le concentrazioni note di BSA e in ordinata l'assorbanza (*figura 21*). I punti vengono interpolati in una retta di regressione lineare. La concentrazione totale delle proteine presenti nelle membrane viene determinata con l'equazione della retta di taratura.

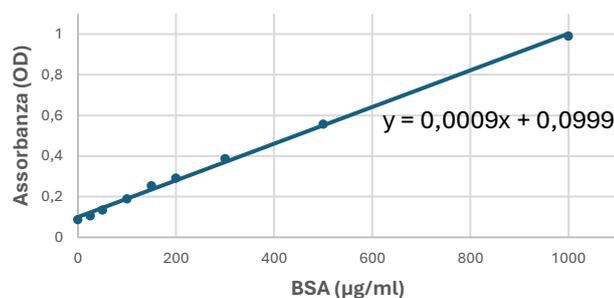


Figura 21. Esempio di retta di taratura. In ascissa è riportata la concentrazione di BSA, in ordinata l'assorbanza. La concentrazione proteica si ottiene per estrapolazione dall'equazione della retta di calibrazione, noti i valori di assorbanza dei campioni incogniti.

3.3.4 Allestimento delle sostanze da analizzare

Si prepara la soluzione tampone disciogliendo 1 mg di BSA in 10 ml di PBS non sterile. Si allestisce la piastra farmaci (trasparente) come segue: la riga A deve contenere i ligandi alla concentrazione di $5 \cdot 10^{-5}$ M. Le soluzioni madre dei

composti hanno una concentrazione di 1 mM oppure di 5 mM: nel primo caso sarà necessario diluire 10 μl di ligando in 190 μl di tampone; nel secondo caso si diluiranno 2 μl di ligando in 198 μl di soluzione tampone.

Si caricano le righe successive della piastra con 180 μl di tampone e si procede ad effettuare le diluizioni seriali (1:10): si trasferiscono 20 μl di soluzione dalla riga A alla successiva, senza entrare in contatto con il contenuto dei pozzetti. Con l'ausilio di nuovi puntali si miscela la soluzione dei pozzetti della riga B e si trasferiscono 20 μl nella riga successiva. Il processo viene iterato fino alla penultima riga: l'ultima rappresenta il bianco, di conseguenza non contiene le sostanze da analizzare, ma solamente il tampone (*figura 22*).

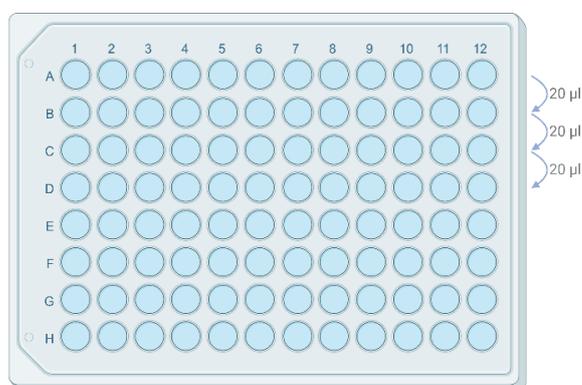


Figura 22. Schema di piastra a 96 pozzetti per il caricamento dei composti da analizzare.

Protocollo sperimentale

Per lo studio dell'interazione del recettore mu con la β -arrestina 2 le cellule vengono seminate 24 ore prima dell'esperimento in piastre bianche da 96 pozzetti rivestite di poli-D-lisina (PDL). Il giorno dell'esperimento si rimuove il terreno con l'ausilio di un pettine aspirante e si lava con PBS arricchito di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} . Si inseriscono in ogni pozzetto 80 μl di una soluzione costituita da PBS con Ca^{2+} e Mg^{2+} e coelenterazina (Prolume Purple Coelenterazine) alla concentrazione di 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Gli ioni hanno la funzione di evitare il distacco delle cellule adese alla parete di ciascun pozzetto. Si trasferiscono 20 μl di ligandi dalla piastra farmaci ai pozzetti della piastra cellule, lavorando in doppio.

Per lo studio dell'interazione del recettore mu con la proteina G le membrane sono state sospese in PBS in presenza di coelenterazina; sono stati utilizzati 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ di membrane in ciascun pozzetto. In una piastra cellule (bianca, fondo opaco) si caricano 80 μl per pozzetto di questa soluzione. In seguito, si trasferiscono 20 μl di ligandi dalla piastra farmaci ai pozzetti della piastra cellule, lavorando in doppio.

La lettura viene eseguita al luminometro Victor Nivo per dieci minuti. La *figura 23* schematizza la risposta cellulare risultante dall'accoppiamento del ligando con il recettore. La quantità di energia trasferita da RLuc a RGFP aumenta al diminuire della distanza recettore/trasduttore.

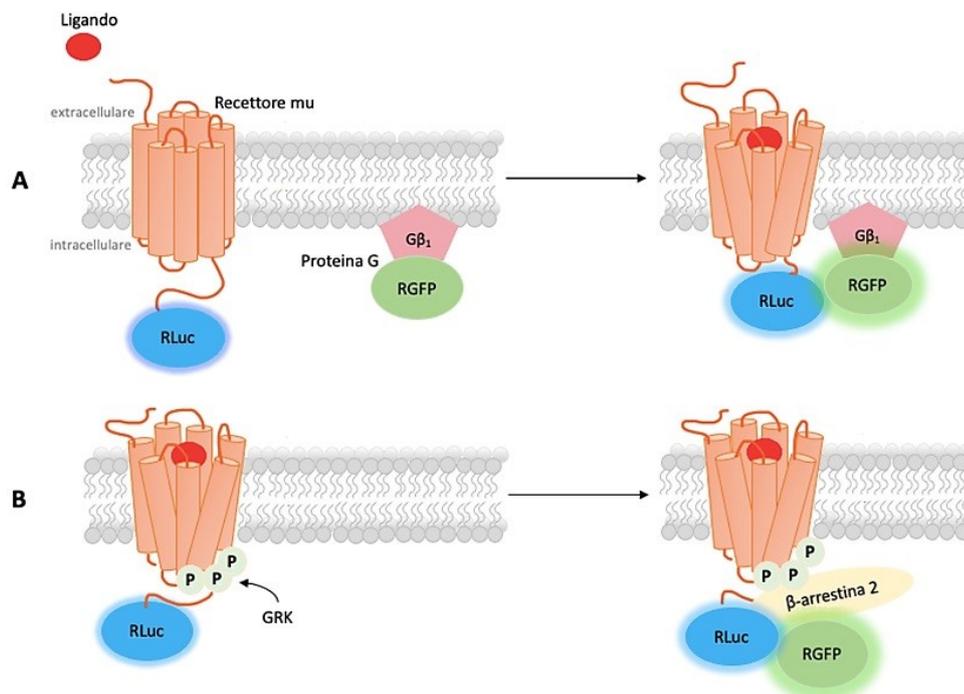


Figura 23. Schema dell'interazione del recettore mu con la proteina G e la β -arrestina 2. (A) quando i costrutti mu-RLuc e $G\beta_1$ -RGFP sono sufficientemente vicini si verifica trasferimento di energia per risonanza di bioluminescenza da RLuc a RGFP. (B) lo stesso si verifica nel caso di interazione del recettore con il costrutto β -arrestina 2-RGFP dopo fosforilazione del recettore mediata da GRK.

3.3.5 Lettura del segnale BRET

Victor Nivo è un lettore di micropiastre multimodale che può essere utilizzato come spettrofotometro, spettrofluorimetro e rilevatore di luminescenza. Negli esperimenti condotti in questa tesi è stato utilizzato come luminometro. L'emissione di luce rilevata dallo strumento (CPS: conteggi per secondo) è stata registrata con due filtri, il primo (emissione del donatore) ad una lunghezza

d'onda di 405(10) nm, il secondo (emissione dell'accettore) ad una lunghezza d'onda di 510(30) nm. I valori BRET sono stati calcolati come segue:

$$BRET_{ratio} = \left(\frac{RGFP_{CPS}}{RLuc_{CPS}} \right)_{ligando} - \left(\frac{RGFP_{CPS}}{RLuc_{CPS}} \right)_{veicolo}$$

3.4 Analisi dei dati

Per analizzare i dati è stato utilizzato il software Graph Pad 8.0 (GraphPad Software inc., San Diego, USA). I dati sono indicati come media \pm errore standard (SEM) di almeno otto esperimenti eseguiti in duplicato. La potenza degli agonisti è espressa come pEC₅₀, definita come il logaritmo negativo in base 10 della concentrazione molare di agonista che produce il 50% dell'effetto massimale. Per i valori di potenza sono stati riportati i limiti di confidenza del 95% (CL95%). L'efficacia è espressa come E/Emax (di seguito riportato per semplicità come Emax), che rappresenta l'effetto massimo che l'agonista produce in determinate condizioni sperimentali rispetto a quanto generato dal composto di riferimento (EM-2).

