



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102006901373939
Data Deposito	05/01/2006
Data Pubblicazione	05/07/2007

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	B		

Titolo

RECETTORE SIGMA-2 METODO DI SCREENING DI LIGANDI SPECIFICI E USO DEGLI STESSI  
IN METODI DIAGNOSTICI O TERAPEUTICI

RM 2006 A 000007

SIB BI3639R

Recettore sigma-2

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:  
"Recettore sigma-2, metodo di screening di ligandi  
specifici e uso degli stessi in metodi diagnostici  
o terapeutici"

a nome di Università degli Studi di Bari  
di Bari (Italia)

#### DESCRIZIONE

##### Campo dell'invenzione

La presente invenzione riguarda la delucidazione della natura chimica del recettore cellulare sigma-2. In particolare l'identificazione, l'isolamento e la caratterizzazione delle proteine che formano il recettore. L'invenzione riguarda altresì l'utilizzazione di tali proteine per la preparazione di un saggio di selezione (screening) di candidati ligandi specifici per il recettore sigma-2, nonché l'utilizzo dei ligandi per l'allestimento di saggi diagnostici per tessuti tumorali e per la preparazione di farmaci antitumorali. Infine le proteine isolate sono utilizzate per la produzione di anticorpi anti-

recettore, che ugualmente trovano impiego nella diagnosi e trattamento terapeutico di neoplasie.

Stato della tecnica anteriore

I recettori sigma sono classificati come sigma-1 e sigma-2 e sono localizzati in differenti tessuti, compreso il sistema nervoso centrale e periferico. È noto in letteratura che l'espressione dei recettori sigma-1 e -2 nei tessuti normali è minore che in corrispondenza di tessuti tumorali. Tali recettori sono sovraespressi in molte linee cellulari tumorali umane ed animali tra cui linee cellulari di neuroblastoma umano di tipo SK-N-SH.

A tutt'oggi il recettore sigma-1 è stato isolato e clonato mentre non si è ancora potuto isolare e caratterizzare il sottotipo sigma-2. Inoltre, benché l'applicabilità diagnostica e terapeutica del recettore sigma-2 sia stata suggerita, il ruolo di questo recettore ed il meccanismo di sovraespressione nel tessuto tumorale deve ancora essere chiarito.

In considerazione degli alti livelli di espressione del recettore sigma-2 in molti tessuti tumorali, ligandi sigma-2 potenti e selettivi potrebbero essere utilizzati come marcatori in tecniche diagnostiche come i metodi PET o SPECT.

Negli ultimi anni, i presenti autori hanno sviluppato diversi ligandi per il recettore sigma-2 e tra questi un derivato cicloesilpiperazinicico PB28, la cui formula è riportata nello schema I. PB28 presenta un'alta affinità ed una potente attività agonista (Perrone et al. 2000, Med Chem Res, 10, pp. 201-207; Berardi et al. 1996, J. Med Chem. 39, pp. 176-182).

Benché i ligandi sigma-2 siano considerati potenziali strumenti per la diagnosi del cancro e possano aprire nuove prospettive terapeutiche, restano molti gli aspetti da chiarire essenziali per poter giungere ad applicazioni pratiche. Infatti ad oggi non è ancora noto il neurotrasmettitore del recettore sigma-2, né è stato delucidato il meccanismo implicato nell'attivazione del recettore stesso. Avanzamenti in questa direzione sono ostacolati dal fatto che la proteina, o le proteine, che svolgono la funzione di recettore sigma-2 non sono state isolate e caratterizzate.

Scopo della presente invenzione è quindi quello di identificare la natura chimica del recettore sigma-2 rendendo disponibili nuovi strumenti di diagnosi e di terapia delle manifestazioni neoplastiche.

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione si basa sul chiarimento della natura chimica del recettore sigma-2, fino ad oggi sconosciuta, e sull'identificazione delle proteine coinvolte singolarmente o in complesso nella funzione di recettore sigma-2. Tali proteine sono gli istoni umani: H3, H2B, H2A.5, H1, H2.1, e la proteina umana 40S ribosomiale S3.

La sovraespressione di recettori sigma-2 in tessuti tumorali corrisponde all'istone presente in forma desacetilata. Tale forma desacetilata degli istoni determina la produzione di nuovi residui NH<sub>2</sub> di lisina ed il conseguente legame con i ligandi sigma-2. Questa osservazione ha aperto nuove prospettive di terapia del cancro basate sull'inibizione degli enzimi istone deacetilasi (Mork et al. Curr. Pharm Des. 2005, N. 11, pp. 1091-1094; Hess-Stumpp et al. Eur. J. Cell Biol. 2005, 84, pp. 109-121).

La scoperta ha permesso come primo oggetto della presente invenzione, l'allestimento di metodi di selezione ed identificazione di nuovi ligandi specifici per il recettore sigma-2 in cui i

composti candidati sono posti a contatto con uno o più istoni umani scelti tra quelli identificati e/o la proteina ribosomiale S3, per determinare se detti candidati sono singolarmente in grado di formare un complesso con l'istone. In tal caso il composto rappresenta un ligando sigma-2.

Un secondo oggetto dell'invenzione è rappresentato da una famiglia di nuovi ligandi specifici per il recettore sigma-2 identificati attraverso il metodo di screening sopra visto.

Un terzo oggetto della presente invenzione sono sonde per diagnosi comprendenti complessi composti da un ligando e da una molecola marcatrice capace di emettere un segnale riconoscibile, preferibilmente fluorescente.

Un quarto oggetto dell'invenzione è rappresentato da metodi diagnostici *in vivo* ed *in vitro* per la determinazione della presenza ed il monitoraggio dello sviluppo di tessuti tumorali o altri tessuti capaci di sovraesprimere il recettore sigma-2 attraverso l'uso delle sonde dell'invenzione.

Ulteriori oggetti sono le applicazioni mediche e composizioni terapeutiche comprendenti i ligandi dell'invenzione da soli o in complesso per il

trattamento di forme neoplastiche modulate dall'attivazione del recettore sigma-2.

L'invenzione che nasce dall'identificazione delle proteine che corrispondono al recettore sigma-2, precedentemente noto solo come semplice funzione biologica, consiste nelle molteplici applicazioni terapeutico/diagnostiche in precedenza non ipotizzabili per mancanza di conoscenza delle proteine responsabili di tale funzione.

#### Descrizione delle figure

Figura 1: La figura riporta i risultati dell'analisi di Gel Elettroforesi su SDS-PAGE della proteina eluita dalla colonna di affinità.

Figura 2: La figura illustra le curve di saturazione rappresentative per il [<sup>3</sup>H]-DTG sul recettore sigma-2 nella frazione membranale eluita (A) e frazione nucleare (B). Le costanti  $K_d$  (nM) e  $B_{max}$  (fmol/mg di proteina) sono state ottenute attraverso le curve di legame specifico ( $P < 0.0001$ ). I valori sono valori medi  $\pm$  s.e.m. di tre esperimenti condotti in triplicato. Gli insiemi di dati sono stati confrontati con analisi di varianza secondo il test di comparazione multipla di Turkey (legame totale contro legame specifico, legame

totale contro legame non specifico, legame non specifico contro legame specifico  $P < 0.0001$ ).

Figura 3: La figura rappresenta la struttura planare dei ligandi di formula 1.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

**Identificazione delle proteine responsabili della funzione di recettore sigma-2.**

È noto che le cellule di neuroblastoma umano SK-N-SH esprimono alti livelli di recettore sigma-2 e che il composto PB28 rappresenta il ligando più potente e selettivo per tale recettore. Queste proprietà sono state utilizzate per sviluppare un metodo di cromatografia di affinità per isolare la o le proteine responsabili della funzione recettore sigma-2.

A questo scopo il composto PB28 è stato funzionalizzato con introduzione di un gruppo amminico sull'anello aromatico (composto 2), successivamente sfruttato per l'immobilizzazione attraverso legame covalente alla matrice solida stazionaria (si veda lo schema 1 sotto riportato). Il gruppo ammino è stato introdotto in una posizione del nucleo tetralinico che non risente, come dimostrato in precedenti studi (Berardi et al.

2004, J. Med. Chem. 47, pp. 2308-2317), dell'inserimento di sostituenti per cui l'affinità e l'attività sigma-2 del ligando ammino-sostituito risultano immutate. Il composto 2 è stato immobilizzato su una matrice attivata con gruppi uscenti di N-idrossisuccinimide.

Successivamente, un lisato di cellule di neuroblastoma umano veniva preparato per lisi osmotica e caricato sulla matrice di affinità preparata come sopra indicato. La frazione proteica era quindi eluita con tampone.