Per valutare gli effetti farmacologici dei ligandi sull'interazione tra il recettore e il trasduttore (proteina G o β -arrestina 2), sono state generate curve concentrazione-risposta dopo circa dieci minuti di lettura, ponendo nei grafici nell'asse delle ascisse il logaritmo della concentrazione del ligando, nell'asse delle ordinate l'effetto farmacologico, espresso come rapporto dei valori BRET tra il ligando e l'effetto massimo dell'EM-2, l'agonista standard. I dati sperimentali sono stati elaborati secondo il modello di regressione non lineare a quattro parametri:

$$Effect = baseline + \frac{(E_{max} - baseline)}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log X)^{HillSlope}}}$$

dove X è la concentrazione dell'agonista e HillSlope è il valore della pendenza della curva.

Gli effetti massimi normalizzati sono espressi assieme all'errore standard. Inoltre, è stato calcolato il CL95% per l'Emax di ogni agonista, al fine di stimare la

significatività statistica di un'eventuale differenza tra gli effetti massimi (normalizzati) dello standard e quelli dell'agonista. Nel caso in cui l'Emax di EM-2 (1.00) non sia incluso nel limite di confidenza dell'Emax di un certo composto, allora consideriamo l'Emax del composto come significativamente differente da quello dello standard.

3.5 Bias factor e bias plot

La capacità che i ligandi hanno di indurre l'interazione del recettore con la proteina G e con la β -arrestina 2 è stata determinata attraverso la rappresentazione del bias plot ed il calcolo del bias factor. Il bias plot è un grafico che confronta l'attivazione della proteina G ed il reclutamento della β -arrestina 2 per ciascun ligando rispetto allo standard. Il bias factor è un valore numerico espresso in scala logaritmica che quantifica la preferenza del ligando per attivare la via di segnalazione della proteina G o la via della β -arrestina 2. Il bias factor è stato calcolato applicando una versione semplificata del modello operativo dell'agonismo farmacologico⁷⁰. Le curve concentrazione-risposta di ogni ligando, normalizzate rispetto all'EM-2 ed espresse come media \pm SEM, si adattano alla seguente formula:

$$Response = \frac{[A]^n \tau^n E_m}{[A]^n \tau^n + ([A] + K_A)^n}$$

Laddove E_m è la massima risposta possibile del sistema, K_A è la costante di dissociazione all'equilibrio del complesso agonista-recettore (teoricamente in assenza di trasduttore), mentre τ definisce e riassume la propensione di un agonista di produrre una risposta (efficacia) e la capacità del sistema di elaborare la stimolazione recettoriale in risposta. Nello specifico τ è il rapporto $[Rt]/KE$, con Rt densità recettoriale e KE funzione trasduzionale che esprime appunto la capacità del sistema di convertire l'accoppiamento agonista-recettore in risposta e in efficacia dell'agonista. Il vantaggio del modello operativo è quello di offrire una visione unificata di occupazione recettoriale, stimolazione e generazione di risposta cellulare.

Per ogni composto è stato calcolato il rapporto τ/K_A , in modo da “riassumere” in un singolo parametro la globale propensione a mediare un effetto agonista da parte di un dato composto, e i valori $\Delta\log(\tau/K_A)$ sono stati rapportati allo standard, così da “normalizzare” i valori ed escludere il contributo specifico del singolo saggio sui valori ottenuti. Infine, i valori $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ sono stati derivati nei confronti di uno specifico trasduttore.

La formula di cui sopra restituisce una misura quantitativa della preferenza (o bias) del ligando per una via di segnalazione rispetto ad un'altra.

Come standard di riferimento è stato utilizzato il peptide endomorfina-2 in quanto è la struttura chimica di riferimento. I valori di bias factor sono stati calcolati con il limite di confidenza del 95% (CL95%).

3.6 Saggio dell'antagonismo

Il saggio dell'antagonismo permette di comprendere se i composti inattivi sulla β -arrestina 2 ($E_{max} < 0,10$) si comportano da antagonisti. I composti 510, 514 e 515 sono stati testati in parallelo con il naloxone (Nx), utilizzato come antagonista standard.

Protocollo sperimentale

Le cellule vengono seminate 24 ore prima dell'esperimento in piastre bianche da 96 pozzetti rivestite di poli-D-lisina (PDL), come descritto per gli esperimenti BRET. Il giorno dell'esperimento si rimuove il terreno con l'ausilio di un pettine aspirante e si lava con PBS arricchito di ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} (tampone). Si inseriscono in ogni pozzetto 40 μ l di tampone e 20 μ l di antagonista. Nelle prime due colonne non si pone un antagonista, ma 20 μ l di tampone. La piastra viene incubata a temperatura ambiente per 15-20 minuti. Si aggiungono 20 μ l di agonista (EM-2, preparata con la diluizione seriale descritta per il saggio BRET) e si incuba per 5 minuti. Infine, 20 μ l di PBS contenente coelenterazina alla concentrazione finale di 2 μ l sono introdotti in ogni pozzetto e viene eseguita la lettura con il luminometro Victor Nivo nelle stesse condizioni del saggio BRET.

Analisi dei dati

Le curve concentrazione-risposta sono state ottenute con il software Graph Pad Prism 8.0, come descritto nell'analisi dei dati degli esperimenti BRET. La potenza dell'antagonista è stata derivata dalla seguente formula:

$$pA_2 = \log(CR - 1) - \log([Antagonista])$$

CR rappresenta il rapporto tra l'EC₅₀ dell'antagonista e l'EC₅₀ dell'agonista (EM-2). Assumendo un antagonismo di tipo competitivo, i valori di EC₅₀ utilizzati nel computo sono stati ottenuti vincolando la pendenza della curva (hillslope) a uno. pA₂ è una misura della capacità dell'antagonista di inibire l'azione dell'agonista: più è grande questo valore, maggiore è la potenza dell'antagonista nel bloccare l'effetto dell'agonista.

Capitolo IV

Risultati

4.1 Saggio BRET

I parametri farmacologici dei ligandi studiati in questa tesi sono stati stimati tramite il saggio BRET, che ha permesso di confrontare la diversa capacità dei composti di stimolare l'interazione del recettore mu con la proteina G e con la β -arrestina 2. L'interazione tra il recettore e la proteina G è stata valutata utilizzando membrane cellulari estratte da linee cellulari SH-SY5Y di neuroblastoma umano, trasdotte stabilmente con le proteine di fusione mu-RLuc e G β ₁-RGFP. L'interazione con la β -arrestina 2 è stata esaminata utilizzando cellule SH-SY5Y trasdotte stabilmente con le fusoproteine mu-RLuc e β -arrestina 2-RGFP. L'attività dei composti è stata confrontata con quella dell'endomorfina-2 (EM-2), l'agonista oppioide naturale che funge da standard.

EM-2 è stata in grado di stimolare l'accoppiamento recettore mu-proteina G e β -arrestina 2 in modo concentrazione-dipendente e saturabile; dalle curve concentrazione-risposta (*figura 24/A*) sono stati derivati simili valori di potenza (pEC₅₀ rispettivamente 7.60 e 7.29, *tabella 3*). La versione ciclica di EM-2 (composto 170, *figura 24/B*) si comporta nei nostri saggi in modo del tutto simile ad EM-2, seppur con una potenza lievemente superiore (3 volte e 2 volte, rispettivamente su proteina G e β -arrestina 2). Il composto 336, modificato con Dmt¹ (*figura 24/C*) esibisce valori di potenza lievemente (~ 2 volte) superiori rispetto all'analogo con Tyr¹. Sia per quanto riguarda il composto 170, che 336, la loro efficacia per la proteina G risulta simile (0.94) rispetto a EM-2. Tuttavia,

l'efficacia esibita nel reclutare l'arrestina è risultata inferiore (0.57 e 0.63) per entrambi i peptidi.

La sostituzione di Phe² con (R) β 2-1Nal (composto 511, *figura 24/D*) determina un leggero incremento (~ 2 volte) di potenza per la proteina G rispetto a EM-2, mentre la potenza nei confronti del reclutamento dell'arrestina decresce di quasi 10 volte. La sostituzione di Tyr¹ con Dmt (composto 512, *figura 24/E*) aumenta la potenza di 3-4 volte nel mediare il reclutamento di proteina G e β -arrestina 2 rispetto allo standard EM-2. È interessante notare come entrambi i peptidi siano agonisti pieni per la proteina G e parziali per la β -arrestina 2 (0.63 e 0.75, rispettivamente per 511 e 512).