L'analisi dell'eluato per elettroforesi su gel SDS-PAGE (Fig. 1) evidenzia varie bande proteiche, tra cui le bande 15A, 15B e 15C di peso molecolare apparente compreso tra 10 kDa e 15 kDa, mentre le bande 32A e 32B presentano un peso molecolare apparente compreso tra 30 kDa e 35 kDa. Le bande rimosse dal gel sono state idrolizzate *in situ* con procedura nota ed ogni miscela peptidica direttamente identificata attraverso analisi MALDI-MS. I valori misurati di massa molecolare sono stati utilizzati per una ricerca nelle banche dati di materiali proteici NCBI e/o SwissProt con l'aiuto del programma MASCOT per l'identificazione di proteine attraverso l'interpretazione del

fingerprint di massa peptidica. Questa strategia ha permesso di identificare la natura delle proteine a peso molecolare 15 kDa. Precisamente la proteina 15A è stata identificata come l'istone umano H3 (numero di accesso NCBI 51859316), la proteina 15B come l'istone umano H2B (numero di accesso NCBI 1568557), la proteina 15C come l'istone umano H2A.5 (numero di accesso NCBI 70686).

L'identificazione delle bande a 32 kDa ha richiesto ulteriori analisi. Campioni di tali bande sono state sottoposte a spettrometria di massa LC-MS-MS e cromatografia a fase inversa. Le informazioni ottenute sono state quindi utilizzate per una ricerca in banche dati di proteine con il programma di ricerca di ioni MASCOT MS-MS, che ha permesso di identificare il maggior componente della banda proteica 32A come l'istone umano H1 (numero di accesso NCBI 22770677), mentre la banda 32B mostrava una componente principale corrispondente alla proteina S3 ribosomiale umana 40S (numero di accesso SwissProt P23396) ed una componente secondaria corrispondente all'istone umano H2.1 (numero di accesso SwissProt P16403).

La massa ed il numero di residui amminoacidici di ogni peptide analizzato sono elencati nella tabella 1.

**Tabella 1**

Band	protein	Mass (Da)	a.a.	NCBI identification	SwissProt accession number
15A	Histone H3.3A	15285	136	51859376	Q66I33
15B	Histone H2B	13775	125	1568557	Q93080
15C	Histone H2A.5	14053	129	70686	
32A	Histone H1	22565	226	22770677	P16401
32B	Histone H2.1	21234	212		P16403
	40S ribosomal protein S3	26688	243		P23396

I risultati sono stati confermati con analisi di saturazione di legame.

Le proteine eluite dalla cromatografia di affinità, dializzate e liofilizzate, sono state sospese in tampone di incubazione per la determinazione attraverso analisi di legame specifico di saturazione con [<sup>3</sup>H]-DTG (figura 2). Come riportato in figura 2A, i valori calcolati di  $K_d$  pari a  $20.3 \pm 2.5$  nM e di  $B_{max}$  pari a  $588 \pm 50$  fmol/mg di proteina sono in accordo con i corrispondenti valori calcolati precedentemente su preparazioni di membrana cellulare di neuroblastoma SK-N-SH ( $K_d$   $21.0 \pm 2.0$  nM e di  $B_{max}$   $656 \pm 25$  fmol/mg di proteina). Dato che gli istoni rappresentano la frazione proteica nucleare, veniva quindi preparata

una frazione grezza proteica nucleare da neuroblastoma SK-N-SH da sottoporre alla stessa analisi di legame specifico di saturazione con [<sup>3</sup>H]-DTG. I risultati sono illustrati in figura 2B e mostrano valori in accordo coi risultati osservati tanto con le proteine eluite che con le preparazioni grezze di membrana cellulare.

#### Gli istoni sigma-2

Nelle cellule eucariotiche l'impacchettamento ordinato del DNA nel nucleo gioca un ruolo importante nella regolazione della trascrizione genica. Il DNA nucleare è ordinato in una struttura compatta complessa, la cromatina, il cui nucleo è costituito da un ottamero di proteine basiche altamente conservate: gli istoni.

Gli istoni che svolgono funzione di recettore sigma-2 secondo l'invenzione, H3, H2B, H2A.5, H1, H2.1, e proteina umana 40S ribisomiale S3, sono tutte proteine di dominio pubblico, ampiamente descritte in letteratura e la cui sequenza è disponibile da banche dati pubbliche come riportato in tabella 1. Altresì è noto che le estremità amino-terminali degli istoni sono sottoposte a modifiche post-translazionali, in particolare mediante acetilazione/desacetilazione dei residui

di lisina ad opera degli enzimi istone deacetilasi (HDACs) e istone acetil transferasi (HATs). Questi determinano il grado di acetilazione degli istoni, e sono in qualche modo coinvolti nella regolazione dell'espressione dei geni.

Nelle cellule non tumorali gli istoni/sigma-2 sono espressi a livelli moderati ed in forma essenzialmente acetilata. Al contrario, si è osservato che nelle cellule tumorali si ha sovraespressione degli stessi istoni sigma-2 in forma fortemente deacetilata. Ciò che crea una più ampia possibilità di legame tra l'istone ed il/i ligandi sigma-2.

Tipi di tessuti tumorali che presentano queste caratteristiche sono per esempio il neuroblastoma umano, carcinoma uroteliale umano, carcinoma della mammella umano, glioma di ratto.

L'attivazione del recettore sigma-2 da parte di ligandi noti blocca la citodieresi cellulare in fase G0/G1, spingendo quindi con meccanismo ad oggi non ben definito la stessa cellula in apoptosi (morte cellulare). (Colabufo et al. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 2004, 370, pp. 106-113).

Inoltre la sovraespressione dei recettori sigma-2 in cellule tumorali rende tali recettori dei marker tumorali specifici. Per questo nuovi agonisti sigma-2 possono trovare applicazione sia nel settore della diagnosi di neoplasie che del trattamento delle stesse.

A questo scopo sono stati allestiti in accordo con la presente invenzione metodi di identificazione di nuovi agonisti sigma-2 basati su saggi di interazione recettore/ligando.

**Metodo di screening e preparazione di nuovi ligandi**

Il metodo di preparazione di nuovi ligandi secondo l'invenzione prevede a) una fase di selezione in cui candidati ligandi sono posti a contatto con uno o più istoni umani scelti tra gli istoni H3, H2B, H2A.5, H1, H2.1 e/o la proteina umana 40S ribisomale S3; b) una fase in cui si determina se tale candidato ha formato un complesso recettore/ligando; c) una fase in cui l'istone è isolato e, se necessario, altre fasi di purificazione ed identificazione del singolo composto ligando.

La produzione dei composti candidati ligandi, che non è parte della presente invenzione, è condotta in accordo a metodologie e criteri noti di drug-

design, modellistica molecolare o sintesi combinatoriale. I composti così ottenuti possono essere sottoposti a screening in accordo con la presente invenzione tanto in forma di composti singoli che in forma di miscele o di librerie combinatoriali.

Gli istoni/sigma-2 e la proteina 40S ribosomiale S3 utilizzati come recettori nel metodo secondo l'invenzione possono essere utilizzati sia singolarmente che in miscela di due o più elementi. È solamente grazie al contributo della presente invenzione, che è stata chiarita la natura chimica del retore sigma-2, che è possibile allestire metodi di screening che utilizzano come recettori tanto le proteine isolate singolarmente, pure, che quelle frazioni cellulari note per contenere gli istoni e la proteina ribosomiale 40S, vale a dire la frazione membranale, o la frazione proteica nucleare. Tuttavia anche cellule intatte capaci di esprimere naturalmente alti livelli di istoni e proteina 40S ribosomiale S3, o cellule ospiti geneticamente modificate per esprimere gli stessi come proteine eterologhe di membrana possono essere utilizzate come recettori nei metodi dell'invenzione.

Ognuna di queste forme è utilizzata in uno stato fisico che permetta il riconoscimento della formazione del complesso recettore/ligando: per esempio in soluzione, sospensione o immobilizzate su una fase stazionaria. Cellule intere sono coltivate fino a confluenza, almeno parziale, ed utilizzate direttamente in forma aderita al terreno di coltura o alternativamente, dopo rimozione dal terreno di coltura, in forma di sospensione.

Dopo incubazione con i candidati ligandi per un sufficiente periodo di tempo, da 60 a 150 minuti, si evidenzia la formazione di un complesso istone/ligando. La formazione del complesso istone/ligando viene monitorata attraverso studi cinetici di associazione e dissociazione del complesso con protocolli di lavoro già riportati in letteratura (Colabufo et al. 2001, Eur. J. Pharmacol. 427, pp.1-5).

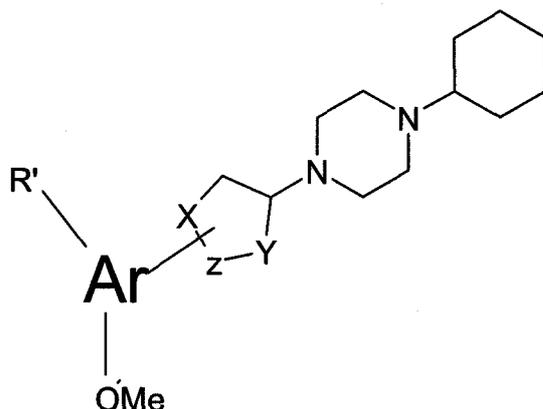
La formazione di un complesso è evidenziata attraverso un saggio in cui le proteine istoniche vengono sospese in Tris 50 mM pH 8.0. In un volume finale di 1 mL di tampone vengono aggiunti il radioligando [<sup>3</sup>H]-DTG e varie concentrazioni di ligando. All'equilibrio, determinato mediante studi cinetici precedentemente menzionati, il complesso

istone/radioligando viene separato dopo 120 minuti per filtrazione su membrane di fibra di vetro (GF/C) e la quantificazione dello stesso viene effettuata mediante conteggio di radioattività. L'affinità del ligando per le proteine istoniche risulterà inversamente proporzionale alla radioattività misurata usando come riferimento il valore massimo di radioattività istone/[<sup>3</sup>H]-DTG misurato in assenza di ligando.

#### **Famiglia di nuovi ligandi**

Il metodo di screening secondo l'invenzione ha permesso di identificare ed isolare nuovi efficaci ligandi appartenenti ad una famiglia avente formula generale 1 e rappresentata in forma planare nella figura 3.

La classe dei composti è caratterizzata da un residuo 1-cicloesilpiperazinico sostituito in posizione 4 da un cicloesile o ciclopentile, o un eterociclo saturo a 5 o 6 termini, che a sua volta è sostituito in posizione 3 o 4 rispetto al legame con l'azoto piperazinico, come in formula 1:



Formula 1

dove **Ar** è un gruppo metossiarile o metossieteroarile contenente uno o più eteroatomi scelti tra N, O, S monociclico a 5 o 6 termini o metossiarile policiclico condensato, opzionalmente parzialmente idrogenato.

R è scelto tra H, OH, alcossile C1-C5 lineare o ramificato, alchile C1-C5 lineare o ramificato, alogenoalchile C1-C5 lineare o ramificato, alogeno, NO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OH, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CONH<sub>2</sub>, NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o COCH<sub>3</sub>;

Z è -CH<sub>2</sub> - , -CH< , -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> - , o -C<sub>2</sub>H<sub>3</sub> <;

X e Y possono essere eteroatomi N, O e S.

Sono comprese le forme geometriche *cis* e *trans* di ciascun composto indicato.

Esempi di ligandi identificati col metodo dell'invenzione sono:

*trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-fenil)cicloesil]piperazina;

*trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-6-etil-fenil)cicloesil] piperazina;  
*trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-6-amino-fenil)cicloesil]piperazina;  
*trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-5-metilammino-fenil)cicloesil]piperazina;  
*trans*-1-cicloesil-3-[4-(2-metossi-fenil)ciclopentil]piperazina;  
*trans*-1-cicloesil-4-[5-(2-metossi-fenil)6-piperidil]piperazina;  
*trans*-1-cicloesil-4-[4-(5-metossi-naftil)cicloesil]piperazina, o corrispondenti isomeri *cis*.

**Valutazione biologica dei ligandi di formula 1.**

I composti indicati sono stato sottoposto a saggi di legame di competizione impiegando come preparato biologico la miscela delle proteine istoniche eluite dalla colonna di affinità (20 microgrammi) e come radioligando il composto [<sup>3</sup>H]-DTG. Il valore di affinità per il composto *trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-fenil)cicloesil]piperazina ( $K_i$ ) é di 0.068 nM.

I composti analoghi appartenenti alla medesima classe ad isomeria *trans* presentano in questo saggio biologico valori di affinità compresi tra

0.010 nM e 10.0 nM. I corrispondenti isomeri *cis* risultano essere meno affini con valori di  $K_i$  compresi tra 10.0 nM e 500 nM.

#### **Applicazioni diagnostiche**

I composti ligandi identificati in accordo con la presente invenzione posseggono attività antiproliferativa e citotossica su cellule tumorali di neuroblastoma o di glioma misurata in saggi di antiproliferazione e citotossicità precedentemente descritto da Colabufo et al. (Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2004 370, pp. 106-1139). Questi risultati dimostrano l'applicabilità dei composti dell'invenzione come agenti antitumorali efficaci su tumori caratterizzati da alti livelli di espressione degli istoni/recettori sigma-2.

Inoltre, composti ligandi sigma-2 aventi alta affinità per le cellule tumorali, siano essi identificati in accordo con la presente invenzione o precedentemente noti, trovano applicazione come vettori selettivi di medicinali antitumorali così come efficaci agenti diagnostici per il rilevamento *in vivo* o *in vitro* della presenza di tumori solidi e per il monitoraggio del loro sviluppo.

Per essere utilizzabili come agenti diagnostici, i composti ligandi ad alta affinità sono modificati

chimicamente e legati a molecole marcatrici capaci di emettere un segnale riconoscibile. Marcatori idonei sono isotopi radioattivi, enzimi, composti fluorescenti ed ogni altra sostanza ben nota nel settore dei saggi diagnostici.

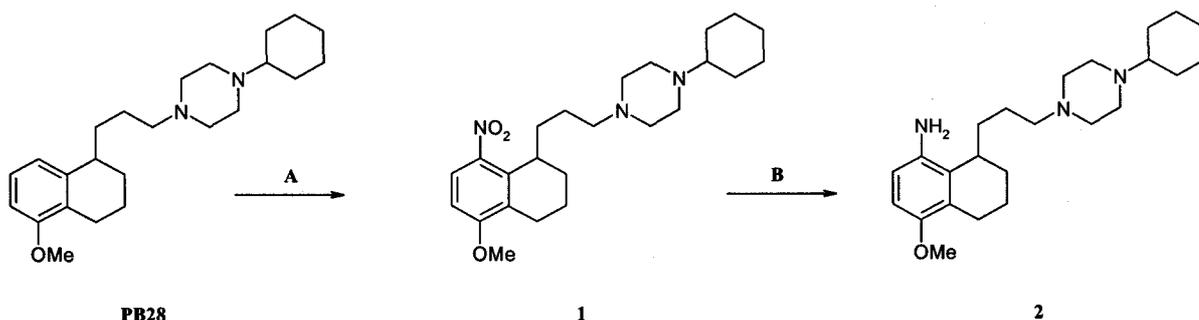
Per quanto riguarda l'impiego di isotopi radioattivi utilizzabili in accordo con la presente invenzione, uno dei traccianti PET modificati, usati nella diagnosi tumorali, é il  $^{18}\text{F}$ -fluorodesossiglucosio [ $^{18}\text{F}$ ]-FDG che permette di avere importanti informazioni del metabolismo glucidico nel tessuto neoplastico. In tale ambito si stanno sviluppando altri traccianti che permettano una mappatura più dettagliata della regione tumorale.

Quanto ai traccianti fluorescenti, questi sono di grande impiego nella citofluorimetria a flusso soprattutto in tumori liquidi (mielomi) per la caratterizzazione di forme tumorali apprezzando nella popolazione cellulare la densità/granularità, il rapporto nucleo-citoplasma, la dimensione cellulare e la omogeneità ottica.