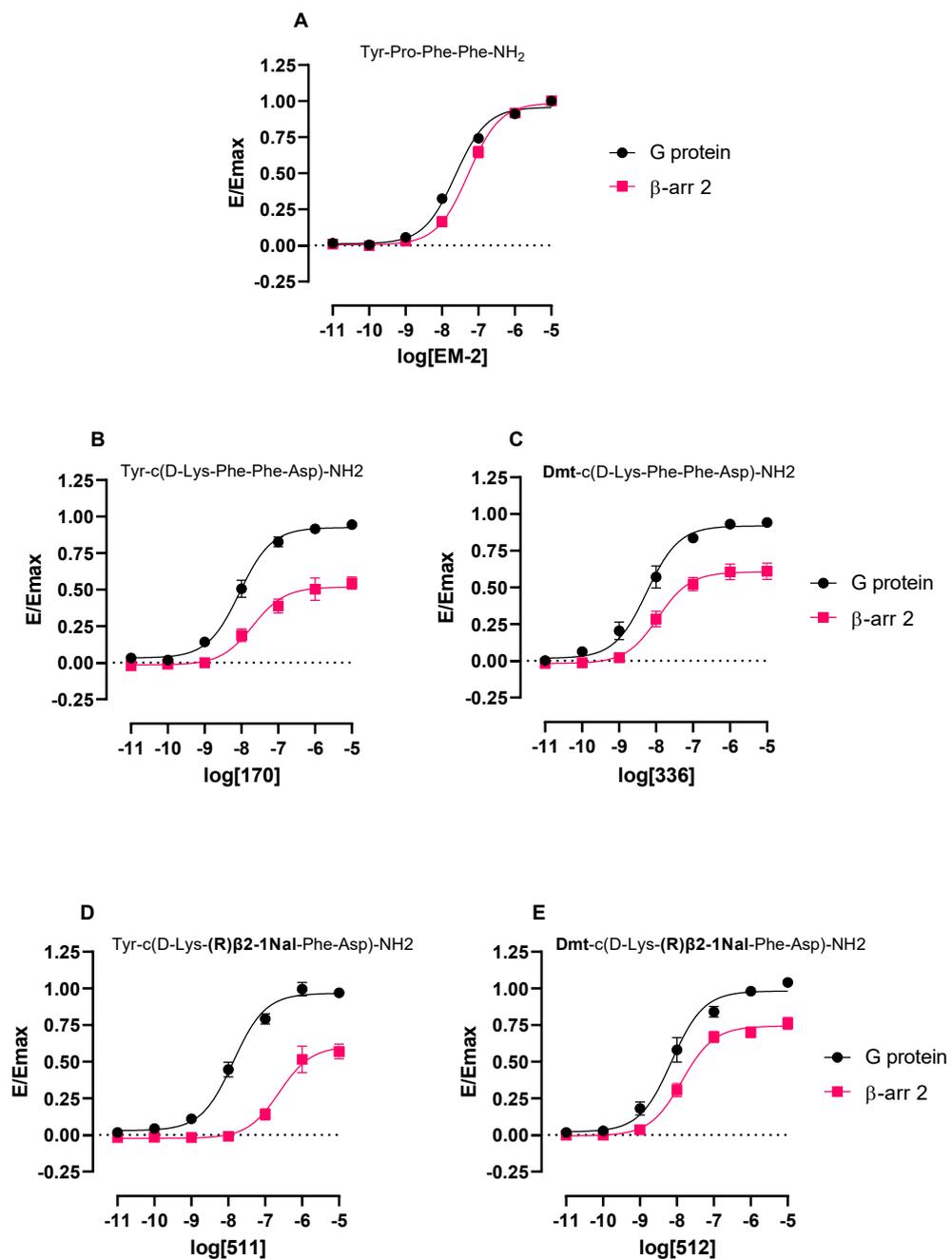
La sostituzione di Phe³ con (R) β 2-1Nal (composto 509, *figura 24/F*) non comporta modifiche nella propensione di mediare l'interazione recettore mu-proteina G, né in termini di potenza né in termini di efficacia rispetto ad EM-2. È importante notare come l'attività del composto 509 nel mediare il reclutamento di β -arrestina 2 sia invece ridotta sia in termini di potenza (~ 4 volte) che di efficacia (0.57). La corrispettiva sostituzione di Tyr¹ con Dmt (composto 513, *figura 24/G*) al composto 509 ha prodotto dei valori di potenza elevati nel mediare l'interazione con la proteina G (~ 7 volte più elevati di EM-2) e simili E_{max}, ed un incremento di circa 5 volte di potenza ed un'attività da agonista a relativamente bassa efficacia (0.75) nel mediare il reclutamento di β -arrestina 2.

La sostituzione di Phe² con (R) β 3-1Nal (composto 508, *figura 24/H*) provoca una riduzione di potenza per la proteina G di 40 volte rispetto allo standard e una diminuzione dell'efficacia (è da notare come la stima puntuale di E_{max} non è stata effettuata a causa della bassa potenza del composto). Nei confronti dell'interazione con l'arrestina il composto è risultato praticamente inattivo. La sostituzione di Tyr¹ con Dmt (composto 514, *figura 24/I*) ha generato un agonista parziale leggermente più potente (~ 2 volte) rispetto a EM-2. Il composto 514 risulta completamente inattivo nei confronti del reclutamento dell'arrestina.

Infine, la sostituzione di Phe³ con (R) β 3-1Nal (composto 510, *figura 24/L*) restituisce un agonista parziale (0.81) leggermente meno potente (~ 2 volte) per la proteina G rispetto allo standard EM-2 e completamente inattivo per l'arrestina. La modifica di Tyr¹ con Dmt (composto 515, *figura 24/M*) aumenta la potenza per

la proteina G rispetto a EM-2 (~ 2 volte), con efficacia simile. Anche il composto 515 è inattivo sull'arrestina.

I parametri farmacologici dei peptidi analizzati in questa tesi sono riportati in *tabella 3*.



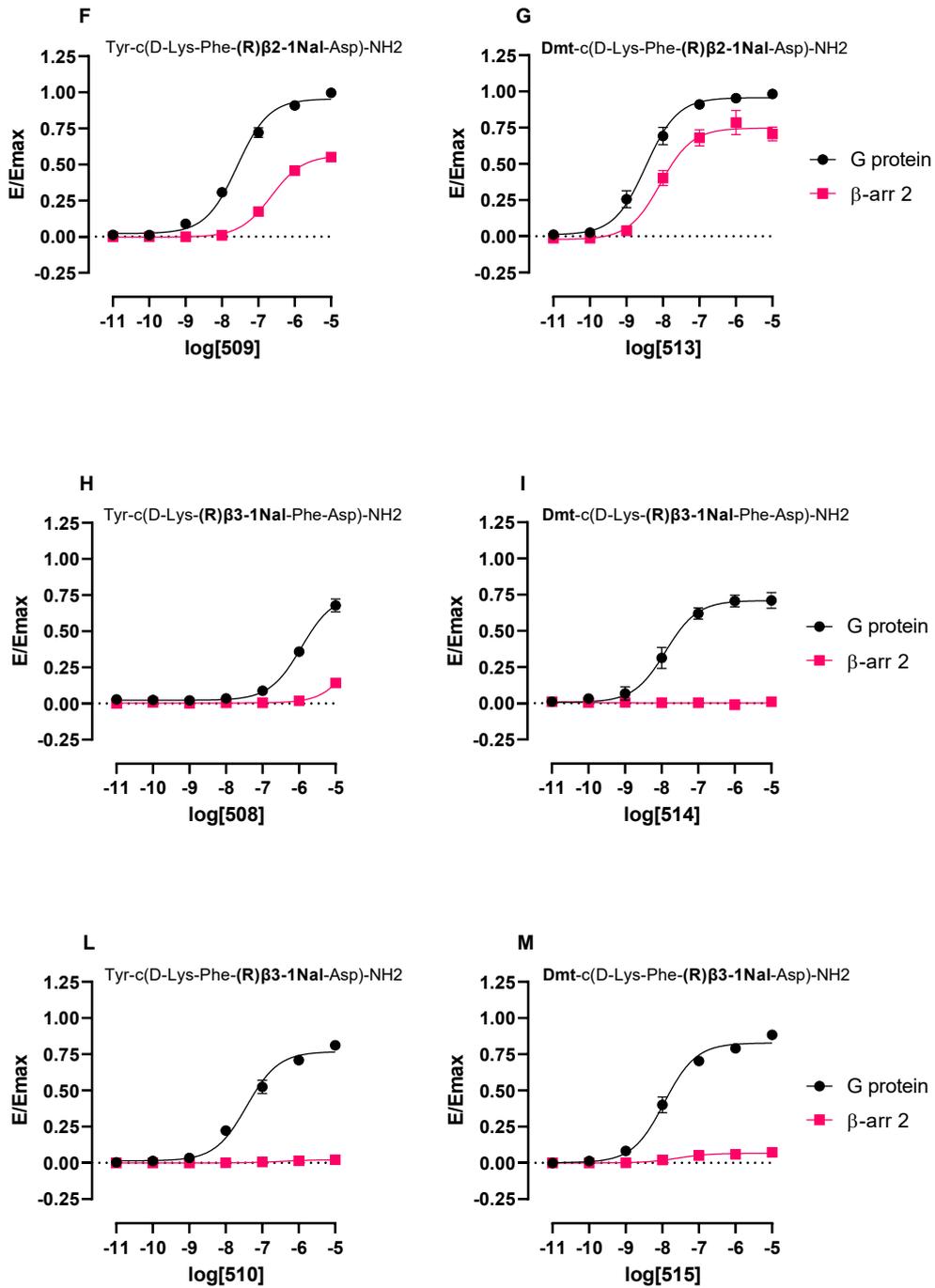


Figura 24. Le curve concentrazione-risposta dei derivati peptidici sviluppate sulla base dei dati ottenuti con il saggio BRET consentono di valutare l'interazione del recettore mu con la proteina G e con la β -arrestina 2. I dati sono espressi come media \pm errore standard (SEM) di almeno 8 esperimenti condotti in duplicato.

Tabella 3. Parametri farmacologici dei ligandi oggetto di questa tesi.

Ligand	G protein		β -Arrestin 2	
	pEC ₅₀ (CL95%)	E _{max} ±SEM (CL95%)	pEC ₅₀ (CL95%)	E _{max} ±SEM (CL95%)
EM-2 Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂	7.60 (7.50-7.69)	1.00	7.29 (7.12-7.46)	1.00
170 Tyr-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH ₂	8.02 (7.80-8.24)	0.94±0.02* (0.90-0.98)	7.52 (7.05-7.99)	0.57±0.06* (0.44-0.70)
336 Dmt-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH ₂	8.23 (7.88-8.57)	0.94±0.02* (0.90-0.97)	7.85 (7.41-8.28)	0.63±0.04* (0.54-0.73)
511 Tyr-c(D-Lys-(R)β ₂ -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	7.81 (7.53-8.08)	1.00±0.02 (0.97-1.04)	6.44 (6.12-6.76)	0.63±0.04* (0.53-0.72)
512 Dmt-c(D-Lys-(R)β ₂ -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	8.13 (7.74-8.51)	1.01±0.02 (0.96-1.07)	7.86 (7.67-8.05)	0.75±0.04* (0.64-0.85)
509 Tyr-c(D-Lys-Phe-(R)β ₂ -1Nal-Asp)-NH ₂	7.56 (7.35-7.77)	1.00±0.01 (0.97-1.02)	6.66 (6.57-6.74)	0.57±0.03* (0.50-0.64)
513 Dmt-c(D-Lys-Phe-(R)β ₂ -1Nal-Asp)-NH ₂	8.45 (8.24-8.66)	0.97±0.02 (0.92-1.01)	7.99 (7.77-8.21)	0.75±0.05* (0.64-0.87)
508 Tyr-c(D-Lys-(R)β ₃ -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	<6		n.d.	Inactive
514 Dmt-c(D-Lys-(R)β ₃ -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	7.90 (7.52-8.29)	0.72±0.04* (0.62-0.82)	n.d.	Inactive
510 Tyr-c(D-Lys-Phe-(R)β ₃ -1Nal-Asp)-NH ₂	7.37 (7.06-7.67)	0.81±0.02* (0.76-0.86)	n.d.	Inactive
515 Dmt-c(D-Lys-Phe-(R)β ₃ -1Nal-Asp)-NH ₂	7.91 (7.64-8.17)	0.86±0.02* (0.80-0.91)	n.d.	Inactive

* $p < 0,05$: CL95% non include l'E_{max} di EM-2, i composti sono considerati agonisti parziali.

4.2 Bias plot e bias factor

Il set di dati di ogni composto è stato elaborato in modo da costruire il bias plot, che ha la funzione di valutare visivamente la preferenza dei peptidi testati di attivare la via di segnalazione della proteina G o della β -arrestina 2. In *figura 25* sono rappresentati i bias plots dei peptidi oggetto di questa tesi, raggruppati in coppie: all'interno di una coppia le sequenze amminoacidiche dei composti differiscono unicamente per l'amminoacido in prima posizione, Tyr o Dmt.

Successivamente è stato calcolato il bias factor di ogni peptide, tramite l'applicazione di un modello matematico (modello operativo). Il bias factor ha permesso di quantificare la differenza di attivazione delle due vie di segnalazione; esso è riportato in *tabella 4* assieme ai suoi limiti fiduciarci al 95%. Sono stati considerati come statisticamente significativi quei bias factors i cui limiti non comprendono lo standard (0). I composti 510, 514 e 515 sono risultati biased per la via di segnalazione della proteina G.

Analizzando i bias plots in *figura 25* e riferendosi anche ai valori di bias factor indicati nella *tabella 4*, si può osservare come la sostituzione dell'amminoacido Tyr in prima posizione con Dmt determini una riduzione del bias nei casi A (composti 170 e 336), B (composti 511 e 512) e C (composti 509 e 513) (la curva del peptide modificato con Dmt si avvicina a quella di EM-2, che non è biased). Questa riduzione del bias è tanto più marcata quanto maggiore è l'efficacia dei composti. Nei casi D (composti 508 e 514) ed E (composti 510 e 515) questo andamento è meno evidente, essendo i peptidi completamente inattivi nel reclutare la β -arrestina 2.

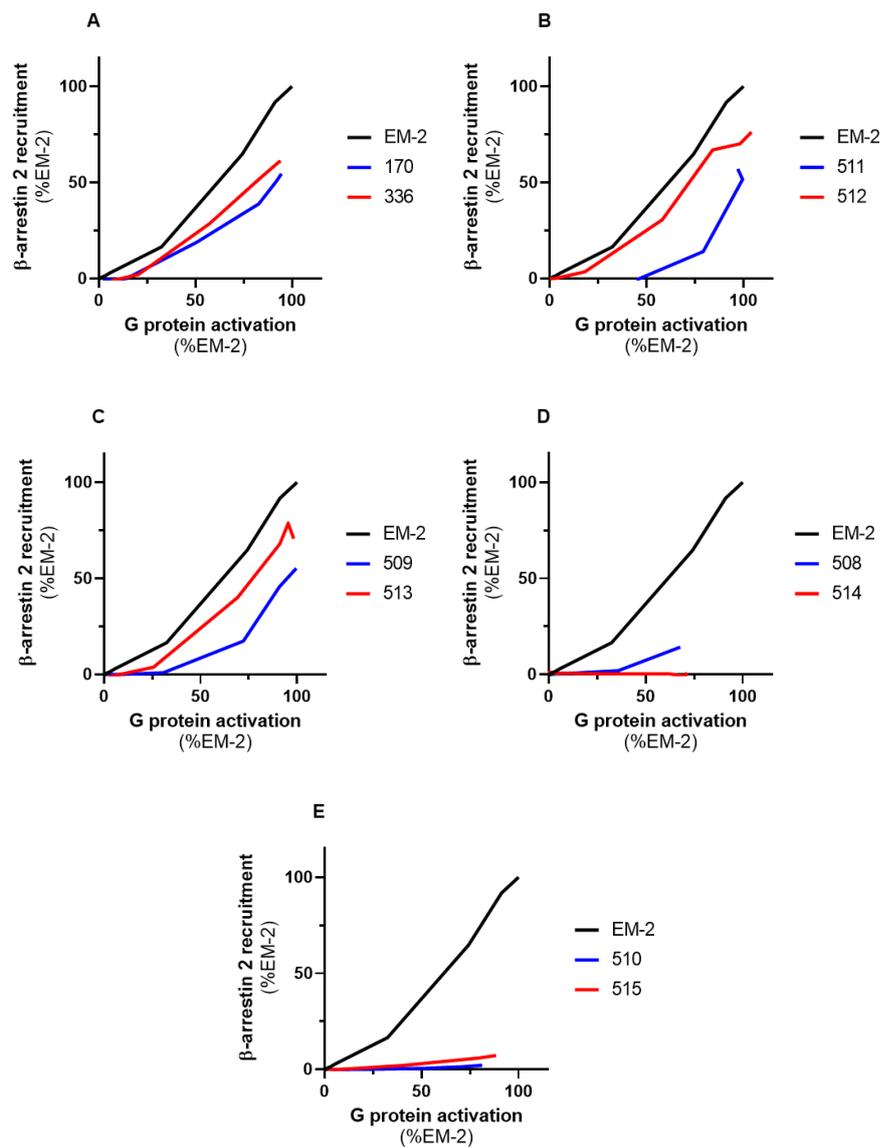


Figura 25. Il bias plot permette di visualizzare l'entità della selettività funzionale di ogni peptide testato, in confronto con lo standard EM-2, che non è biased. Sono rappresentati in uno stesso grafico i due analoghi che differiscono per l'amminoacido in prima posizione (Tyr o Dmt).

Tabella 4. Bias factors di ogni composto.

Ligand	Bias Factor ± CL95%
EM-2	0.00
170	1.27 (0.07-2.47)
336	0.78 (-0.63-2.18)
511	1.73 (0.57-2.89)
512	0.43 (-0.70-1.56)
509	1.51 (0.16-2.85)
513	0.50 (-0.72-1.73)
508	n.d.
514	>2
510	>2
515	>2

Sono considerati biased i composti il cui CL95% non include EM-2 o sono privi di efficacia per la β -arrestina 2 (bias factor >2).

4.3 Saggio dell'antagonismo

I composti inattivi nel mediare il reclutamento della β -arrestina 2 (510, 514, 515) sono stati analizzati mediante il saggio dell'antagonismo sulle cellule esprimenti il recettore mu e la β -arrestina 2. Con questo esperimento siamo in grado di valutare se i composti non solo siano in grado di attivare preferenzialmente la proteina G rispetto all'arrestina, ma anche se possano bloccare l'attivazione di questa via mediata dal recettore mu. Il paradigma sperimentale utilizzato (spostamento della curva concentrazione-risposta dell'agonista in presenza di una concentrazione di antagonista) consente di avere un'indicazione qualitativa sulla sormontabilità (competitività) dell'eventuale effetto antagonista. Maggiore è la potenza dell'antagonista (pA_2), più l'agonista verrà spiazzato dalla tasca di legame del recettore e si osserverà uno spostamento della sua curva concentrazione risposta verso destra. Il peptide 510 è stato testato alla concentrazione fissa di 1 μ M, mentre i peptidi 514 e 515 alla concentrazione di 100 nM. Il naloxone (Nx), l'antagonista di riferimento, è stato testato alla concentrazione di 0.1 μ M.