Dato che il sito di legame col recettore è compreso nella porzione cicloesilpiperazina, i composti ligandi sono funzionalizzati sulla porzione della

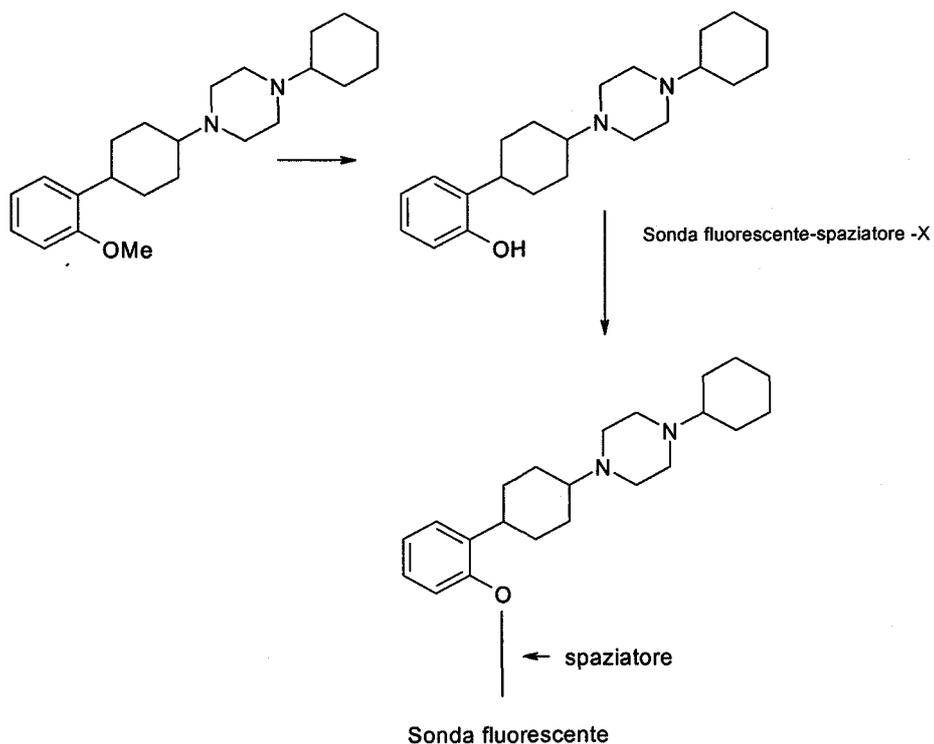
molecole più lontana al sito attivo, vale a dire sul radicale arilico. A tale scopo varie strategie sono disponibili.

Si può utilizzare un residuo amminico già presente sulla porzione aromatica, come nel caso del composto 1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-6-amino-fenil)cicloesil]piperazina, oppure si può introdurre un gruppo nitro che successivamente è ridotto a gruppo ammino come descritto nello schema 1 sotto riportato,



dove (A)  $\text{NO}_2\text{BF}_4$ ; (B)  $\text{SnCl}_2$ ,  $\text{HCl}$

Alternativamente si può trasformare il residuo metossi presente in tutti i composti di formula 1 in un gruppo idrossilico secondo lo schema 2 sotto riportato:



schema 2

Il gruppo funzionale così ottenuto sia esso  $\text{NH}_2$  o  $\text{OH}$  o altro, è quindi utilizzato nella formazione del legame con la molecola marcatrice, per esempio con una molecola fluorescente, quale la cumarina, preferibilmente attraverso uno spaziatore.

#### **Applicazioni terapeutiche**

I composti ligandi sigma-2 trovano applicazione terapeutica nel trattamento e nel controllo di sviluppo di tumori sia in virtù della loro intrinseca attività apoptotica e citotossica sulle cellule tumorali dimostrata su cellule di glioma o

di neuroblastoma (Colabufo et al. 2004) sia come validi vettori capaci di veicolare al tessuto tumorale medicamento antitumorali o sostanza capaci di interferire coi meccanismi cellulari che causano lo sviluppo degli stessi. I ligandi sigma-2, assieme ad altri classi quali i calcio-antagonisti, avendo dimostrato di essere dei buoni modulatori della Glicoproteina-P (Kawamura et al. 2003, Synapse, 48, pp. 80-86) responsabile della MDR (Multi Drug Resistance) possono essere utilizzati per veicolare il chemioterapico all'interno di cellule tumorali divenute resistenti in seguito a chemioterapia (Seelig et al. 2005, Mini-Reviews in Med. Chem. 5, pp 135-151). Allo stato attuale le migliori molecole come il Tariquidar (Roe et al. 1999, 9, pp 885-892; Mistry et al. 2001, 61, pp 749-758) sono in fase III.

Un'ulteriore applicazione della presente invenzione è la produzione di anticorpi poli- e mono-clonali aventi specificità per una o più delle proteine degli istoni H3, H2B, H2A.5, H1, H2.1 e della proteina umana 40S ribisomiale S3 o loro frammenti contenti siti antigenici delle stesse. Anticorpi policlonali e monoclonali sono prodotti in accordo a protocolli ben noti all'esperto del settore.

Corrispondenti anticorpi policlonali prodotti contro l'intera proteina del recettore sigma-1 sono disponibili commercialmente ed utilizzati per il riconoscimento del recettore sigma-1 umano ed animale in saggi immunostochimici, western blotting ed immunoprecipitazione. Le stesse applicazioni di anticorpi anti istoni e/o proteina ribosomiale 40SA sono rese ora disponibili dalla presente invenzione.

Gli esempi sperimentali di seguito riportati illustrano con tutti i necessari dettagli operativi i vari passaggi necessari alla realizzazione dei differenti aspetti dell'invenzione, senza tuttavia limitarne lo scopo della protezione.

**Esempio 1:**

**Identificazione delle proteine corrispondenti al recettore sigma-2. Preparazione della matrice per cromatografia di affinità.**

La sintesi del composto ligando sigma-2 PB28, riportato nello schema 1, ed utilizzato nella preparazione della matrice di affinità è stata precedentemente descritta da Perrone et al. 2000, Med. Chem. Res. 10, pp. 201-207; Berardi et al. 1996, J. Med. Chem. 39, pp. 176-182.

Il nitronio tetrafluoroborato  $\text{NO}_2\text{BF}_4$  (5.76 mmoli, 0.76 g) viene aggiunto ad una soluzione di PB28 (4.8 mmoli, 1.77 g) in  $\text{CH}_3\text{CN}$  (15 mL). La miscela viene mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 8 h. Il solvente viene evaporato e la miscela di reazione viene ripresa con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e lavata con acqua e ghiaccio. La fase organica viene essiccata su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ed il solvente evaporato. Si ottiene una miscela costituita dal 8-nitro derivato, 6-nitro derivato e 6,8 di-nitro derivato. La purificazione della miscela viene effettuata con cromatografia su colonna tipo flash impiegando AcOEt, MeOH e  $\text{NH}_4\text{OH}$  (9/1/0.1%) come eluente. Si ottiene il composto desiderato (1-cicloesil-4-[3-(5-metossi-8-nitro-1,2,3,4-tetraidronaftalen-1-il)propil]piperazina (1) come semisolido giallo con una resa del 20%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 1.00-1.38 [m, 5H, cicloesilici ( $\text{CHH}$ )<sub>5</sub>], 1.40-2.00 [m, 13H, ( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>CH( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>, cicloesilici ( $\text{CHH}$ )<sub>5</sub>], 2.40-2.50 (m, 3H, CHN e  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.62-2.98 (m, 11H, piperazinici, CH benzilico e  $\text{CH}_2$ ), 3.92 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6.68 (d, 1H,  $J = 9.0$ , aromatico), 7.79 (d, 1H,  $J = 9.0$ , aromatico); GC-MS  $m/z$  415 ( $\text{M}^+$ , 3), 398 (34), 202

(100), 181 (55). L'attribuzione dei segnali  $^1\text{H-NMR}$  e' stata confermata da  $^1\text{H-NMRNOESY}$ .

Il composto 1-cicloesil-4-[3-(5-metossi-8-nitro-1,2,3,4-tetraidronaftalen-1-il)propil]piperazina

(1) (0.81 mmoli, 0.34 g) disciolto in EtOH al 95% (10 mL), viene aggiunto goccia a goccia ad una soluzione contenente  $\text{SnCl}_2$  (3.24 mmoli, 0.61 g) in HCl concentrato (1.8 mL). La miscela viene riscaldata all'ebollizione per 3 h. Dopo averla raffreddata viene aggiunto NaOH (5 N) e la soluzione alcalina ottenuta viene estratta con  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 15mL). La fase organica viene lavata con acqua e seccata su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Il solvente viene evaporato ottenendo un olio scuro purificato su colonna cromatografica tipo flash impiegando AcOEt, MeOH e  $\text{NH}_4\text{OH}$  (9/2/0.1%) come eluente. Si ottiene il composto 1-cicloesil-4-[3-(8-ammino-5-metossi-1,2,3,4-tetraidronaftalen-1-il)propil]piperazina (2) come olio giallino con una resa del 50%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ : 1.20-1.40 [m, 6H, cicloesilici ( $\text{CH}_2$ )<sub>3</sub>], 1.40-2.00 [m, 12H, ( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>CH( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>, ciclosilici ( $\text{CH}_2$ )<sub>2</sub>], 2.20-2.40 (m, 3H, CHN e  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.54-2.76 (m, 11H, piperazinici, CH benzilico e  $\text{CH}_2$ ), 3.63-3.76 (s+m, 5H,  $\text{OCH}_3$  e  $\text{NH}_2$  scambiano con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 6.57 (d, 1H,  $J = 8.2$ ,

aromatico), 6.75 (d, 1H,  $J = 8.2$ , aromatico); GC-MS  $m/z$  387 ( $M^+ + 2, 3$ ), 386 ( $M^+ + 1, 17$ ), 385 ( $M^+, 61$ ), 181 (100); ESI-MS  $m/z$  386.3 ( $MH^+$ ). Il corrispondente sale cloridrato e' un solido cristallino bianco: p. f. = 269-274 °C; Anal. ( $C_{24}H_{39}N_3O \cdot HCl \cdot 0.5 H_2O$ ) C, H, N.

La purificazione degli intermedi di sintesi 1 e 2 viene effettuata mediante cromatografia flash su colonna impiegando 1:40 ICN silica gel 60Å (15-40  $\mu$  m) come fase stazionaria. I punti di fusione sono stati determinati in capillari aperti con strumento Gallenkamp. L'analisi elementare (C,N,H) è stata effettuata con Eurovector Euro EA 3000 analyzer ed i risultati analitici ottenuti corrispondono al valore  $\pm 0.4\%$  del valore teorico per la formula data. Gli spettri  $^1H$  NMR sono stati ottenuti con Mercury Varian spectrometer 300 MHz con  $CDCl_3$  come solvente. Tutti i valori sono riportati in ppm ( $\delta$ ). Gli spettri di massa sono stati ottenuti su Agilent 6890-5973 MSD gas chromatograph/mass spectrometer e su Agilent 1100 series LC-MSD trap system VL: sono riportati solo i picchi significativi  $m/z$  con la loro percentuale indicata in parentesi. Tutti gli spettri sono in accordo con le strutture assegnate.

**Procedura per la funzionalizzazione della fase stazionaria.**

La fase stazionaria HiTrap NHS-attivata è costituita dall'estere della *N*-Idrossi-Succinimide (NHS) legata da una epicloridrina al Sepharose High Performance mediante uno spacer di sei atomi di carbonio. Questo tipo di esterificazione comporta un estere attivato che reagisce rapidamente e quantitativamente con il gruppo amminico del ligando per dare una funzione ammidica stabile. L'estere attivato è stabile in assenza di acqua. La fase stazionaria HiTrap NHS-attivata è fornita in isopropanolo al 100%. Per l'attivazione HiTrap NHS-attivata viene lavata con HCl 1 mM freddo (3 x 10 mL) usando una siringa che inietta con una velocità di flusso pari a 1 mL/min. Il composto 2 (50 µmoli) viene solubilizzato nel buffer standard contenente NaHCO<sub>3</sub> 2 M, NaCl 0.5 M, a pH 8.3.

La colonna viene chiusa e mantenuta in queste condizioni per 30 min a 25 °C. I siti attivi della colonna non funzionalizzati ed il composto 2 non legato alla colonna vengono rispettivamente disattivati ed eliminati dalla colonna usando il Buffer A (etanolamina 0.5 M, NaCl 0.5 M a pH 8.3) ed il Buffer B (acetato 0.1 M, NaCl 0.5 M a pH

4.0). Viene iniettato prima il Buffer **A** (3 x 10 mL) poi il Buffer **B** (3 x 10 mL) poi il Buffer **A** (3 x 10 mL) ed infine il Buffer **B** (3 x 10 mL). La colonna viene conservata per successivi impieghi in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  05 M, 0.1 % di  $\text{NaN}_3$  a pH 7.0.

#### **Coltura cellulare**

Le cellule SK-N-SH di neuroblastoma umano vengono portate in coltura in un medium costituito da RPMI 1640, FSC al 10%, 100 U/mL di penicillina, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di streptomina, 1% di amminoacidi non essenziali, 1 mM di sodio piruvato e 2 mM di L-glutamina in atmosfera di  $\text{CO}_2$  al 5% a 37 °C.

#### **Preparazione delle membrane**

La preparazione delle membrane dalla linea cellulare SK-N-SH viene effettuata come descritto in letteratura (Vilner et al. 1995, *Cancer Res.* 55, pp. 408-413). Le cellule di SK-N-SH vengono portate all'80% della confluenza. Il mezzo di coltura viene rimosso e le cellule lavate con PBS. Dopo averle staccate dalla piastra, le cellule vengono sospese in tampone freddo Tris-HCl 10 mM a pH 7.4, contenente saccarosio 0.32 M e trattate con l'omogenizzatore Potter-Elvehjem. L'omogenato viene centrifugato a 31,000 x g per 15 min a 4 °C eliminando il surnatante. Il pellet finale viene

risospeso in tampone di Tris-HCl 10 mM a pH 7.4 e congelato a - 80 °C. Il dosaggio delle proteine viene effettuato con il metodo di Lowry.

#### **Frazione nucleare**

La frazione nucleare delle cellule SK-N-SH viene preparata secondo il metodo già riportato in letteratura (Cagnotto et al.1994, *Eur. J. Pharm.* 266, pp. 131-138).

Le membrane di SK-N-SH vengono risospese in buffer freddo di Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) e centrifugate a 1,000 x g per 10 min a 4 °C ottenendo la frazione nucleare (NP1). Il pellet finale (NP1) ed il surnatante vengono risospesi in buffer e conservati a - 80 °C.

#### **Analisi di saturazione con radioligando**

Gli esperimenti di saturazione vengono effettuati con procedure riportate in letteratura (Vilner et al. sopra). I recettori sigma-2 nelle membrane di SK-N-SH, nella frazione nucleare (NP1) e nel surnatante vengono legati dal radioligando [<sup>3</sup>H]-DTG a concentrazioni comprese tra 1.0 nM e 150 nM. I campioni contenenti 400 µg di proteina, radioligando, 10 µM di DTG non marcato per determinare il binding non specifico e 1 µM di (+)-pentazocina per mascherare i recettori sigma-1

vengono portati all'equilibrio in un volume finale di 500  $\mu$ L di Tris-HCl 50 mM a pH 8.0 per 120 min a 25 °C. All'equilibrio vengono aggiunti 5 mL di buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4). I campioni vengono filtrati su membrane di fibra di vetro (GF/C) ambientati in PEI allo 0.5 % per 30 min prima dell'uso. I filtri vengono lavati con il buffer per 2 volte (5 mL). Il conteggio della radioattività viene effettuata su Scintillatore LS -6500 Beckman.

#### **Separazione delle proteine per cromatografia di affinità.**

Una sospensione di membrane di SK-N-SH costituita da 4 mg in 5 mL di Tris 50 mM, pH 8.0 viene iniettata in colonna avente la fase stazionaria funzionalizzata con il composto 2 come selettore. La colonna viene chiusa e mantenuta a temperatura ambiente per 1 h. Successivamente viene lavata con Tris 50 mM, pH 8.0 (3 x 5 mL) per rimuovere la frazione biologica non legata al selettore. La frazione biologica legata al selettore viene eluita con glicina 20 mM, pH 3.0 (3 x 5 mL). La soluzione viene liofilizzata a - 52 °C e 0.061 mbar e quindi analizzata in SDS-PAGE gel elettroforesi. Vengono osservate tre distinte bande aventi massa compresa

tra 13 KDa e 14 KDa ed una singola banda avente un massa compresa tra 29 KDa e 32 KDa.

**Digestione *in situ* delle bande elettroforetiche.**

Le proteine presenti nella frazione biologica legata al selettore vengono separate da SDS-PAGE su gel di bis-acrilammide al 12% (Figura 1). L'analisi evidenzia varie bande proteiche evidenziate con Colloidal Comassie (Pierce) a circa 15 KDa e 32 kDa. In particolare si riconoscono tre bande maggiori attorno a 15 kDa (15A, 15B, e 15C) e due a 32 kDa (32A e 32B). Le bande vengono recise, frammentate e trattate con una soluzione di bicarbonato di ammonio 50 mM a pH 8.0 contenente il 50% di acetonitrile. I frammenti di gel vengono risospesi in ammonio bicarbonato a pH 8.0, trattate con DTT a 56 °C per 45 min e alchilati con una soluzione di iodoacetammide 55 mM nello stesso buffer per 30 min a temperatura ambiente in camera oscura. L'eccesso di reagente viene eliminato e i frammenti di gel vengono lavati più volte e poi risospesi in un buffer di carbonato di ammonio 50 mM ed incubati con 100 ng di tripsina per 2 h a 4 °C e tutta la notte a 37 °C. Il surnatante contenente peptidi viene rimosso e i frammenti di gel lavati con acetonitrile per estrarre la

frazione di peptidi ancora presenti sul gel. Le due frazioni vengono riunite e liofilizzate.