Nei grafici in *figura 26* ogni composto ha spostato la curva concentrazione-risposta di EM-2 (nera in assenza di antagonista). Da questi spostamenti abbiamo derivato dei valori di potenza, indicati in *tabella 5*, con un ordine di potenza $Nx > 515 > 514 > 510$. Da un punto di vista degli effetti dei composti sugli effetti massimi di EM-2, i composti Nx, 514 e 510 non alterano i plateau delle curve. Il composto 515 produce un lieve decremento degli Emax, possibilmente in linea con l'attività residua da agonista parziale su questa via (*figura 24/M e 26/D*). I valori di pA_2 misurati tramite il saggio sono riportati in *tabella 5*.

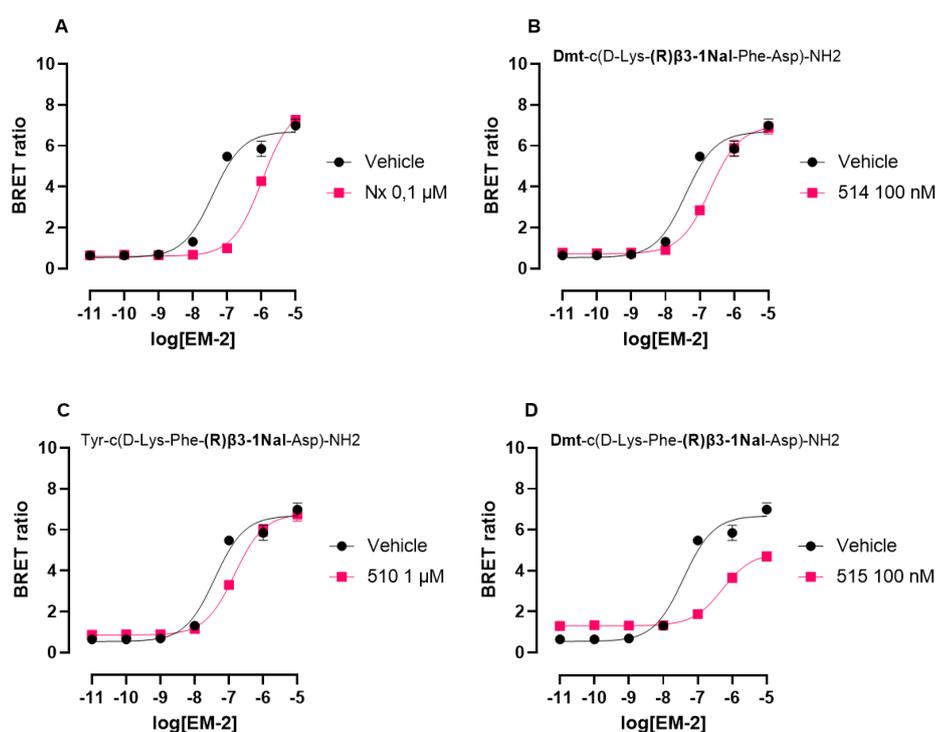


Figura 26. Il naloxone e i peptidi 514, 510, 515 antagonizzano l'effetto dell'endomorfina-2. I dati sono espressi come media \pm errore standard (SEM) di 3-4 esperimenti.

Tabella 5. Valori di pA_2 relativi al naloxone e ai peptidi testati, con i rispettivi intervalli di confidenza.

Ligand	pA_2 (CL95%)
Nx	8.42 (8.20-8.65)
514	7.62 (7.43-7.81)
510	6.43 (6.30-6.56)
515	8.06 (7.75-8.38)

Capitolo V

Discussione e conclusioni

Questa tesi sperimentale ha avuto come obiettivo la caratterizzazione farmacologica in vitro, tramite l'esecuzione del saggio BRET, di 10 molecole peptidiche di nuova sintesi, derivate dal peptide oppioide endomorfina-2, il peptide naturale che mostra la maggiore selettività per il recettore μ oppioide. Questo recettore costituisce il bersaglio farmacologico dei farmaci analgesici oppioidi, i più utilizzati in clinica per la terapia del dolore da moderato a severo. Tali farmaci portano allo sviluppo di gravi effetti collaterali, tra i quali i principali sono la costipazione, la depressione respiratoria, la sedazione, la tolleranza e la dipendenza. Il recettore μ appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati alle proteine G (GPCR), nello specifico interagisce con una proteina G di tipo inibitorio ($G_{i/o}$). Quando l'agonista si lega al sito di interazione del recettore innesca un cambio conformazionale di quest'ultimo, che provoca la dissociazione della subunità $G\alpha$ dalla subunità dimerica $\beta\gamma$. La subunità $G\alpha$ inibisce l'enzima citoplasmatico adenilato ciclasi e di conseguenza la neurotrasmissione eccitatoria. Il recettore viene poi fosforilato da specifiche chinasi (GRK), le quali promuovono il legame con le β -arrestine, proteine regolatrici che non sono implicate solo nella desensibilizzazione del recettore ma innescano anche una via di segnalazione intracellulare. Studi recenti hanno dimostrato che la via di segnalazione della proteina G sembra essere implicata soprattutto nell'effetto terapeutico dei farmaci oppioidi, cioè l'analgesia, mentre il reclutamento della β -arrestina sembra che sia collegato allo sviluppo degli effetti collaterali. Quando un agonista interagisce con il recettore attivando preferenzialmente una via di segnalazione tra le varie legate a quel recettore, viene definito "selettivamente

funzionale”, o in inglese “biased”. Nel contesto della terapia del dolore, è di chiaro interesse clinico sviluppare dei principi attivi che siano selettivamente funzionali per la proteina G, così da ottenere l’effetto analgesico accompagnato da effetti collaterali meno pronunciati, migliorando così l’efficacia e la tollerabilità. Il saggio BRET consente di studiare la capacità dei ligandi di indurre l’interazione del recettore mu con la proteina G e con la β -arrestina.

I composti oggetto di questa tesi sono stati sintetizzati dal gruppo di Anna Janecka e Justyna Piekielna-Ciesielska dell’Università medica di Łódź.

Nel saggio BRET di interazione recettore mu-proteina G, EM-2 è stato in grado di stimolare l’interazione recettore-effettore in modo concentrazione-dipendente, mostrando valori di potenza moderati in linea con quanto ottenuto in altri lavori sperimentali con lo stesso approccio⁸⁸. I composti ciclici studiati hanno mimato gli effetti di EM-2 nel mediare l’interazione tra il recettore mu e la proteina G e i loro effetti, in termini di ordine di potenza, sono riassumibili come segue (per i valori di potenza ed efficacia di ogni peptide si consulti la *tabella 3*):

513>336>512>170>515>514>511>**EM-2**>509>510>508

In tutti i casi la sostituzione dell’amminoacido Tyr in prima posizione con il derivato non naturale Dmt ha determinato un aumento della potenza, risultato che concorda con quanto riportato in letteratura^{1,2}. Questo aumento di potenza è probabilmente causato dalla presenza di due gruppi metilici in posizione meta rispetto all’ossidrilico fenolico della Tyr, i quali introducono interazioni dipolari deboli con i residui amminoacidici della tasca di legame del recettore.

Per quanto riguarda i valori di efficacia, tutti i derivati hanno mostrato un valore compreso tra 0.72 e 1.01, indicando che le modifiche chimiche apportate non hanno determinato variazioni significative dell’efficacia del ligando sull’interazione tra il recettore mu e la proteina G.

L’interazione del recettore con la β -arrestina 2 ha causato una maggiore variabilità in termini di efficacia, dal momento che alcuni composti sono risultati inattivi e altri agonisti parziali. In particolare, gli analoghi 510, 514 e 515 hanno dimostrato

attività intrinseche inferiori a 0.1 e sono stati testati come antagonisti.

Le discrepanze in termini di attivazione della proteina G e/o della β -arrestina 2 sono state quantificate visivamente tramite bias plot e numericamente con i bias factor. I risultati ottenuti dal calcolo del bias factor mostrano che tutti i composti hanno una certa selettività funzionale per la via di segnalazione della proteina G. I peptidi sono biased per la proteina G con il seguente ordine:

510=514=515>511>509>170>336>513>512>EM-2

Confrontando i bias factors dei peptidi che differiscono soltanto per l'amminoacido in prima posizione (Tyr o Dmt) e studiando i relativi bias plots in *figura 25*, è possibile concludere che la sostituzione di Tyr con Dmt provoca una riduzione del bias, tanto più marcata quanto maggiore è l'efficacia dei composti, perciò l'attivazione della via di segnalazione della proteina G è meno intensa, a fronte di un maggiore spiccato incremento del reclutamento della β -arrestina 2.

È interessante notare che i derivati con bias factor superiore a 2, che sono dunque considerati selettivamente funzionali per la proteina G, presentano la sostituzione di Phe in posizione 2 o 3 con (R) β^3 -1NaI. L'unico altro composto che è stato modificato con tale amminoacido non naturale è il numero 508, per il quale alle concentrazioni testate non è stato possibile calcolare con precisione il bias factor.

Per confermare la natura dell'interazione dei composti inattivi nel mediare l'interazione recettore-arrestina (510, 514, 515), abbiamo valutato i composti per la loro propensione di antagonizzare gli effetti di EM-2 in confronto allo standard Nx. I risultati del saggio dell'antagonismo e il successivo calcolo del valore di pA_2 (*tabella 4*) permettono di stabilire che ogni peptide testato si comporta da antagonista sormontabile per l'endomorfina-2, con il seguente ordine di potenza:

515>514>510

I valori di pA_2 sono in linea con i valori di potenza misurati per i composti nel momento in cui essi interagiscono da agonisti sull'interazione recettore mu-

proteina G (*tabella 3*), di conseguenza tali derivati sono in grado di bloccare la segnalazione della β -arrestina 2 con una potenza simile a quella dell'attivazione della proteina G. Questa informazione aiuta a comprendere in che modo questi peptidi interagiscono con il recettore mu oppioide.

Studi precedenti mostrano i risultati dello stesso saggio BRET (interazione mu-proteina G e mu- β -arrestina 2) per la forma lineare di alcuni dei peptidi oggetto di questa tesi, ossia i composti 336, 511, 512, 508 e 514 (*tabella 5*)⁸⁸. Per quanto riguarda l'interazione tra recettore mu e proteina G, si può osservare che la sostituzione di Tyr¹ con Dmt provoca in tutti i casi un incremento di potenza, che tende ad essere più marcato nei peptidi lineari rispetto a quelli ciclici. La ciclizzazione dei peptidi lineari con Tyr in prima posizione determina un aumento di potenza nel caso dei composti EM-2 e 10, mentre per il composto 12 la ciclizzazione causa un calo della potenza. La ciclizzazione dei peptidi lineari aventi Dmt in prima posizione determina in ogni caso (composti 1, 11 e 13) un calo di potenza. Osservando, invece, l'interazione tra recettore mu e β -arrestina 2, non è riscontrabile un andamento comune che consenta di stabilire una correlazione tra modifica del peptide e variazione della potenza.

Più in generale, sono necessari ulteriori studi per comprendere come la ciclizzazione sia in grado di alterare la modalità di interazione del ligando lineare con il recettore e di propagazione del segnale sul versante intracellulare.

Tabella 5. Confronto dei parametri farmacologici dei peptidi lineari e ciclici.

Compound	G protein		β-arrestin 2		Bias factor	
	pEC ₅₀ (CL _{95%})	E _{max} ±SEM	pEC ₅₀ (CL _{95%})	E _{max} ±SEM		
EM-2	Tyr-Pro-Phe-Phe-NH ₂	7.60 (7.50-7.69)	1.00	7.29 (7.12-7.46)	1.00	0.00
170	Tyr-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH ₂	8.02 (7.80-8.24)	0.94±0.02* (0.90-0.98)	7.52 (7.05-7.99)	0.57±0.06* (0.44-0.70)	1.27 (0.07-2.47)
1	Dmt-Pro-Phe-Phe-NH ₂	8.51 (8.31-8.71)	0.90 ± 0.05	7.93 (7.52-8.33)	0.33 ± 0.02	0.48 (0.34-0.62)
336	Dmt-c(D-Lys-Phe-Phe-Asp)-NH ₂	8.23 (7.88-8.57)	0.94±0.02* (0.90-0.97)	7.85 (7.41-8.28)	0.63±0.04* (0.54-0.73)	0.78 (-0.63-2.18)
10	Tyr-Pro-(R)-β2-1-Nal-Phe-NH ₂	6.98 (6.84-7.11)	0.68 ± 0.04	Inactive		> 2
511	Tyr-c(D-Lys-(R)β ² -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	7.81 (7.53-8.08)	1.00±0.02 (0.97-1.04)	6.44 (6.12-6.76)	0.63±0.04* (0.53-0.72)	1.73 (0.57-2.89)
11	Dmt-Pro-(R)-β2-1-Nal-Phe-NH ₂	8.31 (8.16-8.46)	0.81 ± 0.05	Inactive		> 2
512	Dmt-c(D-Lys-(R)β ² -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	8.13 (7.74-8.51)	1.01±0.02 (0.96-1.07)	7.86 (7.67-8.05)	0.75±0.04* (0.64-0.85)	0.43 (-0.70-1.56)
12	Tyr-Pro-(R)-β3-1-Nal-Phe-NH ₂	7.11 (6.97-7.24)	0.96 ± 0.02	6.84 (6.55-7.13)	0.73 ± 0.09	0.23 (0.06-0.41)
508	Tyr-c(D-Lys-(R)β ³ -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	<6		Inactive		n.d.
13	Dmt-Pro-(R)-β3-1-Nal-Phe-NH ₂	8.44 (8.13-8.75)	0.84 ± 0.03	8.36 (8.15-8.58)	0.37 ± 0.03	0.27 (0.20-0.34)
514	Dmt-c(D-Lys-(R)β ³ -1Nal-Phe-Asp)-NH ₂	7.90 (7.52-8.29)	0.72±0.04* (0.62-0.82)	Inactive		> 2

In letteratura sono riportati risultati contrastanti per quel che concerne il significato biologico della selettività funzionale inerente al recettore mu oppioide. Come descritto nell'introduzione, alcuni studi dimostrano come un agonista biased verso la proteina G costituisca un farmaco più sicuro e meglio tollerato, con ridotti effetti collaterali; ciò ha portato all'approvazione da parte dell'FDA nel 2020 di oliceridina, il primo agonista biased del recettore mu³⁶. Ciò nonostante, studi recenti hanno messo in discussione questo concetto, affermando che il migliorato profilo di tollerabilità di oliceridina derivi non dall'essere un agonista biased, quanto piuttosto un agonista parziale³⁵. A prova di ciò è interessante notare che i composti che mostrano i valori di bias factor più elevati (510, 514, 515) esibiscono anche una ridotta efficacia per la proteina G (E_{max} rispettivamente pari a 0.81, 0.72 e 0.86).

In conclusione, considerata l'importanza terapeutica del recettore mu oppioide, i dati ottenuti in questo progetto di tesi sperimentale possono fornire un valido supporto alla comunità scientifica per comprendere i meccanismi con cui avviene la trasduzione del segnale e per approfondire il concetto farmacologico della "selettività funzionale". I composti caratterizzati possono costituire un utile

strumento per valutare in vivo gli effetti della “selettività funzionale” ed il suo utilizzo per incrementare il profilo di efficacia e sicurezza di agonisti mu oppioidi. Inoltre sarà interessante verificare se e come la ciclizzazione di queste molecole possa variare le proprietà dei composti in modelli preclinici di dolore.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Okada, Y.; Fujita, Y.; Motoyama, T.; Tsuda, Y.; Yokoi, T.; Li, T.; Sasaki, Y.; Ambo, A.; Jinsmaa, Y.; Bryant, S. D. Structural Studies of [2', 6'-Dimethyl-L-Tyrosine1] Endomorphin-2 Analogues: Enhanced Activity and Cis Orientation of the Dmt-Pro Amide Bond. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (9), 1983–1994.
- (2) Wtorek, K.; Artali, R.; Piekielna-Ciesielska, J.; Koszuk, J.; Kluczyk, A.; Gentilucci, L.; Janecka, A. Endomorphin-2 Analogs Containing Modified Tyrosines: Biological and Theoretical Investigation of the Influence on Conformation and Pharmacological Profile. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *179*, 527–536.
- (3) Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E. Trends in GPCR Drug Discovery: New Agents, Targets and Indications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (12), 829–842.
- (4) Insel, P. A.; Sriram, K.; Gorr, M. W.; Wiley, S. Z.; Michkov, A.; Salmerón, C.; Chinn, A. M. GPCRomics: An Approach to Discover GPCR Drug Targets. *Trends Pharmacol. Sci.* **2019**, *40* (6), 378–387.
- (5) Smith, J. S.; Lefkowitz, R. J.; Rajagopal, S. Biased Signalling: From Simple Switches to Allosteric Microprocessors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17* (4), 243–260.
- (6) Tan, L.; Yan, W.; McCorvy, J. D.; Cheng, J. Biased Ligands of G Protein-Coupled Receptors (GPCRs): Structure–Functional Selectivity Relationships (SFSRs) and Therapeutic Potential. *J. Med. Chem.* **2018**, *61* (22), 9841–9878.
- (7) Yang, D.; Zhou, Q.; Labroska, V.; Qin, S.; Darbalaei, S.; Wu, Y.; Yuliantie, E.; Xie, L.; Tao, H.; Cheng, J. G Protein-Coupled Receptors: Structure-and Function-Based Drug Discovery. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6* (1), 7.
- (8) Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Trong, I. L.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *science* **2000**, *289* (5480), 739–745.
- (9) Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H.-J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K. High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human B2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *science* **2007**, *318* (5854), 1258–1265.
- (10) Rasmussen, S. G.; Choi, H.-J.; Rosenbaum, D. M.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Edwards, P. C.; Burghammer, M.; Ratnala, V. R.; Sanishvili, R.; Fischetti, R. F. Crystal Structure of the Human B2 Adrenergic G-Protein-Coupled Receptor. *Nature* **2007**, *450* (7168), 383–387.
- (11) Rasmussen, S. G.; DeVree, B. T.; Zou, Y.; Kruse, A. C.; Chung, K. Y.; Kobilka, T. S.; Thian, F. S.; Chae, P. S.; Pardon, E.; Calinski, D. Crystal