#### **Analisi MALDI-MS**

Gli spettri di massa MALDI sono stati effettuati con Applied Biosystem Voyager DE-PRO. 1  $\mu$ L di peptide viene miscelato con un ugual volume di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico come matrice (10 mg/ml in 0.2% TFA in 70% acetonitrile), applicato al campione su piastra metallica ed aria secca. La calibrazione di massa viene effettuata usando miscele standard. I dati non elaborati, riportati come masse monoisotopiche, vengono poi introdotti nel programma di ricerca MASCOT per l'identificazione di proteine da banche dati di proteine (NCBI e SwissProt).

#### **Analisi LC-MS-MS**

Quando l'identitá del peptide non puó essere determinata mediante la sola analisi MALDI, la miscela dei peptidi viene analizzata mediante LC-MS-MS usando lo spettrometro Q-ToF (Micromass, Waters). Dopo il caricamento, la miscela di peptide (10  $\mu$ L) viene concentrata e lavata con acqua con 10  $\mu$ L/min dalla pre-colonna a fase inversa (Waters) usando lo 0.2% di acido formico come eluente. Il campione viene poi separato su una colonna

capillare C<sub>18</sub> a fase inversa (75 µm x 20 mm) con una velocità di flusso di 280 nL/min usando un gradiente lineare di eluente **B** (0.2% di acido formico in 95% di acetonitrile) in **A** (0.2% di acido formico in 5% di acetonitrile) dal 7% al 50% in 50 min. Lo spettrometro di massa viene predisposto in modalità MS/MS dove la completa scansione dello spettro (acquisizione di  $m/z$  da 400 a 1600 Da/e) viene eseguita da uno spettro di massa accoppiato (acquisizione di  $m/z$  da 100 a 2000 Da/e). Gli ioni precursori vengono selezionati quali tre più intensi picchi della pre-scansione. L'energia di collisione utile viene applicata in funzione della massa e della carica dello ione precursore. Il software ProteinLynx viene utilizzato per analizzare gli spettri di MS e di MS/MS e per generare un elenco di picchi che viene introdotto nel programma di ricerca MASCOT MS/MS per l'identificazione dei peptidi.

I risultati hanno permesso di identificare le cinque bande separate in SDS-PAGE come gli istoni e la proteina 40S ribisomale S3 come riportato in tabella I.

**Esempio 2:**

**Metodo di screening di nuovi ligandi**

In un volume finale di 500  $\mu$ L di tampone (Tris 50 mM, pH 8.0) vengono sospesi 20  $\mu$ g di proteine istoniche, il radioligando [ $^3$ H]-DTG ad una concentrazione compresa tra 4.0 nM e 6.0 nM ed il candidato ligando da valutare. Il campione viene incubato per 120 min a 25 °C poi il complesso istone/radioligando viene filtrato rapidamente su membrane GF/C  $\varnothing$  25 mm. Il filtro viene lavato per 2 volte con 3 mL di tampone. Viene aggiunto liquido di scintillazione ed effettuata la lettura di radioattività. La percentuale di spiazzamento viene effettuata come differenza (%) rispetto al legame specifico misurato impiegando 10  $\mu$ M di DTG.

**Valutazione della formazione del complesso istone/radioligando: Cinetica di associazione**

In un volume finale di 500  $\mu$ L vengono aggiunti 10  $\mu$ g di miscela di proteine istoniche eluite, 3 nM di [ $^3$ H]-DTG. Analogamente viene preparato un campione con le medesime quantità di proteina e di radioligando e del ligando in esame. A tempi differenti (da 5 min a 180 min) vengono filtrati i campioni in assenza ed in presenza di ligando e dalla differenza di radioattività tra ciascuna

coppia di campioni viene valutata la velocità di formazione del complesso fino al raggiungimento dello stato stazionario.

#### **Cinetica di dissociazione**

In un volume finale di 500 µL vengono aggiunti 10 µg di miscela di proteine istoniche eluite, 3 nM di [<sup>3</sup>H]-DTG. All'equilibrio (120 min) viene aggiunto il campione in esame e a tempi differenti (da 5 min a 180 min) viene valutata la radiattività residua. La differenza di radioattività tra lo stato stazionario e la filtrazione del campione permette di valutare l'evento di dissociazione del complesso istone/ligando. (Colabufo et al. 2001, Eur. J. Pharmacol. 427, pp.1-5)

#### **Esempio 3:**

**Saggi antiproliferativi e di citotossicità del composto *trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-fenil)cicloesil] piperazina.**

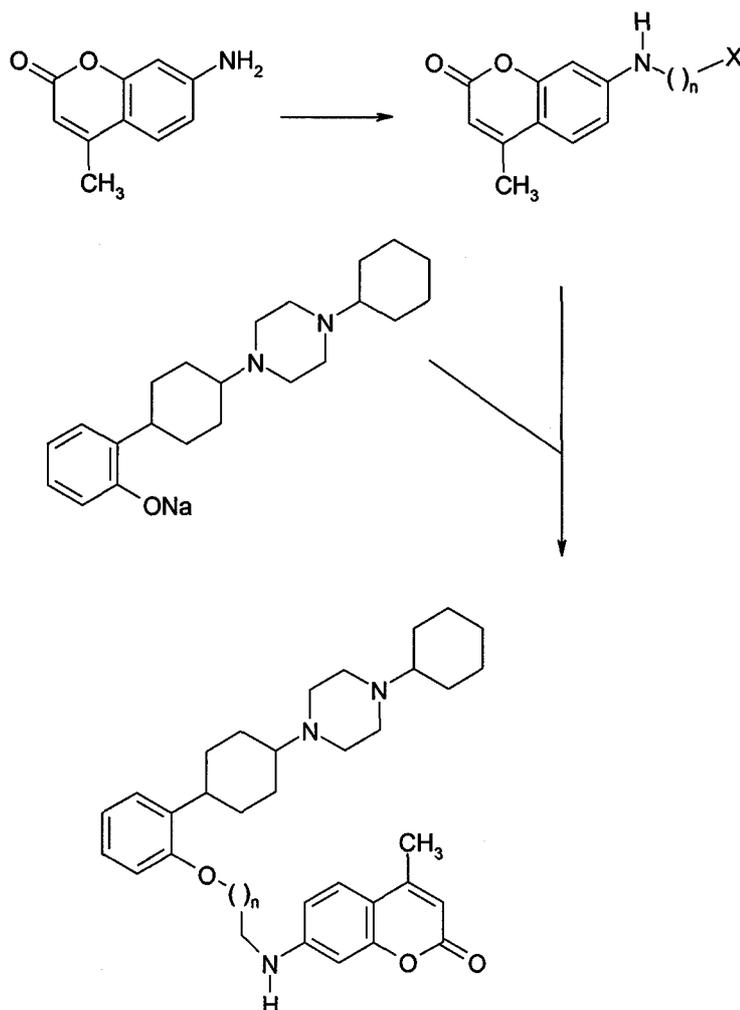
Il test antiproliferativo per i composti viene effettuato usando il saggio con MTT (Mossman et al. 1983, J. Immunol. Methods 65, pp 55-63). Il saggio di citotossicità viene effettuato misurando il livello di LDH come riportato da Vilner e Bowen 2000, J. Pharmacol. Exp. Ther. 292, pp 408-413. La parte sperimentale dettagliata è riportata in

Colabufo et al. 2004, Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 370, pp. 106-113. I risultati osservati nei due test sono omogenei ai risultati riportati in letteratura per il miglior ligando fin'ora noto: il composto PB28.

**Esempio 4: Sonda fluorescente**

**Preparazione di una sonda fluorescenti a partire dal ligando *trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossifenil)cicloesil] piperazina ed il tracciante 7-ammino-4-metil-cumarina.**

Il tracciante 7-ammino-4-metil-cumarina viene trattato con un eccesso stechiometrico di uno spaziatore di formula generale  $X(CH_2)_nX$  (dove  $X = Cl$  e/o  $Br$ ,  $n = 4-6$ ) a riflusso in acetonitrile per tutta la notte in presenza di  $Na_2CO_3$ . Il solvente viene evaporato e il residuo viene ripreso con 20 mL di acqua e  $CHCl_3$ . la fase organica viene seccata su  $Na_2SO_4$  anidro. Il solvente viene evaporato ottenendo un olio che viene purificato su colonna cromatografia ( $CHCl_3/MeOH$  95:5).