- Structure of the B2 Adrenergic Receptor–Gs Protein Complex. *Nature* **2011**, 477 (7366), 549–555.
- (12) Kang, Y.; Zhou, X. E.; Gao, X.; He, Y.; Liu, W.; Ishchenko, A.; Barty, A.; White, T. A.; Yefanov, O.; Han, G. W. Crystal Structure of Rhodopsin Bound to Arrestin by Femtosecond X-Ray Laser. *Nature* **2015**, 523 (7562), 561–567.
- (13) Safdari, H. A.; Pandey, S.; Shukla, A. K.; Dutta, S. Illuminating GPCR Signaling by Cryo-EM. *Trends Cell Biol.* **2018**, 28 (8), 591–594.
- (14) Majumdar, S.; Chiu, Y.; Pickett, J. E.; Roth, B. L. Illuminating the Understudied GPCR-Ome. *Drug Discov. Today* **2023**, 103848.
- (15) Zhang, H.; Unal, H.; Desnoyer, R.; Han, G. W.; Patel, N.; Katritch, V.; Karnik, S. S.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structural Basis for Ligand Recognition and Functional Selectivity at Angiotensin Receptor*♦. *J. Biol. Chem.* **2015**, 290 (49), 29127–29139.
- (16) Kruse, A. C.; Hu, J.; Pan, A. C.; Arlow, D. H.; Rosenbaum, D. M.; Rosemond, E.; Green, H. F.; Liu, T.; Chae, P. S.; Dror, R. O. Structure and Dynamics of the M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Nature* **2012**, 482 (7386), 552–556.
- (17) Jiang, H.; Galtes, D.; Wang, J.; Rockman, H. A. G Protein-Coupled Receptor Signaling: Transducers and Effectors. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2022**, 323 (3), C731–C748.
- (18) Hurowitz, E. H.; Melnyk, J. M.; Chen, Y.-J.; Kouros-Mehr, H.; Simon, M. I.; Shizuya, H. Genomic Characterization of the Human Heterotrimeric G Protein α , β , and γ Subunit Genes. *DNA Res.* **2000**, 7 (2), 111–120.
- (19) Stein, C. Opioid Receptors. *Annu. Rev. Med.* **2016**, 67, 433–451.
- (20) Syrovatkina, V.; Alegre, K. O.; Dey, R.; Huang, X.-Y. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J. Mol. Biol.* **2016**, 428 (19), 3850–3868.
- (21) Xiao, J.; Zeng, S.; Wang, X.; Babazada, H.; Li, Z.; Liu, R.; Yu, W. Neurokinin 1 and Opioid Receptors: Relationships and Interactions in Nervous System. *Transl. Perioper. Pain Med.* **2016**, 1 (3), 11.
- (22) Berridge, M. J. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2016**, 96 (4), 1261–1296.
- (23) Dhanasekaran, N.; Dermott, J. M. Signaling by the G12 Class of G Proteins. *Cell. Signal.* **1996**, 8 (4), 235–245.
- (24) Clapham, D. E.; Neer, E. J. G Protein By Subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1997**, 37 (1), 167–203.
- (25) Shenoy, S. K.; Lefkowitz, R. J. Seven-Transmembrane Receptor Signaling through β -Arrestin. *Sci. STKE* **2005**.
- (26) Al-Hasani, R.; Bruchas, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *J. Am. Soc. Anesthesiol.* **2011**, 115 (6), 1363–1381.
- (27) Bohn, L. M.; Lefkowitz, R. J.; Gainetdinov, R. R.; Peppel, K.; Caron, M. G.; Lin, F.-T. Enhanced Morphine Analgesia in Mice Lacking β -Arrestin 2. *Science* **1999**, 286 (5449), 2495–2498.

- (28) Raehal, K. M.; Walker, J. K.; Bohn, L. M. Morphine Side Effects in β -Arrestin 2 Knockout Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *314* (3), 1195–1201.
- (29) Kliewer, A.; Schmiedel, F.; Sianati, S.; Bailey, A.; Bateman, J.; Levitt, E.; Williams, J.; Christie, M.; Schulz, S. Phosphorylation-Deficient G-Protein-Biased μ -Opioid Receptors Improve Analgesia and Diminish Tolerance but Worsen Opioid Side Effects. *Nat. Commun.* **2019**, *10* (1), 367.
- (30) Kliewer, A.; Gillis, A.; Hill, R.; Schmiedel, F.; Bailey, C.; Kelly, E.; Henderson, G.; Christie, M. J.; Schulz, S. Morphine-induced Respiratory Depression Is Independent of B-arrestin2 Signalling. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177* (13), 2923–2931.
- (31) Montandon, G.; Ren, J.; Victoria, N. C.; Liu, H.; Wickman, K.; Greer, J. J.; Horner, R. L. G-Protein-Gated Inwardly Rectifying Potassium Channels Modulate Respiratory Depression by Opioids. *Anesthesiology* **2016**, *124* (3), 641–650.
- (32) Levitt, E. S.; Abdala, A. P.; Paton, J. F.; Bissonnette, J. M.; Williams, J. T. μ Opioid Receptor Activation Hyperpolarizes Respiratory-controlling Kölliker–Fuse Neurons and Suppresses Post-inspiratory Drive. *J. Physiol.* **2015**, *593* (19), 4453–4469.
- (33) Galligan, J. J.; Akbarali, H. I. Molecular Physiology of Enteric Opioid Receptors. *Am. J. Gastroenterol. Suppl. Print* **2014**, *2* (1), 17.
- (34) Imam, M. Z.; Kuo, A.; Ghassabian, S.; Smith, M. T. Progress in Understanding Mechanisms of Opioid-Induced Gastrointestinal Adverse Effects and Respiratory Depression. *Neuropharmacology* **2018**, *131*, 238–255.
- (35) Gillis, A.; Gondin, A. B.; Kliewer, A.; Sanchez, J.; Lim, H. D.; Alamein, C.; Manandhar, P.; Santiago, M.; Fritzwanker, S.; Schmiedel, F. Low Intrinsic Efficacy for G Protein Activation Can Explain the Improved Side Effect Profiles of New Opioid Agonists. *Sci. Signal.* **2020**, *13* (625), eaaz3140.
- (36) Markham, A. Oliceridine: First Approval. *Drugs* **2020**, *80*, 1739–1744.
- (37) DeWire, S. M.; Yamashita, D. S.; Rominger, D. H.; Liu, G.; Cowan, C. L.; Graczyk, T. M.; Chen, X.-T.; Pitis, P. M.; Gotchev, D.; Yuan, C. AG Protein-Biased Ligand at the μ -Opioid Receptor Is Potently Analgesic with Reduced Gastrointestinal and Respiratory Dysfunction Compared with Morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *344* (3), 708–717.
- (38) Tan, H. S.; Habib, A. S. Oliceridine: A Novel Drug for the Management of Moderate to Severe Acute Pain—A Review of Current Evidence. *J. Pain Res.* **2021**, 969–979.
- (39) Berenyi, S.; Csutoras, C.; Sipos, A. Recent Developments in the Chemistry of Thebaine and Its Transformation Products as Pharmacological Targets. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16* (25), 3215–3242.
- (40) Benyamin, R.; Trescot, A. M.; Datta, S.; Buenaventura, R. M.; Adlaka, R.; Sehgal, N.; Glaser, S. E.; Vallejo, R. Opioid Complications and Side Effects. *Pain Physician* **2008**, *11* (2S), S105.
- (41) Krishnamurti, C.; Rao, S. C. The Isolation of Morphine by Serturmer. *Indian J. Anaesth.* **2016**, *60* (11), 861–862.