L'intermedio ottenuto viene fatto reagire con il fenato sodico del ligando in toluene a refluxo per tutta la notte secondo lo schema sopra riportato. Si evapora il solvente, la miscela viene ripresa con acqua e  $\text{CHCl}_3$ . La fase organica viene seccata su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ed evaporato il solvente. La sonda fluorescente ottenuta viene purificata su colonna cromatografia  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  95:5). Condizioni di lavoro spettrofluorimetriche:  $\lambda_{\text{ex}} = 345-355$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 440-450$ .

**Esempio 5:**

**Saggio di fluorescenza di cellule tumorali:**

Le cellule vengono seminate in medium completo per 48 h su vetrino. Il vetrino viene trattato con EtOH e successivamente lavato con PBS. Il vetrino viene immerso in una soluzione contenente la sonda fluorescente diluita in Tris 50 mM per 2 ore. Si lava con lo stesso tampone il vetrino e si effettua la lettura con  $\lambda_{ex} = 345$  nm ed emissione  $\lambda_{em} = 440$  nm.

*e. germini*  
Dott. Germini  
(art. 2378)



**RM 2006 A 000 007**

RIVENDICAZIONI

1. Metodo di preparazione di ligandi specifici per un recettore tipo sigma-2 comprendente fasi in cui

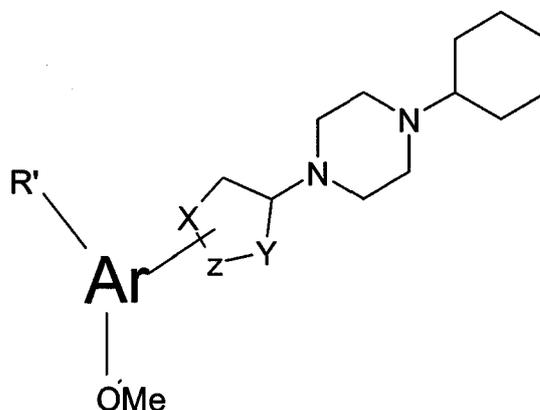
- si pongono composti candidati ligandi a contatto con uno più istoni umani in forma parzialmente desacetilata scelti tra gli istoni H3, H2B, H2A.5, H1, H2.1 e/o proteina umana 40S ribisomale S3.
- Si individua il composto capace di generare un complesso recettore/ligando;
- Si isola il ligando dal complesso ed opzionalmente
- Si purifica ed identifica il ligando.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui come recettore si utilizzano uno o più istoni e/o la proteina umana 40S ribosomale S3 tutti in una forma scelta tra: la forma pura, la frazione cellulare membranale, la frazione proteica nucleare o cellule intatte naturali o geneticamente modificate.

3. Metodo secondo la rivendicazione 2 in cui il recettore in forma di miscela di proteine pure o frazione cellulari o cellula intatta é in fase liquida o è immobilizzato su una fase stazionaria.

4. Ligando specifico per il recettore sigma-2,

ottenibile attraverso il metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 ed avente formula generale 1



Formula 1

dove:

Ar è un gruppo metossiarile o metossieteroarile contenente uno o più eteroatomi scelti tra N, O, S monociclico a 5 o 6 termini o metossiarile policiclico condensato, opzionalmente parzialmente idrogenato,

R' è scelto tra H, OH, alcossile C1-C5 lineare o ramificato, alchile C1-C5 lineare o ramificato, alogenoalchile C1-C5 lineare o ramificato, alogeno, NO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OH, NHCH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CONH<sub>2</sub>, NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> o COCH<sub>3</sub>;

Z è scelto tra -CH<sub>2</sub> - , -CH< , -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> - , o -C<sub>2</sub>H<sub>3</sub> < ;

X e Y sono scelti tra N, O e S, e dove

ciascuna unità ciclica può essere tanto in forma *cis* che *trans*.

5. Ligando secondo la rivendicazione 4, in cui Ar è un residuo 2-metossifenil, 2-metossi-6-amminofenil, 2-metossi-5-amminofenil, 2-metossi-5-amminofenil, 2-metossi-6-nitrofenil.

6. Ligando secondo la rivendicazione 4 scelto tra:

*trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-fenil)cicloesil]piperazina;

*trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-6-etil-fenil)cicloesil]piperazina;

*trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-6-amino-fenil)cicloesil]piperazina;

*trans*-1-cicloesil-4-[4-(2-metossi-5-metilammino-fenil)cicloesil]piperazina;

*trans*-1-cicloesil-3-[4-(2-metossi-fenil)ciclopentil]piperazina;

*trans*-1-cicloesil-4-[5-(2-metossi-fenil)6-piperidil]piperazina;

*trans*-1-cicloesil-4-[4-(5-metossi-naftil)cicloesil]piperazina, o corrispondenti isomeri *cis*

7. Ligando secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 4 a 6 per uso come medicamento.

8. Ligando secondo la rivendicazione 7 nel trattamento di neoplasie caratterizzate da sovraespressione degli istoni H3, H2B, H2A.5, H1, H2.1 e della proteina umana 40S ribisomale S3.

9. Composizione farmaceutica comprendente uno o più ligandi secondo le rivendicazioni da 4 a 6, un eccipiente farmacologicamente accettabile ed opzionalmente additivi usuali.

10. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9, in formulazione idonea al trattamento di cellule tumorali attraverso blocco del ciclo in fase G0/G1 e successiva apoptosi.

11. Sonda diagnostica comprendente il complesso del ligando secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 6 ed una molecola marcatrice capace di emettere un segnale riconoscibile.

12. Sonda diagnostica secondo la rivendicazioni 11 in cui il marcatore è una molecola fluorescente, un enzima, un isotopo radioattivo.

13. Metodo diagnostico per la determinazione della presenza di tumori solidi o per il monitoraggio dello loro sviluppo comprendente una fase in cui si determina *in vitro* su biopsia di tessuto il livello di espressione di uno o più istoni umani in forma parzialmente desacetilata scelti tra gli istoni H3,

H2B, H2A.5, H1, H2.1 e della proteina umana 40S ribisomale S3.

14. Metodo diagnostico secondo la rivendicazione 13 in cui la determinazione dei livelli di espressione è eseguita utilizzando la sonda secondo la rivendicazione 12.

15. Metodo secondo la rivendicazione 14, in cui il campione di tessuto è immobilizzato su un supporto solido e la sonda è una sonda fluorescente.

16. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13 a 15 in cui il tumore è neuroblastoma, carcinoma uroteliale, carcinoma della mammella, glioma.

17. Composizione immunizzante comprendente uno o più istoni desacetilati scelti tra gli istoni H3, H2B, H2A.5, H1, H2.1 e la proteina umana 40S ribisomale S3 ed uno o più immunoadiuvanti e mezzi di diluizione usuali.

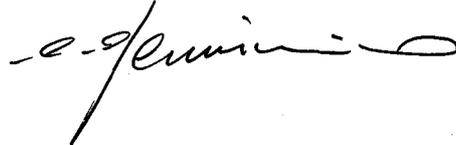
18. Metodo di produzione di anticorpi mono o policlonali specifici per un recettore tipo sigma-2 caratterizzato dal fatto che si utilizza come agente immunizzante la composizione secondo la rivendicazione 17.