- (42) Simon, E. J.; Hiller, J. M.; Edelman, I. Stereospecific Binding of the Potent Narcotic Analgesic [3H] Etorphine to Rat-Brain Homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1973**, *70* (7), 1947–1949.
- (43) Terenius, L. Stereospecific Interaction between Narcotic Analgesics and a Synaptic Plasma Membrane Fraction of Rat Cerebral Cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh.)* **1973**, *32* (3-4), 317–320.
- (44) Pert, C. B.; Snyder, S. H. Opiate Receptor: Demonstration in Nervous Tissue. *Science* **1973**, *179* (4077), 1011–1014.
- (45) Hughes, J. Isolation of an Endogenous Compound from the Brain with Pharmacological Properties Similar to Morphine. *Brain Res.* **1975**, *88* (2), 295–308.
- (46) Goodman, L. S.; Gilman, A.; Bertin, R.; Brunton, L. L.; Hilal-Dandan, R.; Montanaro, N. *Le Basi Farmacologiche Della Terapia: Il Manuale*; Zanichelli, 2015.
- (47) Keith Jr, D.; Maung, T.; Anton, B.; Evans, C. Isolation of cDNA Clones Homologous to Opioid Receptors. *Regul. Pept.* **1994**, *54* (1), 143–144.
- (48) Mollereau, C.; Parmentier, M.; Mailleux, P.; Butour, J.-L.; Moisand, C.; Chalon, P.; Caput, D.; Vassart, G.; Meunier, J.-C. ORL1, a Novel Member of the Opioid Receptor Family: Cloning, Functional Expression and Localization. *FEBS Lett.* **1994**, *341* (1), 33–38.
- (49) Meunier, J.-C.; Mollereau, C.; Toll, L.; Suaudeau, C.; Moisand, C.; Alvinerie, P.; Butour, J.-L.; Guillemot, J.-C.; Ferrara, P.; Monsarrat, B. Isolation and Structure of the Endogenous Agonist of Opioid Receptor-like ORL1 Receptor. *Nature* **1995**, *377* (6549), 532–535.
- (50) Reinscheid, R. K.; Nothacker, H.-P.; Bourson, A.; Ardati, A.; Henningsen, R. A.; Buzow, J. R.; Grandy, D. K.; Langen, H.; Monsma Jr, F. J.; Civelli, O. Orphanin FQ: A Neuropeptide That Activates an Opioidlike G Protein-Coupled Receptor. *Science* **1995**, *270* (5237), 792–794.
- (51) Kiguchi, N.; Ding, H.; Ko, M.-C. Central N/OFQ-NOP Receptor System in Pain Modulation. *Adv. Pharmacol.* **2016**, *75*, 217–243.
- (52) Gu, Z.-H.; Wang, B.; Kou, Z.-Z.; Bai, Y.; Chen, T.; Dong, Y.-L.; Li, H.; Li, Y.-Q. Endomorphins: Promising Endogenous Opioid Peptides for the Development of Novel Analgesics. *Neurosignals* **2018**, *25* (1), 98–116.
- (53) Blows, W. T. *The Biological Basis of Mental Health*; Routledge, 2021.
- (54) Cox, B. M.; Christie, M. J.; Devi, L.; Toll, L.; Traynor, J. R. Challenges for Opioid Receptor Nomenclature: IUPHAR Review 9. *Br. J. Pharmacol.* **2015**, *172* (2), 317–323.
- (55) Gentilucci, L. SNew Trends in the Development of Opioid Peptide Analogues as Advanced Remedies for Pain Relief. *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, *4* (1), 19–38.
- (56) Zadina, J. E.; MARTIN-SCHILD, S.; Gerall, A. A.; Kastin, A. J.; Hackler, L.; GE, L.; Zhang, X. Endomorphins: Novel Endogenous M-opiate Receptor Agonists in Regions of High M-opiate Receptor Density. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *897* (1), 136–144.

- (57) Fichna, J.; Janecka, A.; Costentin, J.; Do Rego, J.-C. The Endomorphin System and Its Evolving Neurophysiological Role. *Pharmacol. Rev.* **2007**, *59* (1), 88–123.
- (58) Corder, G.; Castro, D. C.; Bruchas, M. R.; Scherrer, G. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. *Annu. Rev. Neurosci.* **2018**, *41*, 453–473.
- (59) Koehl, A.; Hu, H.; Maeda, S.; Zhang, Y.; Qu, Q.; Paggi, J. M.; Latorraca, N. R.; Hilger, D.; Dawson, R.; Matile, H. Structure of the M-Opioid Receptor–Gi Protein Complex. *Nature* **2018**, *558* (7711), 547–552.
- (60) Jamison, R. N.; Mao, J. Opioid Analgesics; Elsevier, 2015; Vol. 90, pp 957–968.
- (61) Fumagalli, G.; Clementi, F. Farmacologia Generale e Molecolare 5 Ed.; Edra, 2018.
- (62) Jensen, T. Opioids in the Brain: Supraspinal Mechanisms in Pain Control. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **1997**, *41* (1), 123–132.
- (63) Vaughan, C.; Ingram, S.; Connor, M.; Christie, M. How Opioids Inhibit GABA-Mediated Neurotransmission. *Nature* **1997**, *390* (6660), 611–614.
- (64) Pattinson, K. T.; Governo, R. J.; MacIntosh, B. J.; Russell, E. C.; Corfield, D. R.; Tracey, I.; Wise, R. G. Opioids Depress Cortical Centers Responsible for the Volitional Control of Respiration. *J. Neurosci.* **2009**, *29* (25), 8177–8186.
- (65) Shaiova, L. The Management of Opioid-Related Sedation. *Curr. Pain Headache Rep.* **2005**, *9*, 239–242.
- (66) Harkouk, H.; Pares, F.; Daoudi, K.; Fletcher, D. Farmacologia Degli Opioidi. *EMC-Anest.-Rianim.* **2018**, *23* (2), 1–22.
- (67) Xi, Z.-X.; Stein, E. A. GABAergic Mechanisms of Opiate Reinforcement. *Alcohol Alcohol* **2002**, *37* (5), 485–494.
- (68) Vallejo, R.; de Leon-Casasola, O.; Benyamin, R. Opioid Therapy and Immunosuppression: A Review. *Am. J. Ther.* **2004**, *11* (5), 354–365.
- (69) Waldhoer, M.; Bartlett, S. E.; Whistler, J. L. Opioid Receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73* (1), 953–990.
- (70) Amoroso, R.; Barlocco, D.; Caliendo, G.; Ritieni, A.; Novellino, E.; Santagada, V.; Diana, P.; Di Santo, R.; Gatto, B.; Grasso, S. Foye's Principi Di Chimica Farmaceutica. **2014**.
- (71) Volkow, N. D.; Jones, E. B.; Einstein, E. B.; Wargo, E. M. Prevention and Treatment of Opioid Misuse and Addiction: A Review. *JAMA Psychiatry* **2019**, *76* (2), 208–216.
- (72) Volkow, N. D.; Blanco, C. The Changing Opioid Crisis: Development, Challenges and Opportunities. *Mol. Psychiatry* **2021**, *26* (1), 218–233.
- (73) Bohn, L. M.; Gainetdinov, R. R.; Lin, F.-T.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M. G. μ -Opioid Receptor Desensitization by β -Arrestin-2 Determines Morphine Tolerance but Not Dependence. *Nature* **2000**, *408* (6813), 720–723.
- (74) Latremoliere, A.; Woolf, C. J. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *J. Pain* **2009**, *10* (9), 895–926.

- (75) Raouf, R.; Quick, K.; Wood, J. N. Pain as a Channelopathy. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120* (11), 3745–3752.
- (76) Burgess, G.; Williams, D. The Discovery and Development of Analgesics: New Mechanisms, New Modalities. *J. Clin. Invest.* **2010**, *120* (11), 3753–3759.
- (77) Woolf, C. J. What Is This Thing Called Pain? *J. Clin. Invest.* **2010**, *120* (11), 3742–3744.
- (78) Lee, G. I.; Neumeister, M. W. Pain: Pathways and Physiology. *Clin. Plast. Surg.* **2020**, *47* (2), 173–180.
- (79) Holden, J. E.; Jeong, Y.; Forrest, J. M. The Endogenous Opioid System and Clinical Pain Management. *AACN Adv. Crit. Care* **2005**, *16* (3), 291–301.
- (80) Remesic, M.; Sun Lee, Y.; J Hrubby, V. Cyclic Opioid Peptides. *Curr. Med. Chem.* **2016**, *23* (13), 1288–1303.
- (81) Piekielna, J.; Perlikowska, R.; Gach, K.; Janecka, A. Cyclization in Opioid Peptides. *Curr. Drug Targets* **2013**, *14* (7), 798–816.
- (82) Wiffen, P. J.; Wee, B.; Derry, S.; Bell, R. F.; Moore, R. A. Opioids for Cancer Pain-an Overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2017**, No. 7.
- (83) Bacart, J.; Corbel, C.; Jockers, R.; Bach, S.; Couturier, C. The BRET Technology and Its Application to Screening Assays. *Biotechnol. J. Healthc. Nutr. Technol.* **2008**, *3* (3), 311–324.
- (84) Molinari, P.; Casella, I.; Costa, T. Functional Complementation of High-Efficiency Resonance Energy Transfer: A New Tool for the Study of Protein Binding Interactions in Living Cells. *Biochem. J.* **2008**, *409* (1), 251–261.
- (85) Molinari, P.; Vezi, V.; Sbraccia, M.; Grò, C.; Riitano, D.; Ambrosio, C.; Casella, I.; Costa, T. Morphine-like Opiates Selectively Antagonize Receptor-Arrestin Interactions. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (17), 12522–12535.
- (86) Casella, I.; Ambrosio, C.; Grò, M. C.; Molinari, P.; Costa, T. Divergent Agonist Selectivity in Activating B1-and B2-Adrenoceptors for G-Protein and Arrestin Coupling. *Biochem. J.* **2011**, *438* (1), 191–202.
- (87) Walker, J. M. The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation. *Protein Protoc. Handb.* **2009**, 11–15.
- (88) Piekielna-Ciesielska, J.; Malfacini, D.; Djeujo, F. M.; Marconato, C.; Wtorek, K.; Calo', G.; Janecka, A. Functional Selectivity of EM-2 Analogs at the Mu-Opioid Receptor. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1133961.