19. Anticorpi poli- o mono-clonali specifici per il recettore sigma-2 ottenibili attraverso il

metodo secondo la rivendicazione 18.

p.p. Università degli Studi di Bari

*Dott. Claudio Germinario*  
(Iscr. Albo n° 939 B)



RM 2006 A 000 007

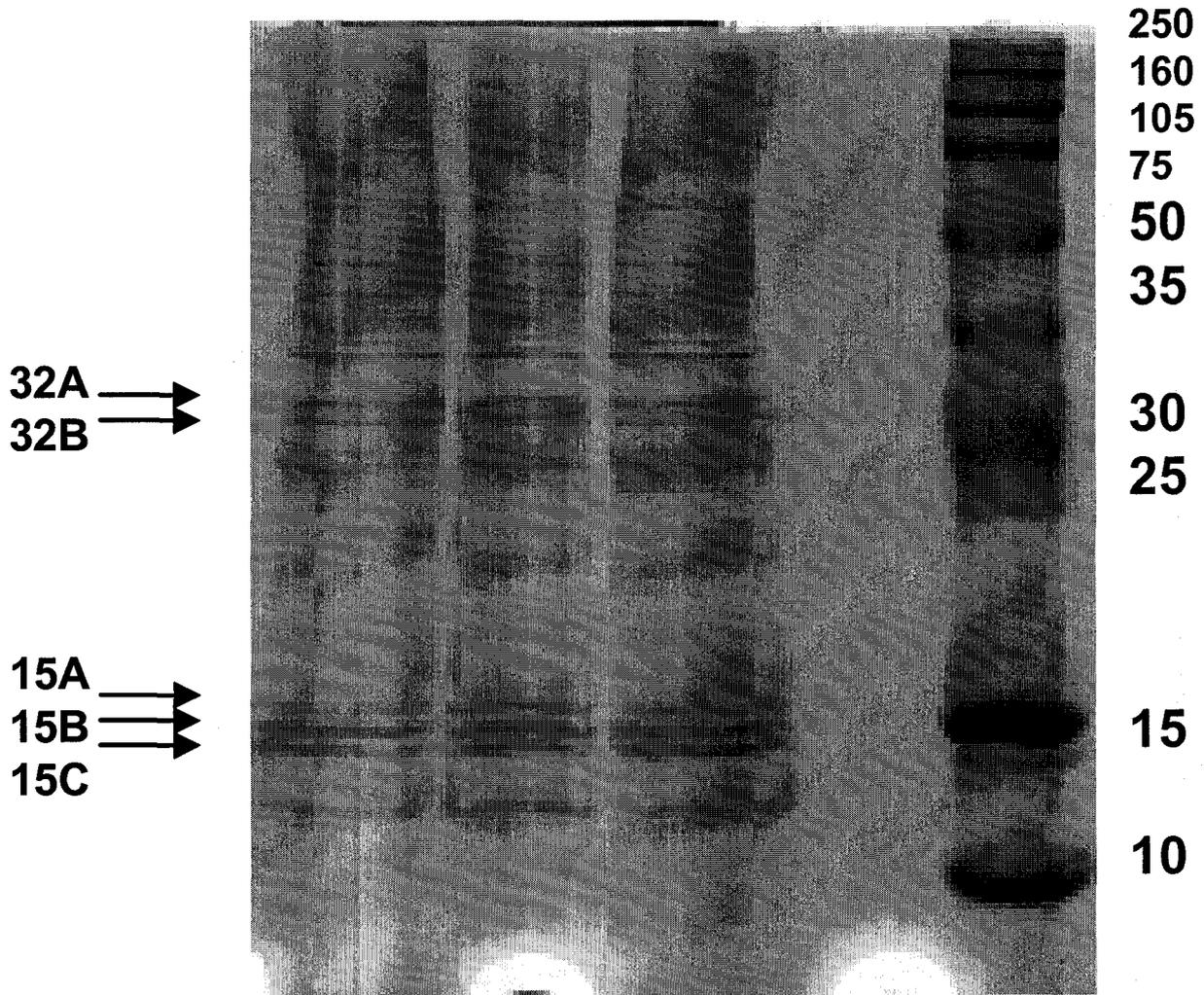


Figura 1

p.p. Università degli Studi di Bari

*Claudio Germinario*  
Claudio Germinario  
(Iscr. Albo n. 989 B)

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI

RM 2006 A 000007

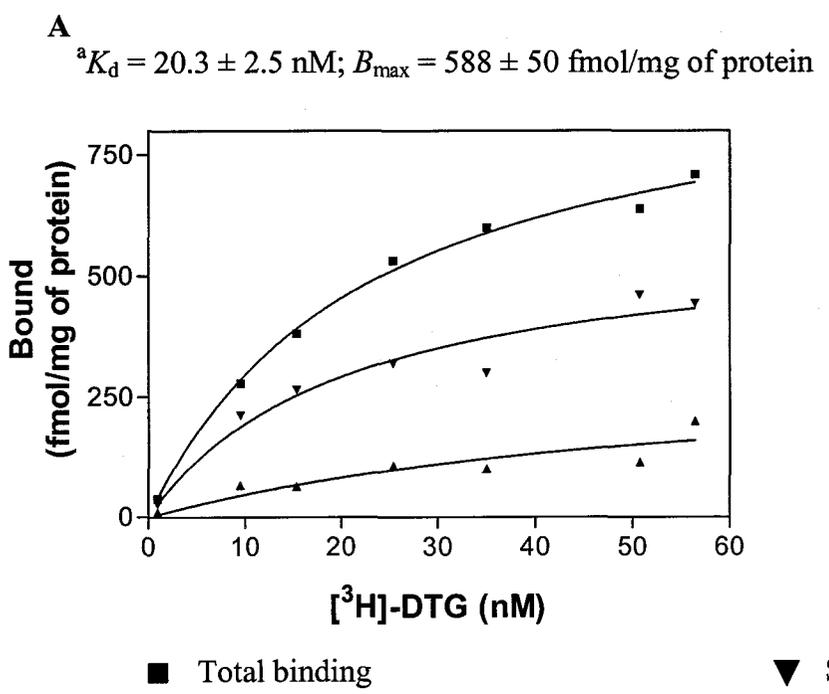
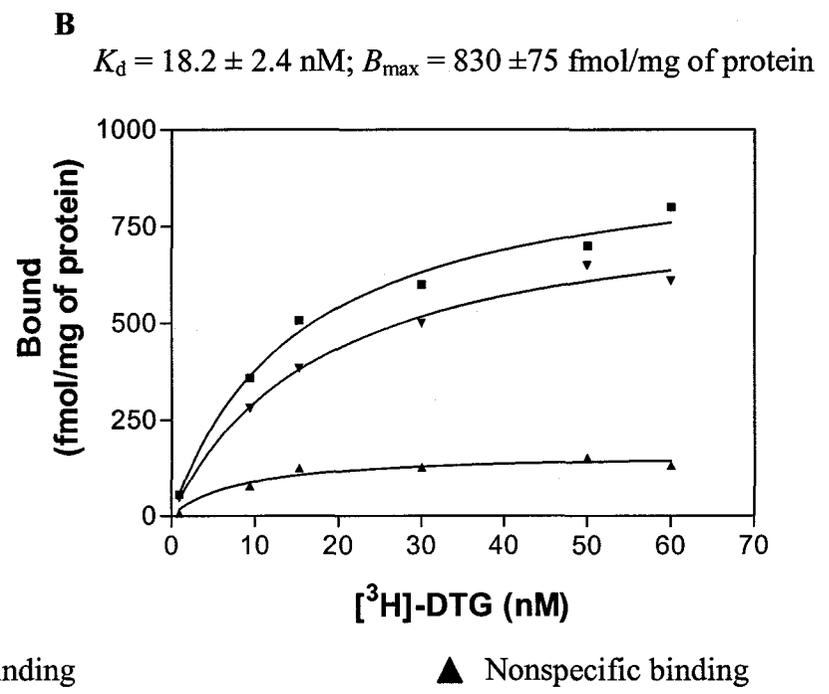
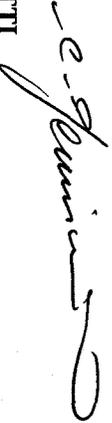


Figura 2



p.p. Università degli Studi di Bari  
Claudio Germinario  
(Iscr. Albo n. 989 B)  
SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI



RM 2006 A 000007

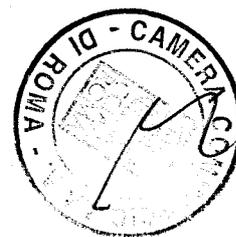
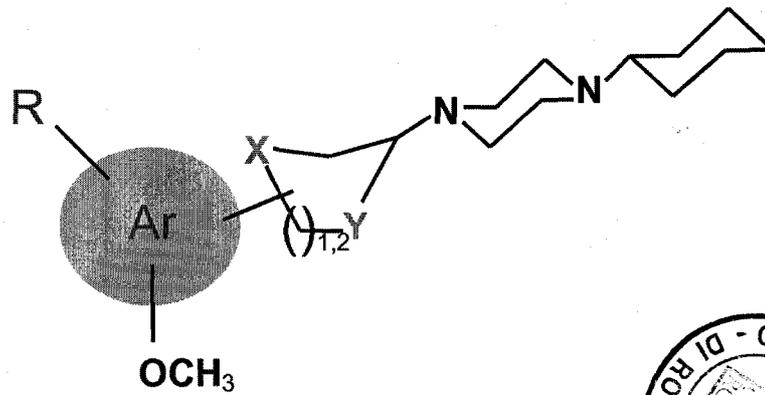


FIGURA 3

p.p. Università degli Studi di Bari

*C. Germinario*  
Claudio Germinario  
(Iscr. Albo n. 989 B)

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI