



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL  
FARMACO

Direttrice Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN  
FARMACIA**

Sintesi di un modulatore del recettore sigma photoswitchabile

Relatori: *Chiar.mo Prof. Stefano Protti, Prof. Giacomo Rossino*

Correlatori: *Dott.ssa Valentina Benazzi,*

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

*Lorenzo Perazzoni*

Anno Accademico 2025/2026

## INDICE

<b>Abstract</b> .....	3
<b>1 INTRODUZIONE</b> .....	4
<b>1.1 I RECETTORI SIGMA</b> .....	4
<b>1.2 MECCANISMI DI FOTOATTIVAZIONE</b> .....	10
<b>1.3 PHOTOSWITCHES</b> .....	15
<b>1.4 STRATEGIE DI DESIGN DEI NUOVI COMPOSTI</b> .....	21
<b>2 SCOPO DELLA TESI</b> .....	24
<b>3 RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....	26
<b>4 CONCLUSIONI</b> .....	42
<b>5 SEZIONE SPERIMENTALE</b> .....	44
<b>6 BIBLIOGRAFIA</b> .....	47

## Abstract

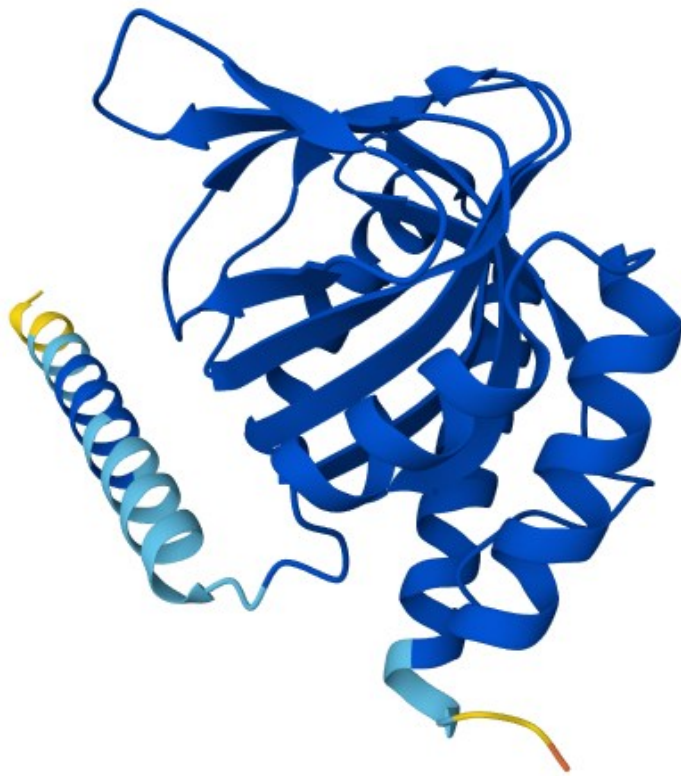
Il presente lavoro di tesi si inserisce nell'ambito della fotofarmacologia applicata all'oncologia e descrive la progettazione e la sintesi di una molecola fotoattivabile diretta contro i recettori Sigma, target iperespressi nei tumori. L'approccio adottato ha previsto l'integrazione di un ligando noto di Sigma Receptor SR, selezionato tra quelli sviluppati dal gruppo di ricerca MedChemLab, con uno scaffold fotosensibile in grado di subire fotoisomerizzazione reversibile. L'obiettivo è stato quello di ottenere un sistema molecolare la cui attività biologica potesse essere modulata spazialmente e attivata in situ, mediante irraggiamento a specifiche lunghezze d'onda, riducendo gli effetti collaterali e sistemici tipici della chemioterapia convenzionale.

# 1 INTRODUZIONE

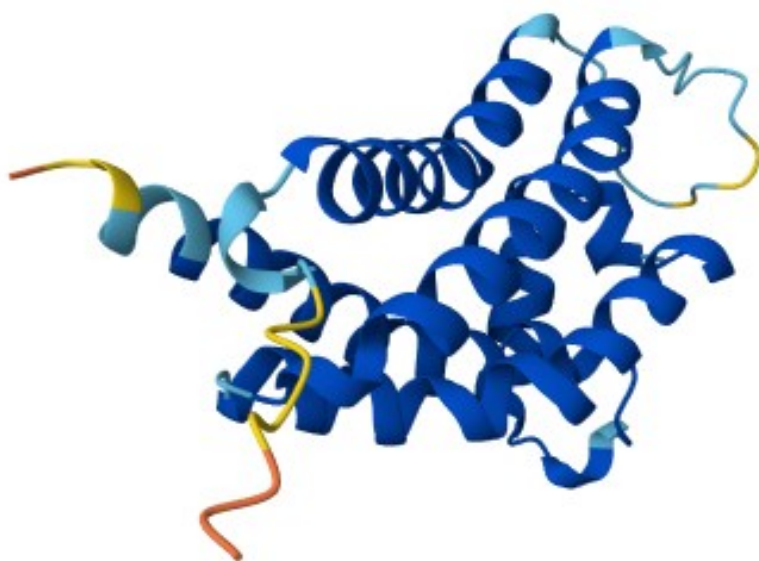
## 1.1 I RECETTORI SIGMA.

I recettori sigma costituiscono una classe di proteine di membrana, originariamente erroneamente classificata come sottotipo oppioide a causa degli effetti psicomimetici di alcuni composti benzomorfanici.(1) La ricerca biomolecolare ha chiarito questa ambiguità identificando due sottotipi principali: il recettore sigma-1 (S1R) e il recettore sigma-2 (S2R), che differiscono per peso molecolare, localizzazione e affinità farmacologica. (1) Il S1R, clonato nel 1996, è una proteina di circa 25-30 kDa composta da 223 aminoacidi.(1) La sua natura è definita enigmatica poiché non presenta omologie di sequenza con altri recettori mammiferi noti, mostrando invece una sorprendente somiglianza strutturale con le sterolo isomerasi dei funghi.(1) Localizzato prevalentemente nel reticolo endoplasmatico, specificamente nelle membrane associate ai mitocondri (MAM). S1R agisce come un chaperone molecolare regolato da ligandi.(1) In queste zone di contatto, stabilizza proteine clienti come i recettori dell'inositolo trifosfato (IP3), garantendo la corretta segnalazione del calcio e la sopravvivenza cellulare sotto stress.(1)

Il sottotipo sigma-2, di dimensioni inferiori (18-21,5 kDa), è stato recentemente identificato come TMEM97.(2)(3)(4) Questo recettore è di particolare interesse in oncologia poiché risulta espresso in densità elevata nelle cellule tumorali, agendo come biomarcatore della proliferazione e potenziale bersaglio per indurre l'apoptosi.(1) Grazie alla loro capacità di interagire con ligandi eterogenei come neurosteroidi, neurolettici e antidepressivi, i recettori sigma rappresentano oggi frontiera cruciale per il trattamento di patologie neurodegenerative e neoplastici.(1)



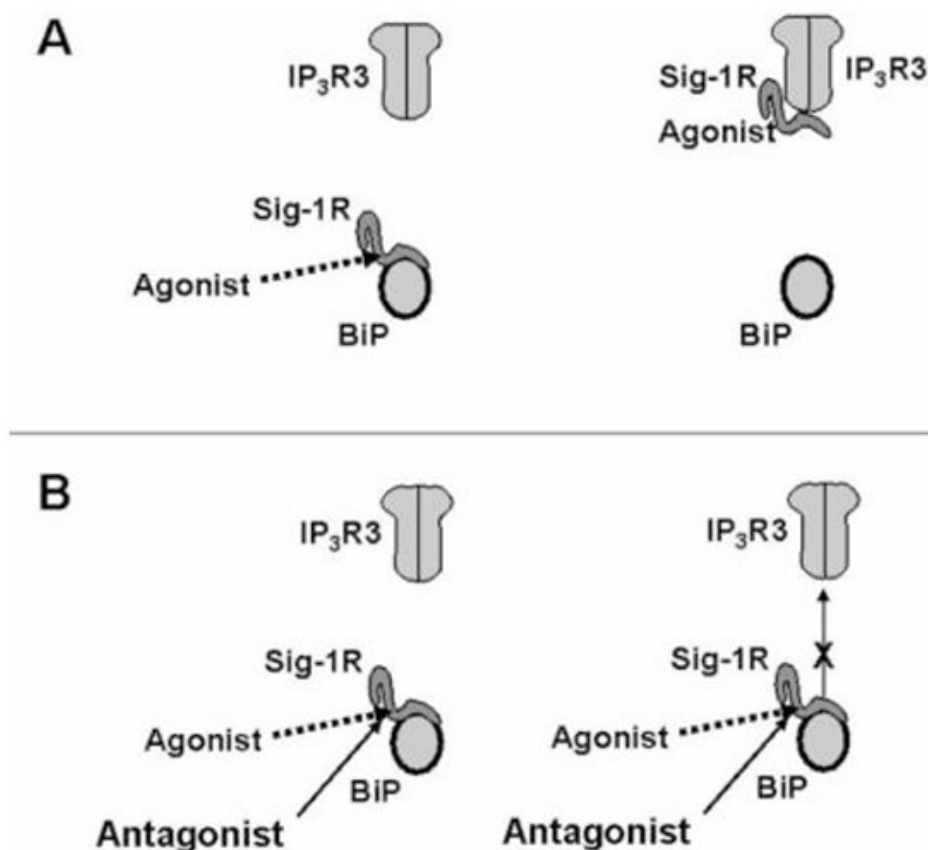
**Figure 1.** Modello predittivo 3D del recettore sigma 1 da AlphaFold Protein Structure Database



**Figure 2** Modello predittivo 3D del recettore sigma 2 da AlphaFold Protein Structure Database

### **1.1.1 Ruolo fisiologico e funzioni biologiche dei recettori sigma**

Il sistema dei recettori sigma svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi cellulare e della segnalazione inter-organellare.(5) Il sottotipo sigma-1 opera primariamente come un chaperone molecolare regolato da ligandi presso le membrane MAM, dove stabilizza il recettore dell'inositolo trifosfato (IP3) per garantire il corretto flusso di calcio dal reticolo endoplasmatico ai mitocondri.(1) In condizioni fisiologiche basali, esso rimane silente e associato alla proteina BiP, ma in risposta allo stress cellulare o al legame con agonisti si dissocia per promuovere la sopravvivenza e contrastare i processi apoptotici.(5) Oltre alla funzione chaperone, il sigma-1 modula la plasticità neuronale influenzando la neuritogenesi e potenziando la risposta dei recettori NMDA, svolgendo un compito cruciale nei processi di memoria e apprendimento.(5) Attraverso interazioni proteina-proteina, esso regola inoltre un'ampia gamma di canali ionici, inclusi quelli per sodio, potassio e calcio, agendo come un sintonizzatore della plasticità elettrica cellulare.(5)



**Figura 3.** Interazione tra recettore Sigma-1, recettore inositolo trifosfato IP<sub>3</sub> e Proteina BiP.  
(8)

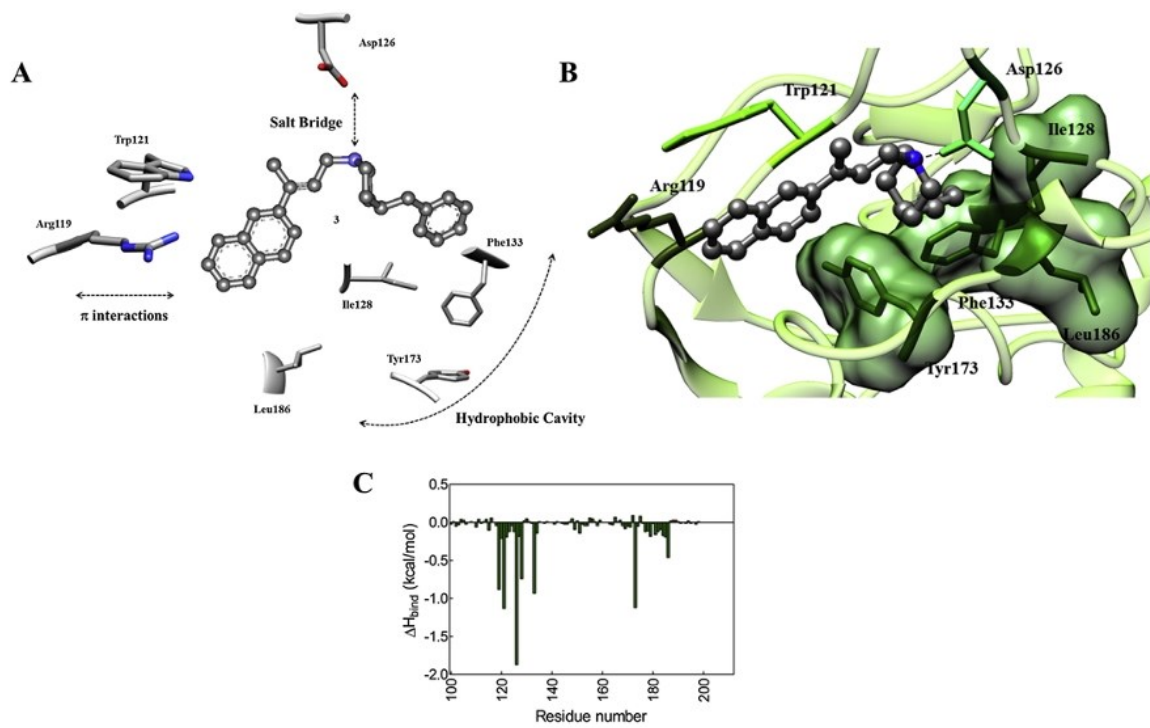
Il recettore sigma-2, invece, è strettamente legato alla regolazione del ciclo cellulare e della vitalità, agendo come un affidabile biomarcatore dello stato proliferativo nei tessuti solidi.(6) La sua attivazione promuove la diffusione degli ioni calcio da compartimenti intracellulari distinti e innesca percorsi di morte cellulare programmata, quali l'apoptosi e l'autofagia, in particolare nelle linee cellulari tumorali.(7) Questa complessa rete funzionale colloca il sistema sigma al centro dei meccanismi di risposta allo stress e di adattamento ambientale, offrendo ampie opportunità per interventi terapeutici mirati sia nel sistema nervoso centrale che in oncologia.(5)

**1.1.2 Prospettive in terapia.** Le prospettive terapeutiche legate al sistema dei recettori sigma sono estremamente ampie, dalle malattie neurodegenerative all'oncologia. Gli agonisti del sigma-1 hanno dimostrato significativi effetti anti-amnesici e pro-cognitivi in modelli di Alzheimer, potenziando la neurotrasmissione glutammatergica e riducendo il danno neuronale indotto dalla tossicità amiloide.(1) In ambito psichiatrico, ligandi come la fluvoxamina e la igmesine mostrano potenzialità come antidepressivi e strumenti per mitigare i deficit cognitivi nella schizofrenia.(1) Ulteriori applicazioni riguardano la neuroprotezione post-ictus, dove l'attivazione del recettore riduce il volume dell'infarto e la produzione di ossido nitrico.(1) La ricerca evidenzia inoltre un ruolo cruciale nella gestione del dolore neuropatico e delle dipendenze da sostanze come la cocaina, dove l'antagonismo sigma-1 attenua i comportamenti di ricerca dello stupefacente.(1) Parallelamente, il sottotipo sigma-2 riveste un ruolo strategico in oncologia. Grazie alla sua elevata espressione nelle cellule neoplastiche, esso agisce come biomarcatore dello stato proliferativo, mentre i suoi agonisti sono in grado di innescare l'apoptosi e l'autofagia selettiva dei tessuti tumorali.(5) L'inibizione della funzione del sigma-1 in specifiche linee cellulari maligne compromette ulteriormente la sopravvivenza cellulare, aprendo la strada a nuove terapie antitumorali mirate.(1)

**1.1.4 interazione con SRL.** L'interazione tra il sistema recettoriale sigma e la molecola 6-[4-(4-benzilpiperidin-1-il)butan-2-il]naftalen-2-olo, abbreviato come Ligando del Recettore sigma (Sigma Receptor Ligand, SRL), rappresenta un avanzamento cruciale nella progettazione di nuovi modulatori "pan-sigma".(9) Attraverso studi di modellistica molecolare, è stato dimostrato che questo ligando si ancora stabilmente al sito di legame del sottotipo sigma-1 stabilendo un ponte salino fondamentale tra l'atomo di azoto basico della piperidina e il residuo acido Asp126.(9) La stabilità del complesso è ulteriormente garantita dall'inserimento della porzione alifatica e dell'anello benzilico in una tasca idrofobica costituita dai residui Ile128, Phe133 e Tyr173, mentre il nucleo naftalenico instaura interazioni di tipo  $\pi$  con i residui Arg119 e Trp121.(9)

Dal punto di vista terapeutico, SRL si è dimostrato un efficace agente citotossico in grado di colpire diverse linee cellulari tumorali umane, tra cui quelle del seno, della prostata, del pancreas e del glioblastoma.(9) La sua attività si esplica attraverso l'induzione della morte cellulare programmata per apoptosi, un processo mediato dall'attivazione delle caspasi.(9) È

interessante notare come l'efficacia di questa molecola venga drasticamente potenziata in condizioni di stress cellulare o privazione di nutrienti, suggerendo una selettività d'azione verso le cellule neoplastiche caratterizzate da un elevato tasso proliferativo e da un microambiente metabolicamente ostile.(9) Grazie a queste proprietà, SRL non solo agisce come un potente strumento farmacologico per lo studio dei recettori sigma, ma si pone come un promettente candidato per lo sviluppo di nuove strategie chemioterapiche mirate.(9)



**Figure 4.** Interazione tra sigma-1 e SRL. ((9) Fig.3)

## 1.2 MECCANISMI DI FOTOATTIVAZIONE

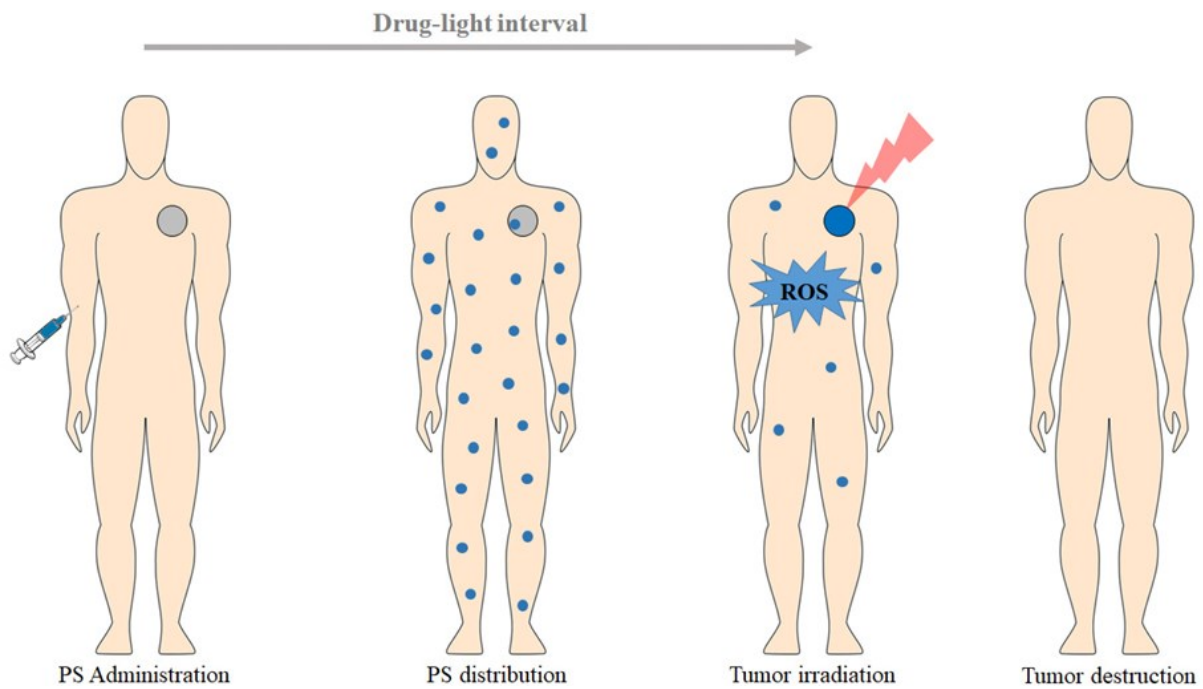
Negli ultimi decenni, la farmacologia ha compiuto progressi significativi nello sviluppo di molecole terapeutiche sempre più efficaci e selettive. Nonostante ciò, uno dei problemi fondamentali che continua ad affliggere la terapia farmacologica moderna è la mancanza di un preciso controllo spaziotemporale dell'azione dei farmaci. La distribuzione sistemica dei principi attivi nell'organismo può, infatti, determinare effetti avversi in tessuti e organi non coinvolti dalla patologia, limitando sensibilmente la finestra terapeutica e la qualità di vita dei pazienti.

Questo è specialmente vero nella branca della Oncologia. La patologia tumorale è formata da cellule dell'organismo a riproduzione incontrollata e riconosciute dall'organismo come self. Questo rende il targeting delle molecole farmacologiche fondamentale e al tempo stesso estremamente complesso. La cellula tumorale presenta alcuni aspetti peculiari e al contempo molti aspetti comuni alla cellula sana, questo implica che una molecola che attacca una cellula tumorale molto probabilmente attaccherà anche una cellula sana, una delle strategie che si applica per ovviare a questo problema è quella di attaccare componenti, come le proteine, iperespresse a livello della cellula tumorale, in modo che la molecola attacchi in maniera quantitativa la cellula tumorale e in minor parte la cellula sana, ma anche questo approccio non elimina il problema degli effetti collaterali indesiderati. In questo contesto, la fotofarmacologia si è affermata come una disciplina emergente e promettente, che mira a risolvere queste criticità attraverso l'impiego della luce come elemento di controllo esterno dell'attività farmacologica. La fotofarmacologia si colloca all'intersezione tra la farmacologia, la fotochimica e la fotobiologia. Il suo principio fondante consiste nell'incorporare unità fotoreattive, denominate fotointerruttori molecolari (molecular photoswitches), all'interno della struttura chimica di molecole biologicamente attive, in modo da rendere la loro potenza modulabile mediante irradiazione con luce di opportuna lunghezza d'onda ( $\lambda$ ). L'utilizzo della luce come stimolo esterno offre vantaggi unici: essa può essere erogata con elevata precisione spaziale e temporale, non è invasiva, non provoca accumulo di residui farmacologicamente attivi nell'ambiente e, a differenza di altri approcci come l'optogenetica, non richiede la manipolazione genica dei tessuti bersaglio. Secondo la classificazione attualmente più diffusa in letteratura, le principali modalità di fotoattivazione utilizzate in ambito farmacologico possono essere ricondotte a tre grandi categorie: (a) la terapia fotodinamica (photodynamic therapy, PDT), (b) il photocaging, il photoswitching. La terapia fotodinamica PDT si basa sull'utilizzo di specie reattive dell'ossigeno ROS. Le Ros

sono molecole instabili derivate dall'ossigeno, altamente reattive e capaci di causare stress ossidativo e, se superano la capacità di riduzione della cellula, danni cellulari. Queste possono formarsi a seguito dell'irraggiamento tramite luce visibile delle molecole di ossigeno. Il razionale è quello di attivare Ros tramite irraggiamento mirato e specifico sul tessuto bersaglio in modo da causare sufficiente danno da portare alla morte cellulare. L'aspecificità di questo metodo porta però a una resilienza nel suo utilizzo, dal momento che le ROS hanno un approccio non selettivo sui tessuti in cui vengono generati.

**1.2.1 Terapia fotodinamica.** La terapia fotodinamica o photodynamic therapy (PDT) rappresenta una modalità terapeutica minimamente invasiva e approvata clinicamente, che si fonda sull'interazione sinergica tra un agente fotosensibilizzante, l'irradiazione luminosa a una specifica lunghezza d'onda e l'ossigeno molecolare. Il processo ha inizio con la somministrazione di un fotosensibilizzante (PS) che si accumula preferenzialmente nel tessuto bersaglio, seguita da un intervallo di tempo chiamato intervallo farmaco-luce necessario per la distribuzione ottimale del composto.<sup>(11)</sup> L'attivazione del PS mediante la luce innesca una cascata biochimica che culmina nella generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), responsabili della citotossicità localizzata e della distruzione del tessuto patologico.<sup>(10)</sup> A livello molecolare, l'assorbimento dei fotoni promuove il fotosensibilizzante dal suo stato fondamentale a uno stato singoletto eccitato di breve durata, che può evolvere verso uno stato tripletto più stabile attraverso un processo di intersystem crossing.<sup>(10)</sup> Da questo stato tripletto, la reazione può seguire due percorsi distinti: la reazione di Tipo I, che genera radicali liberi tramite trasferimento di elettroni o atomi di idrogeno, e la reazione di Tipo II, considerata predominante nella PDT, che prevede il trasferimento diretto di energia all'ossigeno molecolare per produrre ossigeno singoletto altamente reattivo.<sup>(10)</sup> Poiché l'ossigeno singoletto possiede una vita media estremamente breve e un raggio d'azione limitato a poche decine di nanometri, il danno cellulare rimane confinato alle immediate vicinanze del sito in cui il PS è localizzato, garantendo un'elevata selettività spaziale.<sup>(10)</sup> Le sorgenti luminose impiegate nella pratica clinica variano dai laser ai diodi a emissione luminosa (LED), con una preferenza per la "finestra fototerapeutica" compresa tra 600 e 850 nm al fine di massimizzare la penetrazione nei tessuti biologici evitando l'assorbimento della luce da parte delle biomolecole presenti. Clinicamente, la PDT trova applicazione nel trattamento di diverse neoplasie, tra cui tumori cutanei non-melanoma, carcinoma esofageo, polmonare e vescicale, oltre ad applicazioni non oncologiche come la cheratosi attinica, l'acne e la degenerazione maculare senile.<sup>(10)</sup> Nonostante i significativi vantaggi, quali l'assenza di resistenza acquisita e i risultati estetici

eccellenti, la metodica presenta limitazioni legate alla scarsa penetrazione della luce visibile nei tessuti profondi e alla necessità per i pazienti di evitare la luce solare diretta per prevenire fenomeni di fotosensibilità cutanea post-trattamento. (10)

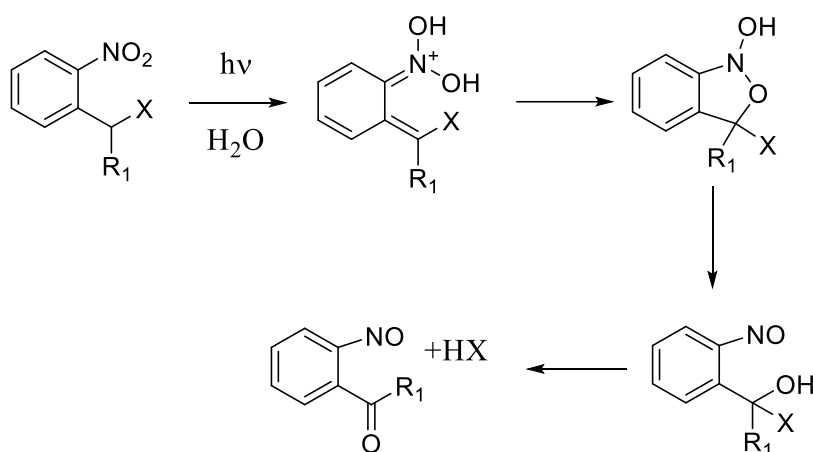


**Figure 5.** Meccanismo d'azione del'agente fotosensibilizzante durante il trattamento PDT.(12)

**1.2.2 Photocaging.** Il photocaging, noto anche come attivazione fotochimica irreversibile, costituisce una metodologia cardine della fotofarmacologia volta a ottenere un controllo spaziotemporale senza precedenti sulla bioattività molecolare.(11) Questa tecnica si basa sull'impiego di gruppi protettori fotolabili (PPG), definiti comunemente "cages", che vengono legati covalentemente a un farmaco o a un ligando biologico per mascherarne i farmacofori essenziali, rendendo la molecola temporaneamente inerte.(11) L'attivazione terapeutica avviene mediante l'irradiazione con luce a una specifica lunghezza d'onda, la quale innesca una reazione di fotolisi che scinde il legame tra il cage e il ligando, ripristinando la potenza biologica del composto originale in situ.(12) A differenza dei Photoswitch molecolari che operano in modo reversibile, il photocaging è intrinsecamente unidirezionale: una volta rimosso il gruppo protettore attraverso la luce, la molecola madre viene rilasciata permanentemente.(12)

Lo sviluppo di PPG efficienti deve soddisfare requisiti rigorosi, tra cui la stabilità in assenza di

irradiazione, la solubilità in mezzi acquosi e l'assenza di tossicità sia per il composto protetto che per i sottoprodotti della fotolisi.(13) Sebbene i derivati dell'o-nitrobenzile (oNB) rappresentino lo standard storico, la necessità di utilizzare radiazioni ultraviolette (UV) ne limita l'impiego clinico a causa della scarsa penetrazione nei tessuti e del potenziale danno cellulare.(14) Di conseguenza, la ricerca contemporanea si è orientata verso cromofori sensibili alla luce visibile e nel vicino infrarosso (NIR), come i derivati delle cumarine, dei BODIPY e delle cianine.(14) Questi sistemi avanzati consentono di operare all'interno della finestra terapeutica (600-900 nm), dove l'assorbimento da parte di biomolecole endogene è minimo, permettendo un'attivazione più profonda e sicura. (10)



**Figure 6.** Meccanismo di fotolisi dell'o-nitrobenzile ( $R_1 = H$ ) e del nitrofeniletile se ( $R_1 =$  metile)

Le applicazioni del photocaging spaziano dalla neurofisiologia, dove il rilascio di neurotrasmettitori come il glutammato permette di mappare la connettività sinaptica, alla chemioterapia fotoattivata (PACT) per il trattamento mirato dei tumori. Tecniche come l'eccitazione a due fotoni (2P) potenziano ulteriormente questa tecnologia, garantendo una precisione spaziale sub-micrometrica e una risoluzione dei microsecondi nell'attivazione di recettori specifici.

**1.2.3 Photoswitching** Il photoswitching molecolare rappresenta la capacità di una molecola di interconvertirsi reversibilmente tra due o più stati isomerici stabili o metastabili in risposta all'irradiazione luminosa.(12) Questo processo trasforma l'energia luminosa in segnali chimici o meccanici, inducendo variazioni significative nella geometria molecolare, nella

distribuzione di carica e nelle proprietà elettroniche del sistema. A differenza delle metodologie di photocaging, caratterizzate dal rilascio irreversibile di un ligando attivo, il photoswitching consente un controllo dinamico, ripetibile e bidirezionale della bioattività.(12)

I sistemi fotosensibili sono classificati in due categorie principali basate sulla stabilità termica dei loro isomeri.(12) Nei photoswitch di tipo T, come gli azobenzeni convenzionali, l'isomero metastabile generato dalla luce decade spontaneamente verso lo stato fondamentale in assenza di irradiazione, un processo guidato dalla barriera energetica del rilassamento termico.(12) Al contrario, i photoswitch di tipo P, quali i diarileteni e i fulgidi, sono caratterizzati da due isomeri termicamente stabili a temperatura ambiente, richiedendo lunghezze d'onda distinte per la conversione in entrambe le direzioni. (12)

Gli azobenzeni costituiscono la classe di photoswitch più impiegata in ambito biologico per la loro robustezza e facilità sintetica. L'isomerizzazione E-Z (trans-cis) induce un cambiamento strutturale radicale: la configurazione trans, planare e apolare, si contrae in una forma cis globulare e ripiegata, con una riduzione della distanza end-to-end da circa 9 Å a 5,5 Å.(15)(16) Tale transizione incrementa il momento di dipolo da 0 D a circa 3 D, influenzando significativamente la polarità e l'affinità di legame verso i bersagli proteici.(16) In ambiente acquoso, l'isomero cis può risultare fino a 40 volte più solubile rispetto alla forma trans.(12) Durante l'esposizione alla luce, il sistema raggiunge uno stato fotostazionario (PSS), ovvero un equilibrio dinamico tra gli isomeri la cui composizione dipende dalla lunghezza d'onda e dalla sovrapposizione degli spettri di assorbimento delle due forme.(12) Grazie alla intrinseca non linearità dei sistemi biologici, anche uno stato fotostazionario non quantitativo può innescare risposte funzionali marcate.(17)(18)

L'integrazione di questi strumenti in ambito terapeutico definisce la fotofarmacologia, che mira a controllare l'attività di farmaci mediante photoswitch(19)(20). Le strategie di progettazione includono l'azologizzazione, ovvero la sostituzione di motivi strutturali di un farmaco ("azostere") con analoghi azobenzenici, e l'azo-estensione.(21) I ligandi risultanti possono agire come molecole diffondibili (PCL) o essere ancorati covalentemente (PTL) in prossimità del sito di legame.(17) La sfida principale risiede nello spostamento dell'attivazione verso la finestra biologica del vicino infrarosso (600-900 nm), dove l'assorbimento endogeno è minimo, permettendo un'azione terapeutica profonda e sicura.(22)

## 1.3 PHOTOSWITCHES

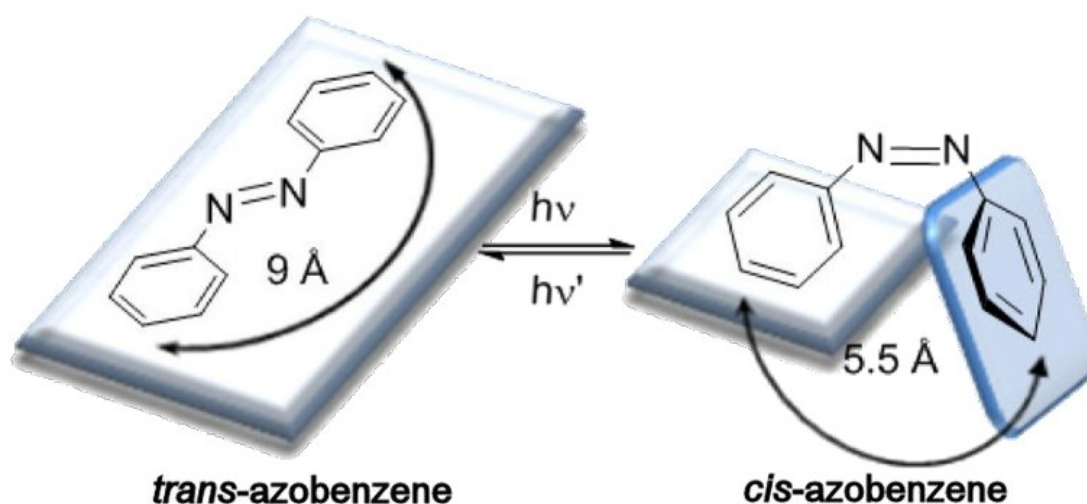
Questi sistemi molecolari sono composti organici capaci di interconvertire reversibilmente tra due o più stati isomerici stabili o metastabili in risposta all'assorbimento di fotoni.(12)(23) Tale trasformazione fotochimica induce modifiche profonde nella struttura e nelle proprietà elettroniche della molecola, permettendo di regolare l'attività biologica con elevata precisione spaziotemporale.(12)

Una classificazione fondamentale dei photoswitch si basa sulla stabilità termica dell'isomero generato dalla luce.(12) Nei sistemi definiti di tipo T (termici), l'isomero metastabile decade spontaneamente verso lo stato fondamentale in assenza di irradiazione, un processo caratterizzato da un'emivita termica che può variare da frazioni di secondo a diversi giorni.(12) Esempi classici sono gli azobenzeni e gli spiropirani.(12)(18) Al contrario, i photoswitch di tipo P (fotochimici) presentano due isomeri entrambi termicamente stabili, rendendo necessaria l'irradiazione a lunghezze d'onda distinte per la conversione in entrambe le direzioni.(12) A questa categoria appartengono i diarileteni e i fulgidi, apprezzati per la loro stabilità e resistenza alla fatica.(24) Meccanicisticamente, i photoswitch possono operare tramite isomerizzazione attorno a un doppio legame (C=C, C=N, o N=N) oppure attraverso reazioni elettrocicliche di chiusura e apertura d'anello. (12)

L'efficienza di un photoswitch è descritta da parametri quali lo stato fotostazionario (PSS), che definisce il rapporto tra gli isomeri all'equilibrio sotto una specifica luce, e la resa quantica, che misura l'efficacia della conversione per fotone assorbito.(12) La resistenza alla fatica, ovvero la capacità di sostenere numerosi cicli di commutazione senza subire degradazione chimica, è un requisito essenziale per le applicazioni tecnologiche e biomediche.(18)

**1.3.1 Azobenzeni.** Gli azobenzeni rappresentano una delle classi più studiate di photoswitch molecolari grazie alla loro stabilità chimica e alla predicibilità dei loro cambiamenti geometrici in risposta alla luce. (23) Strutturalmente, queste molecole sono costituite da due anelli fenilici uniti da un doppio legame azoto-azoto ( $-N=N-$ ), configurazione che permette l'esistenza di due isomeri geometrici distinti: la forma E (trans) e la forma Z (cis).(25) In condizioni ambientali, l'isomero E è generalmente la specie termodinamicamente più stabile, con un vantaggio energetico rispetto alla forma Z stimato tra le 10 e le 12 kcal/mol.(12) Dal punto di

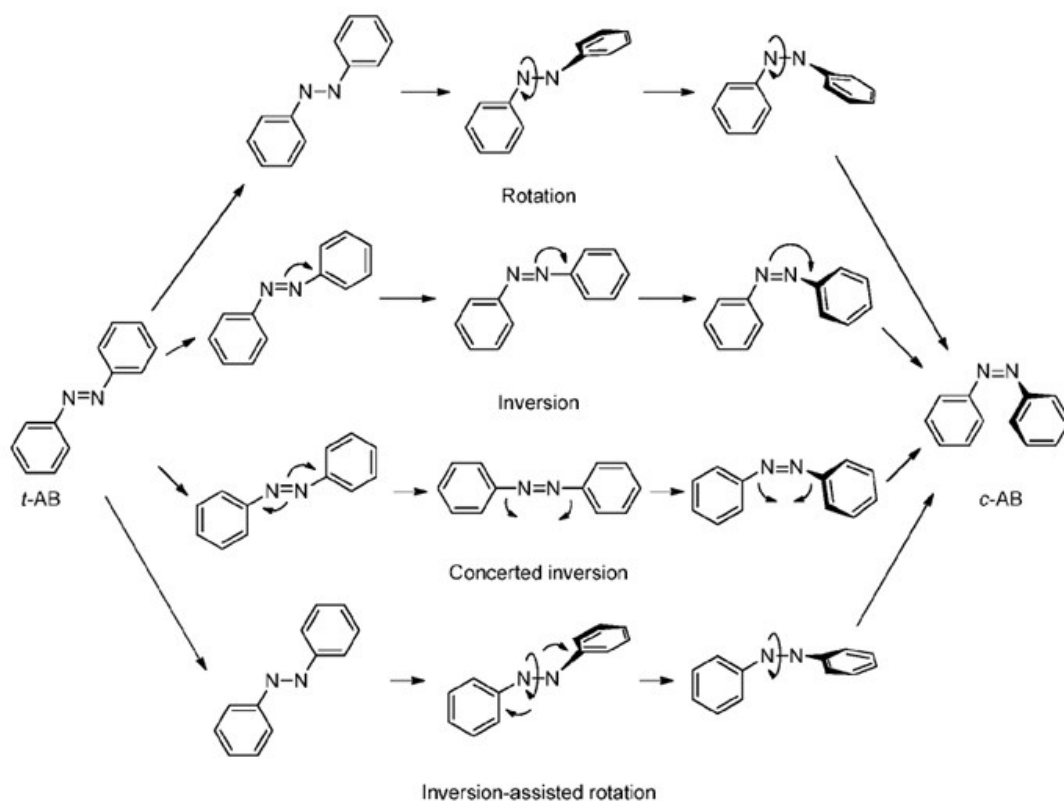
vista della geometria molecolare, l'isomero E si presenta quasi completamente planare e possiede un momento di dipolo nullo o trascurabile, mentre l'isomero Z assume una conformazione distorta o elicoidale a causa dell'ingombro sterico tra gli anelli arilici, acquisendo un momento di dipolo di circa 3 Debye.(12) Questo passaggio isomerico induce una drastica variazione nella distanza tra le estremità della molecola; la distanza tra le posizioni para degli anelli si contrae da circa 9.0 Å nella forma E a circa 5.5 Å nella forma Z.(16)



**Figure 7.** forme cis e trans dell'azobenzene. (26)

Le proprietà spettroscopiche degli azobenzene derivano dalle transizioni elettroniche dei doppi legami azoici e sono fondamentali per il loro funzionamento come interruttori ottici.(15)(16) Lo spettro di assorbimento dell'isomero E è tipicamente dominato da una banda intensa nella regione dell'ultravioletto, corrispondente alla transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$ , e da una banda più debole nella regione del visibile legata alla transizione  $n \rightarrow \pi^*$ , che risulta formalmente proibita per motivi di simmetria.(16) Al contrario, l'isomero Z mostra una transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$  meno intensa e spostata verso lunghezze d'onda più corte, mentre la sua banda  $n \rightarrow \pi^*$  nel visibile risulta più marcata rispetto a quella dell'isomero trans.(23) Sulla base della disposizione di queste bande e dell'effetto dei sostituenti, gli azobenzene vengono suddivisi in tre classi principali.(16) (26) La Classe I, o tipo azobenzene, comprende derivati simili al composto genitore con bande UV e visibili ben separate.(16)(26) La Classe II, o amminoazobenzene, presenta sostituenti

elettron-donatori in posizione ortho o para che spostano la banda  $\pi \rightarrow \pi^*$  verso il visibile, portandola a sovrapporsi parzialmente con la banda  $n \rightarrow \pi^*$ .(16)(26) Infine, la Classe III, o pseudostilbeni, include sistemi con sostituzione "push-pull" (un donatore e un accettore di elettroni alle estremità opposte) in cui le due bande sono quasi degeneri e situate interamente nel visibile.(26) Il cuore della funzionalità di questi composti risiede nel processo di fotoisomerizzazione, che può avvenire attraverso quattro percorsi molecolari distinti, a seconda di come variano gli angoli di legame e l'angolo diedro durante lo stato di transizione. (26)(19) Il primo meccanismo è la rotazione, che comporta la rottura del legame  $\pi$  per permettere la rotazione attorno al legame singolo N-N; durante questo processo, l'angolo diedro C-N-N-C cambia mentre gli angoli di legame N-N-C rimangono fissi a circa  $120^\circ$ . (16) Il secondo percorso è l'inversione, caratterizzato dall'aumento di uno degli angoli N-N-C fino a  $180^\circ$ , portando uno degli atomi di azoto a un'ibridazione sp nello stato di transizione, mentre l'angolo diedro rimane invariato a  $0^\circ$  o  $180^\circ$ . (25) Il terzo meccanismo, definito inversione concertata, prevede che entrambi gli angoli di legame N-N-C si aprano simultaneamente verso i  $180^\circ$ , creando uno stato di transizione lineare e apolare. (19) Infine, il quarto possibile meccanismo prevede la rotazione assistita dall'inversione, un meccanismo multidimensionale in cui avvengono variazioni simultanee e significative sia degli angoli di legame che dell'angolo diedro.(19)

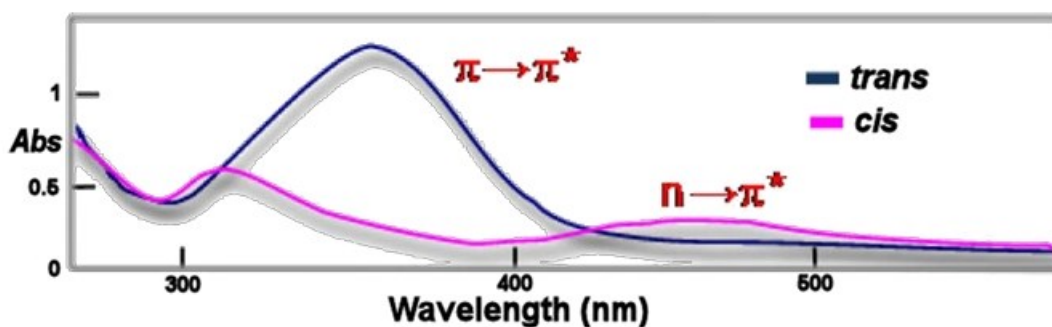


**Figure 8.** Meccanismi di isomerizzazione tran-cis degli azobenzeni. (26)

Questi percorsi non sono mutuamente esclusivi e la loro preferenza dipende dallo stato eccitato raggiunto ( $S_1$  o  $S_2$ ) e dai sostituenti presenti sulla struttura arilica.(26) Ad esempio, l'isomerizzazione termica dalla forma Z alla forma E avviene solitamente tramite il percorso di inversione, mentre la fotoisomerizzazione indotta dall'eccitazione della banda  $\pi \rightarrow \pi^*$  può coinvolgere meccanismi di rotazione o percorsi più complessi a seconda dei vincoli sterici imposti alla molecola.(19) La comprensione di questi meccanismi è essenziale per progettare nuovi derivati con proprietà ottimizzate, come i photoswitch attivati dalla luce visibile o quelli dotati di emivite termiche estremamente lunghe, aprendo la strada ad applicazioni avanzate come la conservazione dell'energia solare durante il processo di fotoattivazione. (23)

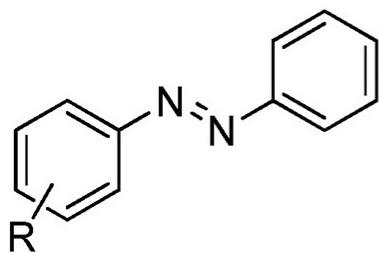
**1.3.2 Proprietà spettroscopiche dei composti appartenenti alla classe degli azobenzeni.** Le proprietà spettroscopiche dell'azobenzene sono definite da due transizioni elettroniche principali che ne caratterizzano il profilo di assorbimento.(26) L'isomero (E) è contraddistinto da una banda intensa nell'ultravioletto a circa 320 nm, associata alla transizione

$\pi \rightarrow \pi^*$  permessa per simmetria, e da una banda debole nel visibile (440–450 nm) dovuta alla transizione  $n \rightarrow \pi^*$ , formalmente proibita.(26) In seguito alla fotoisomerizzazione, l'isomero (Z) manifesta uno spostamento ipsocromatico della banda  $\pi \rightarrow \pi^*$  verso i 290 nm, con una contestuale riduzione dell'intensità.(25) Parallelamente, la transizione  $n \rightarrow \pi^*$  diviene parzialmente permessa, mostrando un incremento dell'assorbimento rispetto alla forma trans.(25) Queste divergenze spettrali risultano essenziali per monitorare il processo di photoswitching per via spettrofotometrica e per quantificare accuratamente la composizione della miscela molecolare al raggiungimento del fotoequilibrio stazionario. (23)



**Figure 9.** Spettro di assorbimento degli azobenzeni (16)

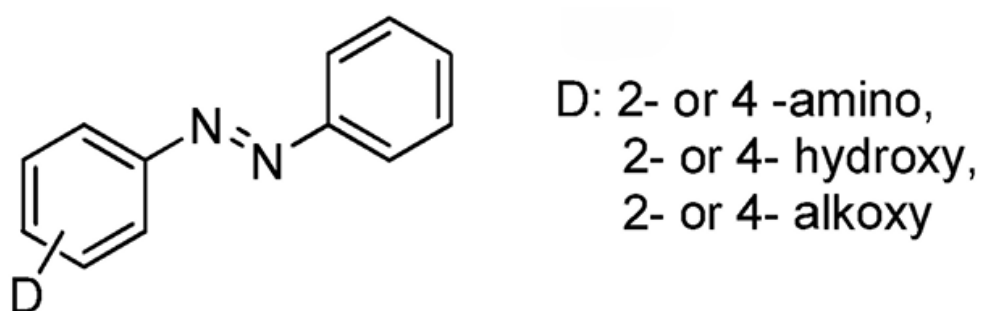
**1.3.3 Classificazione degli azobenzeni: Classi I,II e III** La Classe I, o tipo azobenzene, comprende molecole con proprietà analoghe al composto genitore, dove la banda  $\pi \rightarrow \pi^*$  risiede nell'ultravioletto ( $\lambda_{max} \sim 320$  nm) ed è nettamente separata dalla debole transizione  $n \rightarrow \pi^*$  nel visibile ( $\sim 440$ – $450$  nm).(23) Questa distinzione spettrale garantisce un'elevata efficienza nella fotoisomerizzazione bidirezionale e una notevole stabilità termica dell'isomero (Z), la cui emivita può estendersi per ore o giorni. (23)



R: alky, aryl, halide,  
keto, carboxylic acid, ester, amide,  
nitrile, nitro, 3-amino, 3-alkoxy

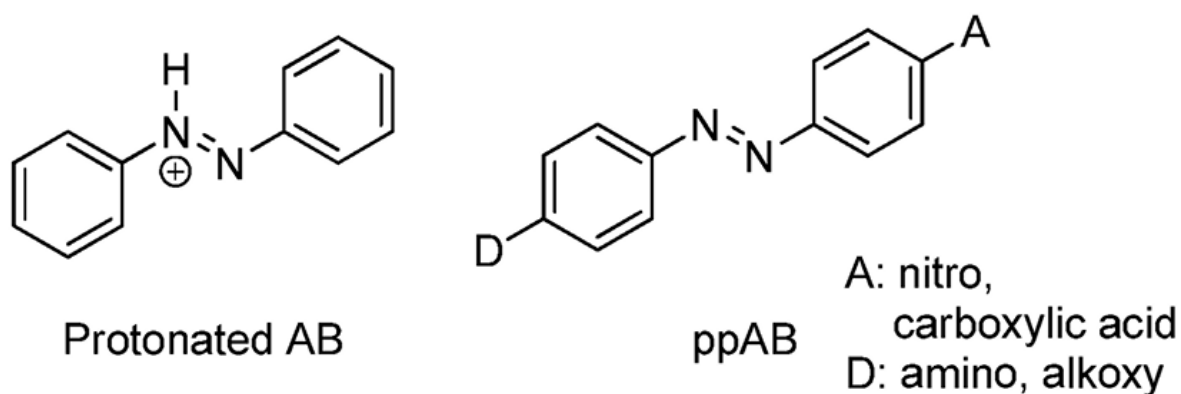
**Figure 10.** Azobenzeni di classe I (17)

Nella Classe II, definita dagli amminoazobenzeni, la presenza di sostituenti elettron-donatori, quali gruppi amminici NH<sub>2</sub>, NHR<sub>1</sub>, NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, in posizione para induce uno spostamento batocromatico della transizione  $\pi \rightarrow \pi^*$  (~430–460 nm), portandola a sovrapporsi alla banda  $n \rightarrow \pi^*$ .(26) Tale sovrapposizione riduce l'efficienza dello switching e accelera drasticamente il rilassamento termico verso la forma trans, con tempi di vita media compresi tra millisecondi e secondi.(26)



**Figure 11.** Azobenzene di classe II (17)

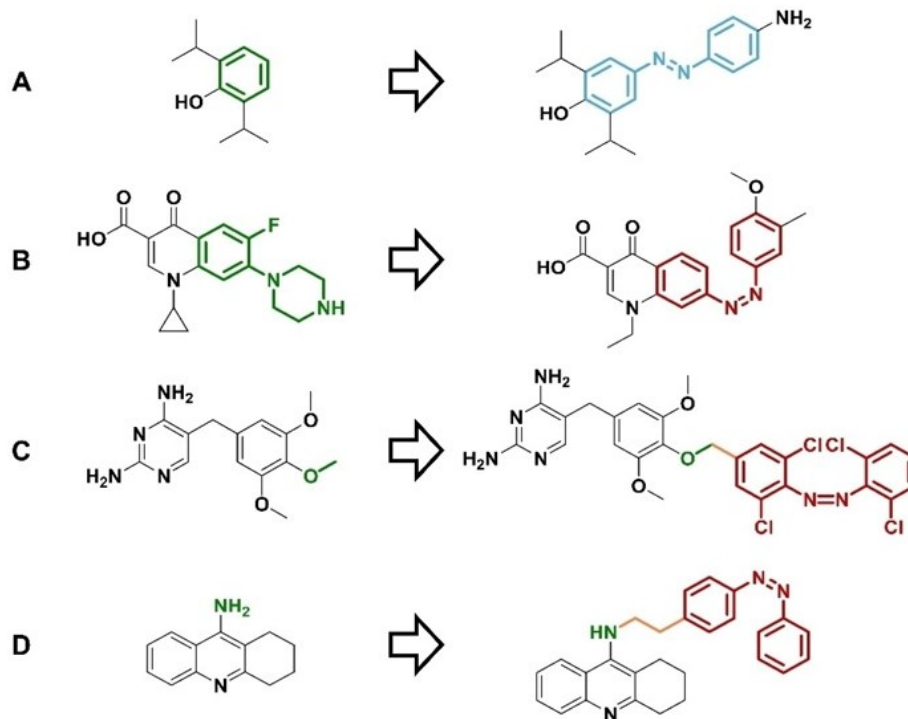
Infine, la Classe III comprende i sistemi push-pull o pseudostilbenici, caratterizzati dalla presenza simultanea di gruppi donatori forti come NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> e accettori forti come NO<sub>2</sub> o CN.(26) In questi composti, le transizioni diventano quasi degeneri e si spostano verso il rosso, con la banda  $n \rightarrow \pi^*$  che può raggiungere i 550 nm.(26) Nonostante cinetiche di rilassamento estremamente rapide (fino ai microsecondi), questi derivati permettono un controllo bidirezionale efficace utilizzando esclusivamente diverse lunghezze d'onda nel campo della luce visibile.(26)



**Figure 12.** Azobenzene di classe III. (17)

## 1.4 STRATEGIE DI DESIGN DEI NUOVI COMPOSTI

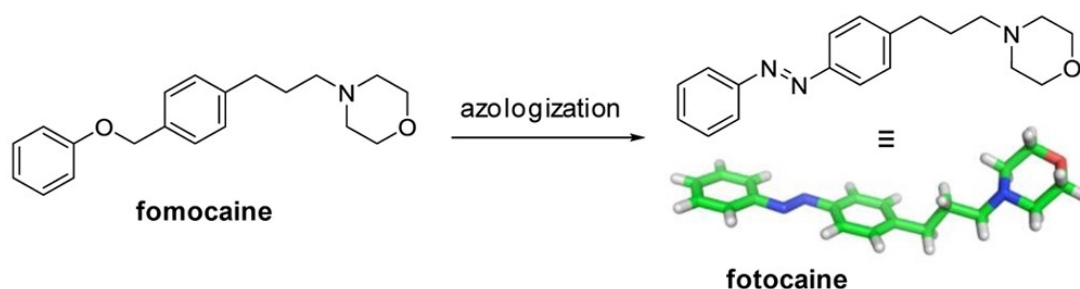
**1.4.1 Azo-estensione.** L'azo-estensione rappresenta una strategia fondamentale nel design fotofarmacologico, finalizzata a introdurre un controllo ottico in molecole bioattive mediante l'aggiunta di un'unità azobenzenica alla struttura portante.<sup>(27)</sup> Questo approccio sfrutta le conoscenze sulle relazioni struttura-attività (SAR) per individuare i siti molecolari che tollerano variazioni senza compromettere il legame con il bersaglio biologico.<sup>(27)(18)</sup> Si possono distinguere diverse metodologie principali: l'estensione bona fide, che espande un anello aromatico esistente senza eliminare sostituenti; l'estensione con rimozione di gruppi funzionali preesistenti; e la funzionalizzazione, in cui il photoswitch è collegato tramite un linker o un legame singolo.<sup>(27)</sup> A differenza dell'azologizzazione, l'azo-estensione rende meno prevedibile l'attività differenziale tra gli isomeri E e Z, rendendo talvolta necessario un processo di ottimizzazione empirica.<sup>(27)</sup> Tuttavia, tale tecnica ha consentito lo sviluppo di numerosi farmaci fotosensibili, inclusi derivati di anestetici e antibiotici come la ciprofloxacina (B figura 13), permettendo una modulazione precisa dell'attività biologica attraverso l'irraggiamento luminoso. <sup>(18)(27)</sup>



**Figure 13.** Esempi di azoestensione. A) Estensione Bona-fide. B) Estensione con rimozione di un sostituente sull'anello aromatico (ciprofloxacina). C) Funzionalizzazione diretta. D) Funzionalizzazione mediante un distanziatore (27)

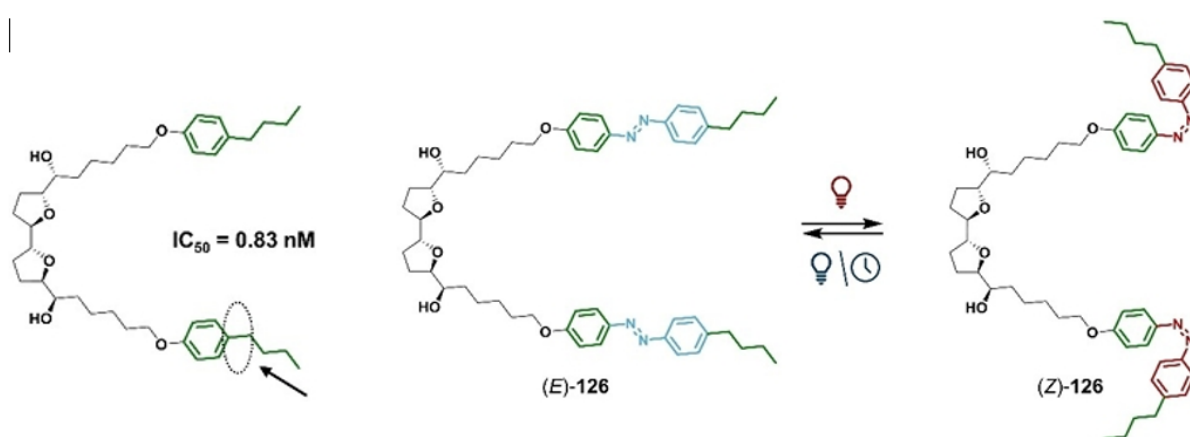
**1.4.2 Azologizzazione** L'azologizzazione rappresenta una raffinata strategia di design fotofarmacologico fondata sulla sostituzione bioisosterica di specifiche porzioni strutturali di un farmaco preesistente con un'unità azobenzenica. (18)(27) Questo approccio mira alla creazione di "azosteres", ovvero molecole che ricalcano fedelmente le dimensioni e la geometria del ligando originale, ma acquisiscono la capacità di variare la propria attività biologica in risposta all'isomerizzazione E-Z indotta dalla luce.(21) I bersagli molecolari ideali per tale trasformazione sono quelli che presentano due anelli aromatici collegati da linker a due atomi, come stilbeni, esteri diarilici o eteri benzil-fenilici.(27) L'esempio cardine è la fotocaina, ottenuta sistematicamente dall'anestetico locale fomocaine sostituendo il ponte etero CH<sub>2</sub>-O con il gruppo diazene N=N.(21) Tale modifica consente un controllo ottico preciso dei canali del sodio voltaggio-dipendenti (NaV): l'isomero trans, attivato dalla luce blu a 450 nm, agisce come un potente bloccante del canale inibendo i potenziali d'azione, mentre l'irraggiamento a 350 nm genera l'isomero cis, ripristinando la normale funzionalità neuronale.(21) La fotocaina

illustra come l'azologizzazione possa conferire fotoreversibilità alla molecola di partenza, pur mantenendone le proprietà farmacodinamiche.(21)



**Figure 13.** Azologizzazione della fomocaina in fotocaina. (21)

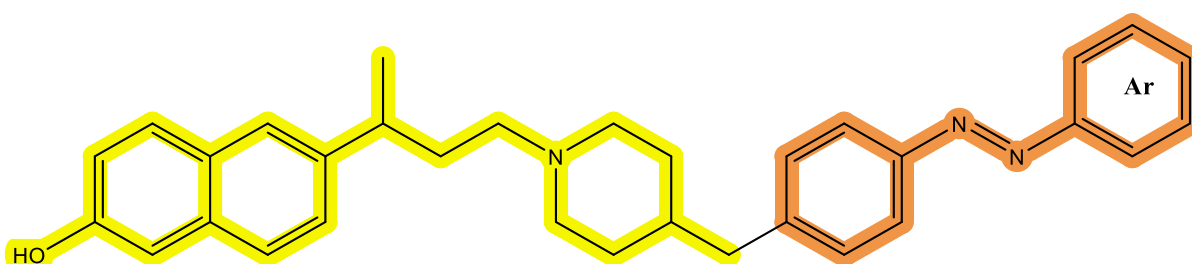
**1.4.3 Inserzione** L'inserzione rappresenta una strategia di design fotofarmacologico peculiare, definita come l'introduzione di un'unità azobenzenica tra due atomi di una molecola bioattiva preesistente.(27) A differenza dell'azologizzazione, questo approccio non comporta la sostituzione di frammenti strutturali, ma agisce come una sorta di "estensione interna" che preserva integralmente tutti gli atomi del ligando originale.(27) Un esempio rilevante è costituito dagli agonisti del canale TRPC3, in cui l'inserzione del photoswitch in una catena ha consentito di ottenere il controllo ottico del firing neuronale. mantenendo un'elevata fedeltà strutturale al lead originale.(27) Tale metodo offre una via sofisticata per convertire farmaci convenzionali in interruttori molecolari.



**Figure 14** Azoinsertione degli agonisti del canale TRPC3 (27)

## 2 SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro di tesi si colloca nel settore della fotofarmacologia applicata all'area oncologica e si pone come obiettivo principale la progettazione e la sintesi di nuovi ligandi "ibridi" fotoattivabili, diretti verso i recettori Sigma (SRs). Questi target rivestono un ruolo di primaria importanza in ambito neoplastico, in quanto risultano iperespressi in numerose linee cellulari tumorali umane agendo come biomarcatori dello stato proliferativo e mediatori dei processi di sopravvivenza cellulare (9).



**Figure 16.** Giallo: SRL sviluppato da MedchemLab. Arancione: scaffold fotosensibile

Il razionale del progetto risiede nella necessità di superare i limiti della chemioterapia convenzionale, spesso gravata da una scarsa selettività d'azione che determina severi effetti collaterali sistemici. L'approccio adottato mira a integrare la struttura di un ligando noto del recettore Sigma SRL, sviluppato dal MedChemLab (in giallo) con uno scaffold fotosensibile (in arancione) capace di subire una fotoisomerizzazione reversibile in risposta a stimoli luminosi esterni. Questa strategia, nata dalla collaborazione multidisciplinare tra il MedChemLab e il Photogreen Lab, intende ottenere sistemi molecolari la cui attività biologica possa essere modulata spazialmente e attivata in situ mediante irraggiamento a specifiche lunghezze d'onda (luce UV-Vis).

Nello specifico, l'attività sperimentale descritta in questo elaborato si è concentrata sul raggiungimento dei seguenti obiettivi:

1. Revisione della strategia sintetica del ligando SRL: a causa della necessità di inserire un gruppo nitro-aromatico sulla porzione piperidinica per la successiva costruzione del fotointerruttore, si è reso indispensabile sviluppare una nuova linea di sintesi. Tale via

prevede l'impiego della benzilpiperidina come primer, in sostituzione della 4-metilpiperidina originariamente utilizzata.

2. Sintesi e caratterizzazione degli intermedi delle serie: il lavoro ha previsto la preparazione sistematica di una serie di precursori funzionalizzati, gestendo le criticità legate alla nitratura selettiva in posizione para dell'anello aromatico e alla protezione dell'azoto piperidinico.
3. Ottimizzazione della porzione naftalenica e reazione di coupling: è stata perseguita la protezione della funzione alcolica del naftolo per consentire l'unione dei due frammenti principali del ligando tramite la formazione di un reattivo di Grignard, portando all'ottenimento di un intermedio avanzato.
4. Valutazione preliminare della foto-responsività: il progetto ambisce alla creazione di molecole in grado di interconvertire reversibilmente tra la forma (E) e la forma (Z), ponendo le basi per lo studio della differente affinità biologica delle due isoforme verso il recettore target.

In conclusione, la ricerca si prefigge di validare una metodologia sintetica efficiente per l'ottenimento di derivati del recettore Sigma che possano fungere da "interruttori molecolari", aprendo nuove prospettive per trattamenti chemioterapici mirati e controllabili esternamente tramite la luce.

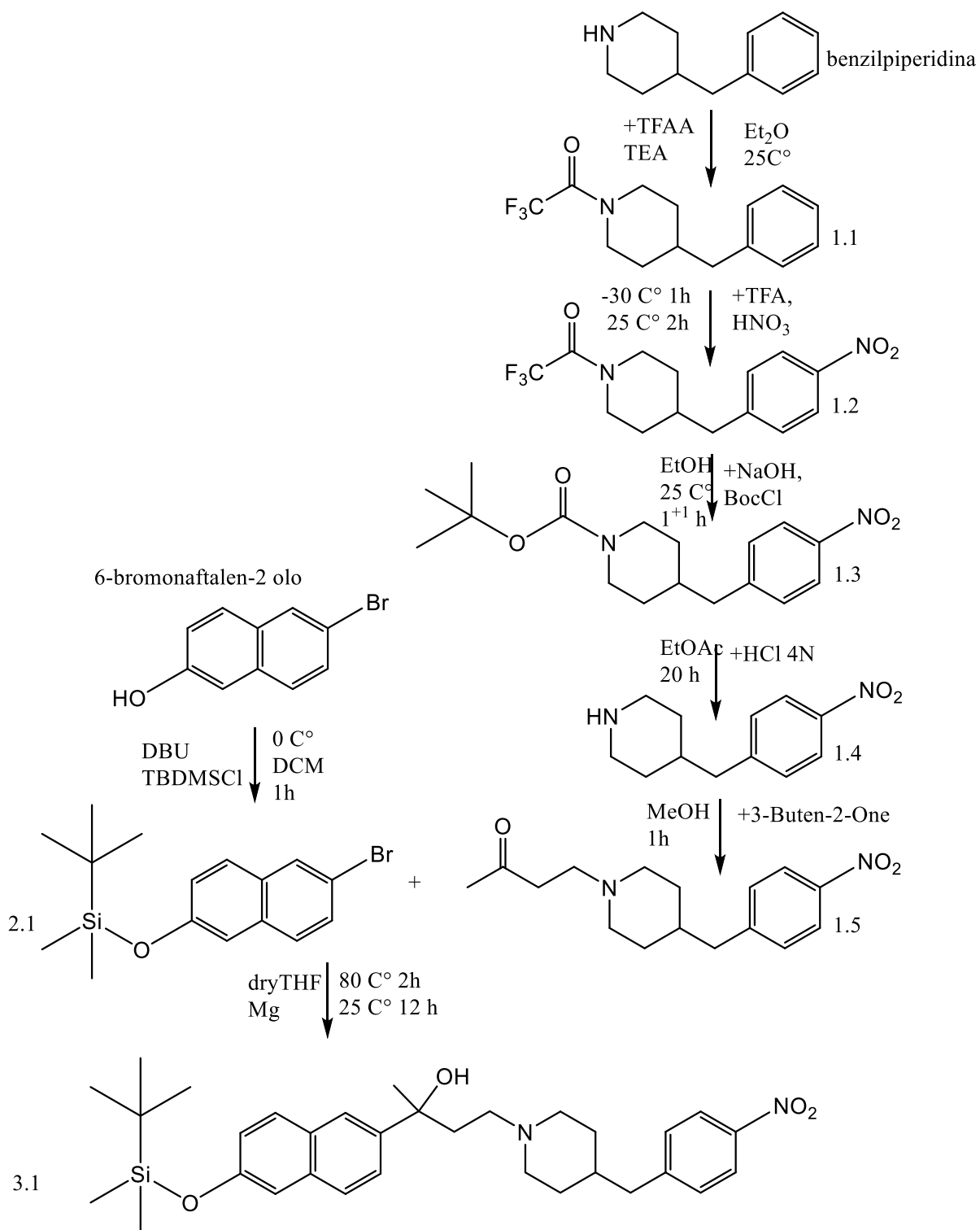
### 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

La nuova strategia sintetica implementata si differenzia dalla linea classica per l'impiego della benzilpiperidina come primer in sostituzione della 4-metilpiperidina. Questa scelta è stata dettata dalla necessità di operare una nitratura aromatica selettiva in posizione para, che costituirà il punto di ancoraggio per l'estensione del photoswitch.

Al fine di garantire una trattazione chiara e sistematica del lavoro svolto, la discussione dei risultati è stata suddivisa in tre linee sintetiche principali, identificate dalla nomenclatura numerica progressiva puntata 1.1-1.5, 2.1, 3.1:

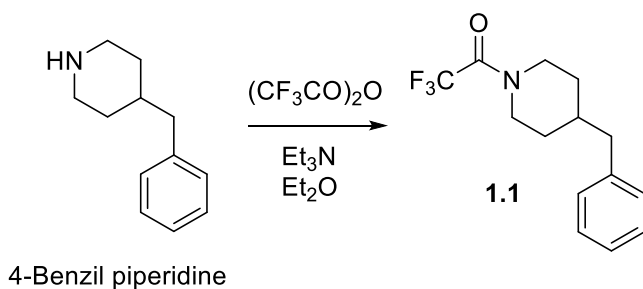
- Serie 1.1 – 1.5: riguarda la protezione, la nitratura e la successiva funzionalizzazione della porzione piperidinica con l'inserimento del ponte chetonico mediante l'attacco del 3-buten-2-one.
- Serie 2.1: comprende la fase di protezione della porzione naftalenica (6-bromonaftalen-2-olo), necessaria per il successivo accoppiamento.
- Serie 3.1 e successivi: descrive l'unione dei due frammenti principali attraverso la formazione di un reattivo di Grignard e le successive modifiche strutturali volte all'ottenimento del ligando ibrido finale.

Di seguito verranno analizzati nel dettaglio i singoli passaggi chimici, le condizioni di reazione ottimizzate e le principali criticità operative riscontrate durante il percorso sintetico, partendo dalla preparazione dell'intermedio protetto 1.1.



**Figure 17.** Intera linea sintetica seguita.

## COMPOSTO 1.1



Il percorso sintetico per l'ottenimento del ligando ibrido ha avuto inizio con la funzionalizzazione della 4-benzilpiperidina, scelta come primer per consentire la seguente introduzione di un gruppo nitro sull'anello aromatico. Poiché la reazione di nitratura non è intrinsecamente sito-specifica e l'azoto amminico della piperidina risulta altamente reattivo, è stato fondamentale un passaggio preliminare di protezione per evitarne l'ossidazione del gruppo amminico o l'interazione con l'elettrofilo nitrante. (28)

A tale scopo è stata selezionata l'anidride trifluoroacetica (TFAA) come agente protettore, in grado di reagire selettivamente con l'ammina secondaria per formare la corrispondente trifluoroacetammide (1.1).(28) La reazione è stata condotta a una temperatura di 0°C, mantenuta mediante un bagno di ghiaccio tritato, utilizzando il dietilere come solvente di reazione. (28)

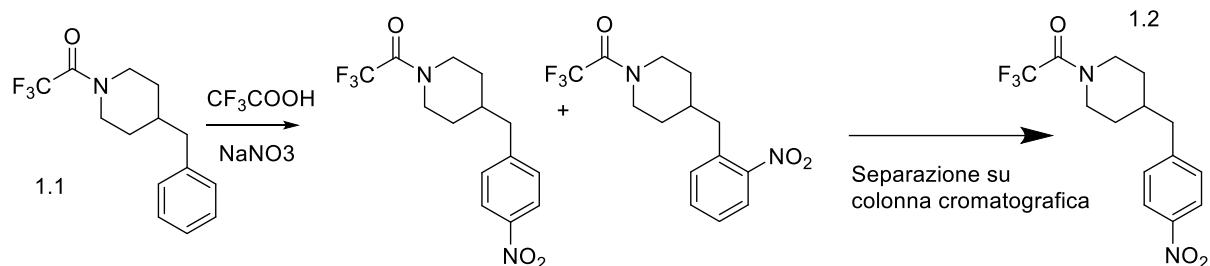
Un elemento critico di questo passaggio è stato l'impiego della trietilammina (TEA). Durante l'attacco nucleofilo dell'azoto piperidinico sull'anidride, si libera infatti acido trifluoroacetico (TFA) come sottoprodotto; in assenza di una base, il TFA andrebbe a protonare le molecole ancora libere, rendendole nucleofili inerti e bloccando di fatto la progressione della sintesi.(28)(29) La trietilammina agisce come agente tamponante nei confronti dell'acido trifluoroacetico formato, garantendo il mantenimento della piperidina in forma di base libera e permettendo alla reazione di procedere fino a completezza. (28)(29)

Il monitoraggio del processo è stato eseguito tramite cromatografia su strato sottile (TLC) utilizzando una miscela di eluizione Esano:Etilacetato (9:1). Una volta verificata la scomparsa del materiale di partenza dopo circa due ore, la miscela è stata opportunamente trattata. La

reazione è stata "spenta" (quenched) con l'aggiunta di HCl aq 0,1 M.(28) Si è proceduto con l'estrazione della fase acquosa mediante dietilere, riunendo le fasi organiche e lavandole con acqua per allontanare i residui salini.(28) La soluzione organica è stata anidrificata con solfato di sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrata e concentrata, prima al Rotavapor e successivamente mediante sistema Schlenk per eliminare le ultime tracce di solvente. (28)

L'intermedio 1-(4-benzilpiperidin-1-il)-2,2,2-trifluoroetan-1-one (1.1) è stato ottenuto come prodotto puro con una resa pari al 92%, fornendo la base necessaria per la successiva fase di nitratura aromatica.

## COMPOSTO 1.2



Il passaggio successivo della strategia sintetica ha riguardato l'introduzione del gruppo nitro (NO<sub>2</sub>) in posizione para sull'anello aromatico dell'intermedio protetto 1.1. Questa tappa riveste un'importanza fondamentale nell'economia del progetto, poiché la funzione nitrica costituisce il punto in cui verrà coniugato il photoswitch..

La reazione di nitratura è stata condotta impiegando una variante della miscela solfonitrica tradizionalmente impiegata per reazioni di nitratura, con l'acido trifluoroacetico (TFA) utilizzato in alternativa al solforico. L'impiego del TFA risulta particolarmente vantaggioso in questa fase per diversi motivi tecnici: agisce come un ottimo solvente per l'intermedio 1.1 e favorisce la generazione in situ dello ione nitronio (NO<sub>2</sub><sup>+</sup>) l'elettrofilo attivo della reazione. (30)

Per gestire l'esotermicità del processo e rendere la reazione più sito specifica possibile, l'ambiente di reazione è stato inizialmente mantenuto a una temperatura di -30°C mediante l'uso di un bagno criogenico composto da ghiaccio tritato e cloruro di calcio. La miscela è stata lasciata reagire sotto refrigerazione per un'ora, è poi stata portata a temperatura ambiente (25°C) per ulteriori due ore. (30)

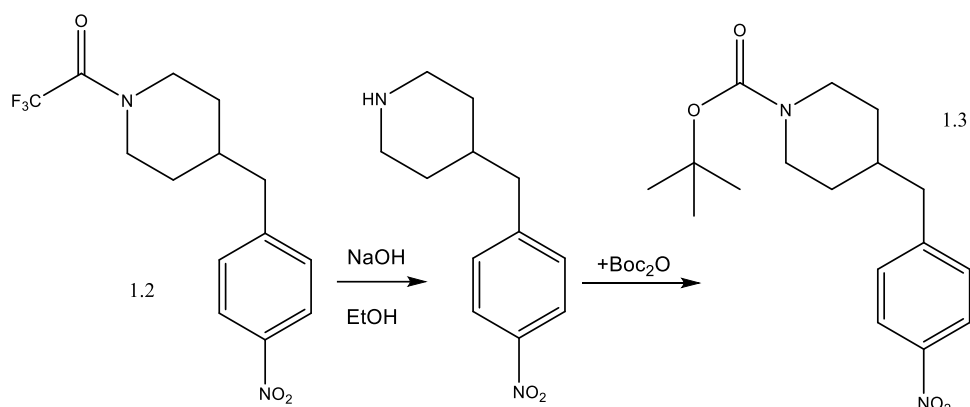
Il monitoraggio del processo è stato eseguito tramite cromatografia su strato sottile (TLC, miscela Esano/Etilacetato 9:1). Le analisi spettroscopiche NMR condotte hanno evidenziato una criticità tipica delle nitrature su sistemi benzilici: la formazione di una miscela di isomeri. Sebbene la posizione para risulti favorita per motivi sterici e cinetici, è stata rilevata la presenza del sottoprodotto nitrato in posizione orto, rendendo indispensabile un intervento di purificazione rigoroso. (30)

Il trattamento finale (work-up) della reazione ha previsto i seguenti passaggi: Il quenching della miscela acida mediante versamento in un becher contenente acqua e ghiaccio

tritato. La neutralizzazione del sistema fino a pH 8 attraverso l'aggiunta di bicarbonato di sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ). L'estrazione della fase acquosa con etilacetato (tre cicli), seguita dal lavaggio della fase organica con acqua e anidificazione con solfato di sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). (30)

Il prodotto grezzo è stato infine purificato mediante Pressurised/performance liquid Chromatography PLC automatizzata (sistema Isolera). Questa tecnica ha permesso di isolare l'isomero d'interesse, il 2,2,2-trifluoro-1-(4-(4-nitrobenzil)piperidin-1-il)etan-1-one (**1.2**), con una resa finale del 45%. Nonostante la resa sia stata influenzata dalla separazione dell'isomero orto, la purezza del composto ottenuto ha fornito la base necessaria alle successive tappe di deprotezione dell'azoto piperidinico.

### COMPOSTO 1.3



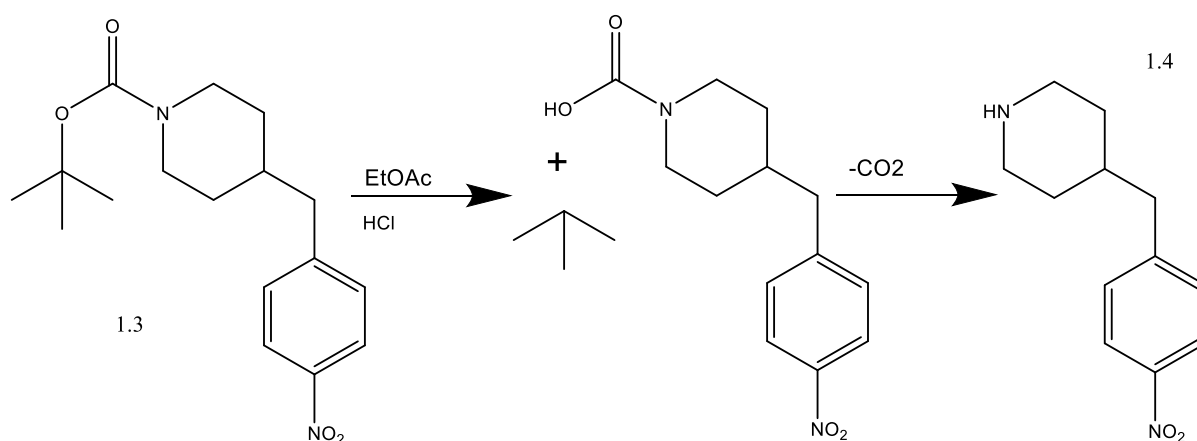
Una volta isolato l'intermedio nitrato 1.2, la strategia sintetica ha previsto la rimozione del gruppo trifluoroacetile dalla porzione piperidinica. Sebbene la protezione ammidica introdotta nel primo step fosse stata fondamentale per resistere alle condizioni drastiche della nitratura aromatica, essa risultava troppo stabile per le fasi successive del lavoro. Si è deciso pertanto di procedere a uno scambio di gruppi protettori, introducendo il ter-butilcarbossilato (Boc<sub>2</sub>O), una funzione carbammica che può essere rimossa in condizioni acide senza interferire con altre porzioni della molecola. (28)

La trasformazione è stata condotta con un approccio sequenziale in un unico pallone di reazione (one-pot). L'intermedio 1.2 è stato inizialmente solubilizzato in etanolo; per favorire la completa dissoluzione del materiale di partenza, si è fatto ricorso alla sonicazione, una tecnica che utilizza ultrasuoni per accelerare i processi di solubilizzazione attraverso effetti meccanici di dispersione(31)(32). Al sistema è stata quindi addizionata una soluzione acquosa di idrossido di sodio (NaOH) per favorire l'idrolisi basica del legame amidico (30). Dopo circa un'ora, è stato introdotto il ter-butildicarbonato (Boc<sub>2</sub>O). In ambiente basico, l'azoto piperidinico agisce come nucleofilo attaccando l'anidride organica per formare il nuovo carbammato protetto 1.3.(28) Il monitoraggio della reazione è stato eseguito tramite cromatografia su strato sottile (TLC, miscela Esano:Etilacetato 8:2), confermando il completamento dello scambio dopo 1 ora.

Il trattamento finale (work-up) ha previsto l'estrazione della miscela con etilacetato, seguita da lavaggi con acqua per rimuovere i residui di NaOH e i sottoprodotti salini. La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio, filtrata e concentrata, prima al Rotavapor e successivamente mediante sistema Schlenk. Il composto ter-butil 4-(4-nitrobenzil)piperidin-1-

carbossilato (1.3) è stato ottenuto come un liquido ambrato con una resa pari al 91%. L'efficienza di questo passaggio ha validato la scelta metodologica, fornendo una quantità adeguata di intermedio per la successiva fase di deprotezione acida volta alla liberazione definitiva dell'azoto amminico.

## COMPOSTO 1.4



Il percorso sintetico volto alla liberazione della funzione amminica piperidinica è proseguito con la rimozione del gruppo protettore ter-butilcarbossilato (BOC<sub>2</sub>), introdotto nel passaggio precedente per stabilizzare l'intermedio 1.3. Questa tappa è fondamentale per ripristinare la nucleofilia dell'azoto, condizione indispensabile per il successivo attacco al 3-buten-2-one e la conseguente formazione del ponte con l'unità naftalenica.(28)

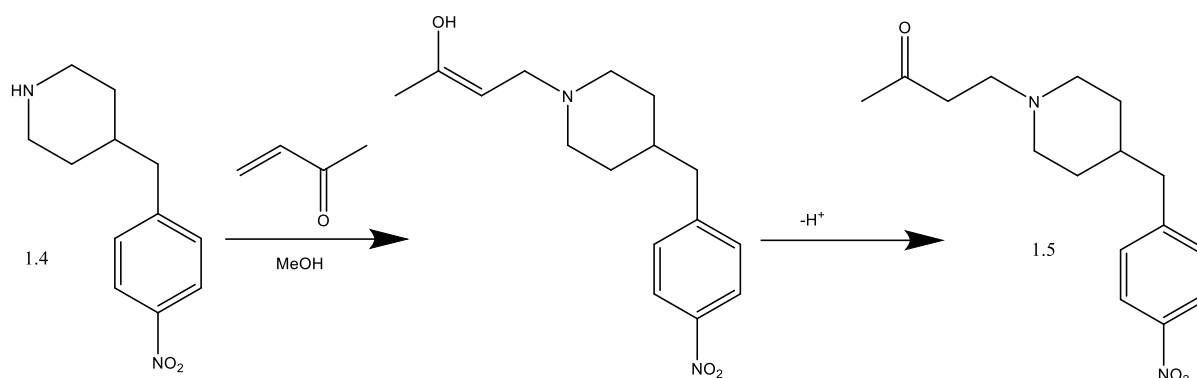
La reazione di deprotezione è stata allestita in un pallone ad un unico collo alla temperatura ambiente di 25 °C, solubilizzando l'intermedio 1.3 in etilacetato sotto agitazione magnetica. Come agente deprotettore è stato impiegato acido cloridrico (HCl) 4N, addizionato alla miscela per innescare la scissione selettiva del carbammato.(29)

Da un punto di vista meccanicistico, il processo avviene attraverso la protonazione dell'ossigeno del carbonile da parte dell'ambiente acido, un evento che indebolisce significativamente il legame carbonio-ossigeno. Questa destabilizzazione favorisce il distacco del carbocatione ter-butilico, portando alla formazione transitoria di un acido carbammico legato alla porzione piperidinica. Tale intermedio risulta intrinsecamente instabile e va incontro a una rapida decomposizione spontanea che libera anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), restituendo l'ammina secondaria desiderata. (31)

La reazione è stata condotta per un intervallo di 18 ore, monitorando la scomparsa del materiale di partenza tramite cromatografia su strato sottile (TLC) con una miscela di eluizione Esano:Etilacetato (8:2). Una volta verificata la completezza del processo, la miscela è stata concentrata sotto vuoto, impiegando dapprima il Rotavapor e per assicurare l'allontanamento dei residui acidi e del solvente.

Il trattamento finale ha previsto la triturazione del residuo con dietiletere (Et<sub>2</sub>O), una procedura che ha permesso di isolare il prodotto puro sotto forma di solido bianco. Dopo essere stato raccolto mediante filtrazione e lavato con ulteriore dietiletere, il composto 4-(4-nitrobenzil)piperidina (1.4) è stato essiccato sotto vuoto, fornendo una resa finale del 70,55%.

## COMPOSTO 1.5



Con l'ottenimento della benzilpiperidina nitrata in forma di base libera ( 1.4), la strategia sintetica è proseguita con l'introduzione di un frammento carbonioso funzionalizzato, necessario per stabilire il collegamento molecolare con l'unità naftalenica. Tale obiettivo è stato perseguito attraverso una reazione di addizione nucleofila nello specifico un'addizione di Michael impiegando il 3-buten-2-one come accettore.(33)(34)

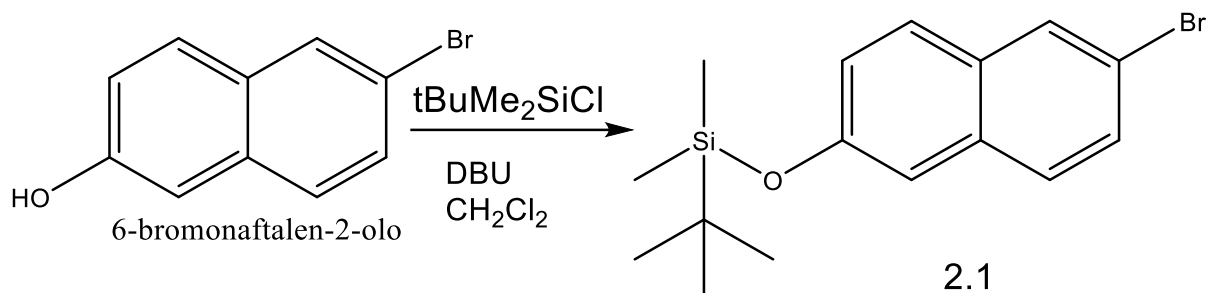
La procedura sperimentale ha previsto la solubilizzazione dell'intermedio 1.4 in metanolo (MeOH) sotto costante agitazione magnetica, seguita dall'aggiunta del reattivo carbonilico.(33) La scelta del metanolo come solvente di reazione ha rivestito un ruolo tecnico cruciale: Il metanolo ha avendo carattere anfiprotico favorisce la deprotonazione dell'azoto piperidinico (precedentemente salificato come cloridrato nello step di deprotezione BOC<sub>2</sub>), ripristinandone la piena nucleofilia.(35)

Dal punto di vista meccanicistico, il doppietto elettronico non condiviso dell'azoto piperidinico opera un attacco nucleofilo sul carbonio in posizione  $\beta$  del 3-buten-2-one.(33) Tale sito risulta particolarmente elettrofilo a causa della coniugazione del doppio legame con il gruppo carbonilico, che ne delocalizza la densità elettronica.(33) Il processo evolve attraverso la formazione di un intermedio enolato, il quale viene successivamente protonato dal solvente in posizione  $\alpha$ , mentre l'azoto perde un protone per ripristinare la neutralità elettrica della molecola.(36)

Il monitoraggio della reazione è stato effettuato dopo 50 minuti tramite cromatografia su strato sottile (TLC), impiegando una miscela eluente Diclorometano:Metanolo (9:1). Una volta verificata la completa trasformazione del materiale di partenza, il solvente è stato rimosso sotto vuoto. Il residuo è stato quindi ripreso con diclorometano (DCM) e nuovamente concentrato per assicurare l'allontanamento dei residui volatili. (33)

L'intermedio 4-(4-(4-nitrobenzil)piperidin-1-il)butan-2-one (1.5) è stato isolato sotto forma di polvere rosata con una resa pari al 93%. Il successo di questa fase ha permesso di completare la funzionalizzazione della serie 1.n, fornendo il partner elettrofilo necessario per la successiva reazione di coupling con il frammento naftalenico.

## COMPOSTO 2.1



Alla funzionalizzazione della porzione piperidinica, l'attività sperimentale si è concentrata sulla preparazione del secondo frammento strutturale necessario per la costruzione del ligando finale: il nucleo naftalenico. Il punto di partenza è stato il 6-bromonaphthalen-2-olo, una molecola bi-funzionalizzata che presenta un atomo di bromo e un ossidrilico fenolico.

Il design sintetico prevede che l'unione tra i due blocchi molecolari (la serie 1. e la serie 2.) avvenga attraverso la formazione di un legame carbonio-carbonio mediante un reattivo di Grignard. Tuttavia, la presenza del gruppo ossidrilico ( $-\text{OH}$ ) nel naftolo costituisce una criticità insormontabile per la stabilità dei composti organometallici: l'idrogeno fenolico, avendo un carattere acido, andrebbe a protonare istantaneamente il reattivo di Grignard non appena formato.<sup>(31)(35)</sup> Si è reso pertanto indispensabile un passaggio di protezione selettiva della porzione alcolica per mascherarne l'acidità e permettere la successiva attivazione del sito bromurato.

Per il raggiungimento di questo obiettivo, è stata selezionata la protezione sotto forma di etere silico, impiegando il ter-butildimetilsilano cloridrato (TBSCl).<sup>(35)</sup> Questa scelta garantisce una buona stabilità dell'intermedio durante le manipolazioni sintetiche e una facile rimozione del gruppo protettivo nelle fasi finali del progetto.<sup>(35)</sup>

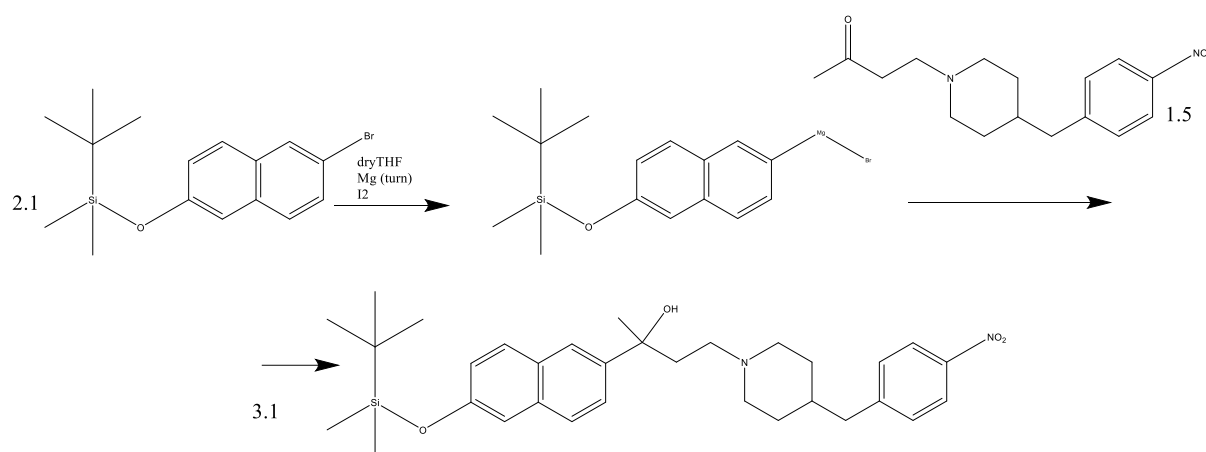
La procedura sperimentale ha previsto la solubilizzazione del 6-bromonaphthalen-2-olo in diclorometano (DCM) all'interno di un pallone a due colli equipaggiato con refrigerante a bolle. La miscela è stata raffreddata a  $0^\circ\text{C}$  mediante un bagno di ghiaccio per gestire l'esotermia del processo. Come agente deprotonante è stato impiegato l'1,8-diazobicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), una base organica molto forte e, aspetto fondamentale, non nucleofila.<sup>(35)</sup> L'aggiunta di DBU permette la formazione dell'alcolossido di naftolo, il quale agisce come nucleofilo

attaccando l'atomo di silicio del TBSCl con contestuale espulsione dello ione cloruro.(35)  
La reazione è stata monitorata tramite cromatografia su strato sottile (TLC) con miscela Esano:Etilacetato (95:5), verificando il completamento della trasformazione dopo circa 45 minuti.

Il trattamento finale ha previsto un quenching della reazione con una soluzione di bicarbonato di sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) fino a neutralità. L'estrazione della fase acquosa con diclorometano. L'anidificazione della fase organica con solfato di sodio, seguita da filtrazione e concentrazione sotto vuoto.

L'intermedio (6-bromonaphthalen-2-yl)(tert-butyl)dimethylsilane ( 2.1) è stato isolato come un solido marroncino con una resa del 78,55%. Il successo di questa protezione ha fornito il partner reattivo necessario per affrontare la fase cruciale del progetto: la reazione di coupling per l'unione dei due frammenti principali.

## COMPOSTO 3.1



Questa fase dell'attività sperimentale rappresenta il punto di unione delle due linee sintetiche precedentemente descritte. L'unità piperidinica funzionalizzata (Serie 1) e la porzione naftalenica opportunamente protetta (Serie 2) sono state unite tramite la formazione di un nuovo legame carbonio-carbonio, sfruttando la reattività di un reagente organometallico.(31)

Data l'alta reattività dei reattivi di Grignard; in particolare con umidità e ossigeno atmosferico, l'allestimento della reazione ha richiesto forte rigore procedurale; tutta la vetreria è stata preventivamente anidrificata in stufa overnight; il sistema di reazione — un pallone a tre colli equipaggiato con refrigerante a bolle e gocciolatore sifonato — è stato mantenuto sotto costante atmosfera inerte di azoto gassoso.(31)(37)

Il processo ha avuto inizio con la generazione del reattivo di Grignard a partire dall'intermedio 2.1. Il composto è stato solubilizzato in tetraidrofurano (THF) anidro, aggiungendo magnesio metallico triturato e una piccola quantità di iodio molecolare (I<sub>2</sub>) con funzione di iniziatore della reazione; la miscela è stata quindi riscaldata a 80°C per un'ora per favorire l'attivazione del magnesio.(31) Da un punto di vista chimico, in questa fase avviene l'inserimento ossidativo dell'atomo di magnesio nel legame carbonio-bromo dell'unità naftalenica.(31) Tale inserimento determina una completa inversione della polarità (umpolung) del carbonio arilico, il quale acquisisce una forte carica parziale negativa, trasformandosi in un nucleofilo forte.(31)

Una volta generata la specie organometallica, si è proceduto all'aggiunta goccia a goccia del partner elettrofilo, l'intermedio chetonico 1.5. Il carbonio carbonilico del chetone, caratterizzato da una parziale carica positiva, subisce l'attacco nucleofilo da parte del reattivo

di Grignard.(31)(37) Il processo evolve con la rottura del doppio legame C=O e la formazione transitoria di un alcossido di magnesio.(37) Dopo aver lasciato agire il sistema per due ore a riflusso e successivamente overnight a temperatura ambiente, il trattamento finale ha permesso la protonazione dell'ossigeno, portando alla formazione della funzione alcolica terziaria desiderata. (37)

Il monitoraggio del processo è stato eseguito tramite cromatografia su strato sottile (TLC) impiegando una miscela Diclorometano:Metanolo (9:1). L'intermedio 2-(6-(tert-butildimetilsilil)naftalen-2-il)-4-(4-(4-nitrobenzil)piperidin-1-il)butan-2-olo 3.1 costituisce il precursore del ligando target: l'avvenuto coupling conferma l'efficacia della strategia modulare adottata e permette di affrontare le fasi finali funzionalizzazione volte all'ottenimento del photoswitch definitivo.

## 4 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi si è inserito nell'ambito della fotofarmacologia applicata all'oncologia, focalizzandosi sulla progettazione e sulla sintesi di molecole fotoattivabili dirette contro i recettori Sigma (SRs), proteine iperesprese in diverse forme tumorali e coinvolte in diversi pathway biologici che regolano la vitalità e la proliferazione cellulare. L'obiettivo centrale della ricerca è stato lo sviluppo di ligandi "ibridi" capaci di coniugare l'attività biologica di un ligando noto di SR con uno scaffold fotosensibile in grado di subire una fotoisomerizzazione reversibile sotto irraggiamento a specifiche lunghezze d'onda.

Il progetto, nato dalla collaborazione tra il MedChemLab e il Photogreen Lab, si è posto il traguardo di ottenere sistemi molecolari la cui attività potesse essere modulata spazialmente e attivata in situ, limitando così gli effetti collaterali sistemici tipici delle chemioterapie convenzionali. Il raggiungimento di questo scopo ha richiesto una revisione sostanziale della linea sintetica classica del ligando di riferimento (SRL), portando allo sviluppo di una strategia in più fasi.

In particolare, l'attività sperimentale ha permesso di:

- Sviluppare una nuova linea di sintesi partendo dalla benzilpiperidina anziché dalla 4-metilpiperidina, gestendo criticità legate alla protezione dell'azoto piperidinico con anidride trifluoroacetica e successiva nitratura selettiva in posizione para.
- Sintetizzare con successo gli intermedi chiave della serie (da 1.1 a 1.5), portando alla formazione del ponte con l'unità naftalenica attraverso l'attacco del 3-buten-2-one.
- Ottimizzare la protezione della porzione alcolica del naftolo (2.1) e condurre la reazione di coupling tra i due frammenti principali attraverso l'impiego di un reagente di Grignard, portando all'unione delle molecole nell'intermedio 3.1.

Sebbene il lavoro svolto costituisca una solida base di partenza, i risultati ottenuti rappresentano l'inizio di un progetto di ricerca più ampio. La prosecuzione dell'attività prevede l'attuazione delle modifiche strutturali finali necessarie per raggiungere la molecola target definitiva: il 6-(4-(4-(4-nitrobenzil)piperidin-1-il)butan-2-il)naftalen-2-olo.

Nelle fasi successive, sarà fondamentale:

1. Condurre studi di affinità verso i target per identificare i photoswitch più promettenti in termini di interazione con i recettori Sigma.
2. Verificare sperimentalmente le proprietà di photoswitching delle molecole sintetizzate, valutando l'efficienza della conversione reversibile tra la forma (E) e la forma (Z).
3. Determinare l'effettiva capacità di modulazione dell'attività biologica in vitro, quantificando la differenza di potenza tra i due isomeri in modelli cellulari tumorali.

In conclusione, la strategia sintetica messa a punto ha dimostrato la fattibilità dell'integrazione di scaffold fotosensibili in strutture di ligandi Sigma, aprendo la strada a nuove possibilità terapeutiche nel trattamento mirato del cancro attraverso l'uso della luce come elemento di controllo esterno.

## 5 SEZIONE SPERIMENTALE

### Sintesi del composto 1-(4-Benzilpiperidina-1-yl)-2,2,2-trifluoroetan-1-one ( 1.1)

La reazione è stata allestita in un pallone a 2 colli in cui è stata solubilizzata la benzilpiperidina ( 5 mmol, 881 mg, 884 mL) in dietilere (5 mL), quindi è stata aggiunta la trietilammina (6 mmol, 1.5 equiv, 834 mL). Tramite imbuto gocciolatore, è stata aggiunta a piccole porzioni l'anidride trifluoroacetica 1,2 eq ( 6 mmol, 1.5 equiv., 834 mL). La reazione è stata lasciata sotto agitazione per un'ora a temperatura ambiente, e controllata tramite tlc (eluente: Esano/Etilacetato 9:1). La miscela è stata trattata con HCl 10%aq (2 mL), e la fase acquosa estratta con etil acetato (2 x 20 mL). Le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua. la fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata su filtro a pieghe, ed il solvente è stato evaporato per fornire il prodotto desiderato (olio giallo, resa: 92%)

### Sintesi del composto 2,2,2-trifluoro-1-(4-(4-nitrobenzil)piperidin-1-yl)ethan-1-one 1.2

La reazione è stata allestita in un pallone a 2 colli. L'ambiente di reazione è stato refrigerato tramite ghiaccio trito e soluzione acquosa di calcio cloruro a -30 C° e ricadere a bolle a cui è stato fissato un contabolle. E' stato solubilizzato 1.1 (6,58 gr 24,3 mmol) in acido trifluoroacetico ( 20 ml) aggiunto a piccole porzioni tramite imbuto gocciolatore. Una volta solubilizzato 1.1 è stato aggiunto a piccole porzioni Acido nitrico ( 29 mmol, 2 ml) tramite imbuto gocciolatore. La reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 1 ora a -30 C°. E' stato rimosso il refrigerante e lasciata sotto agitazione magnetica per 2 ore. La reazione è stata controllata tramite tlc ( eluente esano/Etilacetato 9:1). La miscela è stata trattata con NaHCO<sub>3</sub>. La fase acquosa è stata estratta con Etilacetato ( 3x20 ml) e le fasi organiche riunite sono state lavate con acqua. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrata su filtro a pieghe. Il solvente è stato evaporata, il composto è stato sottoposto alla purificazione tramite colonna cromatografica flash a per fornire il prodotto desiderato (olio giallo, resa 45 %) <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.23 – 8.17 (m, 2H), 8.05-7,97 (dd, *J* = 14.9, 8.5 Hz, 3H), 7.82-7,79 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 3.97 (s, 4H), 1.58 (s, 1H).

### Sintesi del Composto ter-butyl(4-(4-nitrobenzil)piperidin-1)carbonato 1.3

La reazione è stata allestita in un pallone a un collo. Il composto 1.2 (1,19 g) è stato solubilizzato in Etanolo (12 ml),tramite sonicazione. è stata poi aggiunta una soluzione di

NaOH ( 600 mg) in acqua ( 5ml). La reazione è stata lasciata per 1 ora sotto agitazione magnetica. E' stato aggiunto il terbutildicarbonato ( 1,625 gr), dopo un'ora la reazione è stata monitorata tramite tlc (eluente: Esano/Etilacetato 8:2). La fase acquosa è stata estratta con Etilacetato (3x20 ml) e le fasi organiche riunite sono state lavate con Acqua, la fase organica è stata anidrificata con Na2SO4, filtrata su filtro a pieghe e concentrata sotto vuoto a dare un liquido  
 Ambra. Resa : 91%  
 1H NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  1.47 (s, 1H).  
 1H NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  9.43-9,40 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 8.58 – 8.51 (m, 2H), 5,40-5.38 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 4.13-4,10 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.93-3,90 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 2,96 (s, 1H), 2.88-2,84 (d, J = 12.4 Hz, 3H), 2.75 (s, 2H), 2.72 (s, 9H).

#### **Sintesi del composto 4-(4nitrossibenzil)piperidina 0.1.4**

La reazione è stata allestita in un pallone a 1 Collo . 1.3 ( 1,31 gr) è stato solubilizzato in Etilacetato (2 ml) sotto agitazione magnetica. E' stato aggiunto di HCl 4 N aq ( 9 ml). la reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente overnight. La reazione è stata monitorata tramite tlc (Eluente: Esano/etilacetato 8:2). La miscela è stata concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato triturato con Et2O, raccolto mediante filtrazione, lavato con Et2O ed essiccato sotto vuoto per ottenere 1.4.  
 Resa 70,55%

1H NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  8.16-8,13 (d, J = 8.8 Hz, 2H, C10/12), 7.46-7,43 (d, J = 8.8 Hz, 2H, C10/12), 4.82 (s, 2H, N1), 3.39 – 3.29 (m, 2H, C6/2), 2,98-2,91(m, 2H C6/2), 2.76-2,74 (d, J = 7.3 Hz, 2H, C4), 2.02 – 1.91 (m, 1H, C4), 1,87-1,82 (d, J = 16,34Hz, 2H, C3/5) 1.57-1,40 (m, 2H, C3/5).

#### **Sintesi del composto 1-(3-methylbut-3-en-1-yl)-4-(4-nitrobenzyl)piperidine 0.1.5**

La reazione è stata allestita In un pallone a un collo in cui è stato solubilizzato 1.4 (63 mg) in MeOH ( 1 ml) sotto agitazione magnetica. E' stato aggiunto il 3-Buten-2-one (30 mg, 50 microl). Dopo 50 minuti la reazione è stata monitorata tramite tlc (eluente: DCM/Metanolo 9:1). La miscela è stata concentrata sotto vuoto, solubilizzata in DCM e nuovamente concentrata sotto vuoto a dare il composto 1.5, polvere rosata; resa: 93%  
 1H NMR (300 MHz, CDCl3)  $\delta$  7.96-7,93 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.11-7,09 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 3.14-3,10 (d, J = 12.5 Hz, 2H), 2.91 (s, 4H), 2.53-2,51 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 2.35-2,28 (t, J = 11.2 Hz, 2H), 2.01 (s, 4H), 1.71 – 1.54 (m, 5H).

#### **Sintesi del composto (6-bromonaphthalen-2-yl)(tert-butyl)dimethylsilane ( 2.1)**

in un pallone a due colli è stato solubilizzato 6-Bromonaftalen-2-olo ( 1 gr) in DCM ( 5 ml). L'ambiente di reazione è stato refrigerato tramite ghiaccio trito in soluzione acquosa ed è stato posto un ricadere a bolle. Tramite imbuto gocciolatore è stato aggiunto a piccole porzioni 1,8,diazobicyclo[5,4,0]undec-7ene DBU ( 819 mg, 804 µl); una volta solubilizzato è stato aggiunto tramite imbuto gocciolatore a piccole porzioni ter-butildimetilsilano cloridrato (811 mg). La reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 45 minuti a 0C°. La reazione è stata controllata tramite tlc (eluente Esano/Etilacetato 95:5). La reazione è stata portata a neutralità con bicarbonato di sodio. La fase acquosa è stata estratta con DCM e le fasi organiche riunite sono state lavate con Acqua, la fase organica è stata anidrificata con Na2SO4 filtrata su filtro a pieghe concentrata sotto vuoto a dare un solido marroncino.

Resa 78,55%

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07-8,08 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.85-7,86 (dd, J = 17.6, 8.9 Hz, 2H), 7.57-7,53 (dd, J = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 7,36-7.35 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.23-7,19 (dd, J = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 1.04 (s, 9H), 0.29 (s, 6H).

### **Sintesi del composto 2-(6-(tert-butyldimethylsilyl)naphthalen-2-yl)-4-(4-(4-nitrobenzyl)piperidin-1-yl)butan-2-ol 3.1**

Tutta la vetreria utilizzata è stata anidrificata tramite una notte in stufa. La reazione è stata allestita in un pallone a 3 colli con ricadere a bolle. L'ambiente di reazione è stato riscaldato tramite piastra riscaldante a 80 C° e controllato tramite atmosfera di azoto. 2.1 (1,36 gr 0,004224 mol) è stato solubilizzato in THF ( 4 ml) anidro tramite agitazione magnetica. E' stato aggiunto magnesio metallico triturato (158 mg) e Iodio molecolare (30 mg) la reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 1 ora. E' stato aggiunto aggiunto 1.5 (1,47 gr 0,0051 mol), la reazione è stata lasciata sotto agitazione magnetica per 2, è stato rimosso il riscaldamento, ed è stata lasciata sotto agitazione magnetica overnight. La reazione è stata controllata tramite tlc ( eluente DCM/MeOH 9:1). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.14-8,12 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7,92-7.91 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.64-7,62 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.55-7,57 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.49-7,46 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 2H), 7.29 – 7.26 (m, 2H), 7.16-7,14 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.10-7,07 (dd, J = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 2,90-2.86 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 2.63-2,62 (m, 3H), 2.21-2,14 (m, 3H), 1.96 – 1.90 (m, 1H), 1.62-1,59 (d, J = 13.8 Hz, 2H), 1.36-1,26 (s, 2H), 1.02-1,01 (m, 9H), 0.25 (s, 6H).

## 6 BIBLIOGRAFIA

(1)

Maurice, T.; Su, T.-P. The Pharmacology of Sigma-1 Receptors. *Pharmacology & Therapeutics* **2009**, *124* (2), 195–206. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.07.001>.

(2)

Cassano, G.; Gasparre, G.; Niso, M.; Contino, M.; Scalera, V.; Colabufo, N. A. F281, Synthetic Agonist of the Sigma-2 Receptor, Induces Ca<sup>2+</sup> Efflux from the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria in SK-N-SH Cells. *Cell Calcium* **2009**, *45* (4), 340–345. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2008.12.005>.

(3)

Alon, A.; Schmidt, H. R.; Wood, M. D.; Sahn, J. J.; Martin, S. F.; Kruse, A. C. Identification of the Gene That Codes for the  $\sigma_2$  Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114* (27), 7160–7165. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705154114>.

(4)

Riad, A.; Lengyel-Zhand, Z.; Zeng, C.; Weng, C.-C.; Lee, V. M.-Y.; Trojanowski, J. Q.; Mach, R. H. The Sigma-2 Receptor/TMEM97, PGRMC1, and LDL Receptor Complex Are Responsible for the Cellular Uptake of A $\beta$ 42 and Its Protein Aggregates. *Mol Neurobiol* **2020**, *57* (9), 3803–3813. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01988-1>.

(5)

Crottès, D.; Guizouarn, H.; Martin, P.; Borgese, F.; Soriani, O. The Sigma-1 Receptor: A Regulator of Cancer Cell Electrical Plasticity? *Front. Physiol.* **2013**, *4*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00175>.

(6)

Zeng, C.; Vangveravong, S.; Xu, J.; Chang, K. C.; Hotchkiss, R. S.; Wheeler, K. T.; Shen, D.; Zhuang, Z.-P.; Kung, H. F.; Mach, R. H. Subcellular Localization of Sigma-2 Receptors in Breast Cancer Cells Using Two-Photon and Confocal Microscopy. *Cancer Research* **2007**, *67* (14), 6708–6716. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3803>.

(7)

Spruce, B. A.; Campbell, L. A.; McTavish, N.; Cooper, M. A.; Appleyard, M. V. L.; O'Neill, M.; Howie, J.; Samson, J.; Watt, S.; Murray, K.; McLean, D.; Leslie, N. R.; Safrany, S. T.; Ferguson, M. J.; Peters, J. A.; Prescott, A. R.; Box, G.; Hayes, A.; Nutley, B.; Raynaud, F.; Downes, C. P.; Lambert, J. J.; Thompson, A. M.; Eccles, S. Small Molecule Antagonists of the  $\sigma_1$  Receptor Cause Selective Release of the Death Program in Tumor and Self-Reliant Cells and Inhibit Tumor Growth in Vitro and in Vivo.

(8)

Rossi, D.; Marra, A.; Rui, M.; Laurini, E.; Fermeglia, M.; Pricl, S.; Schepmann, D.; Wuensch, B.; Peviani, M.; Curti, D.; Collina, S. A Step Forward in the Sigma Enigma: A Role for Chirality in the Sigma<sub>1</sub> Receptor–Ligand Interaction? *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6* (1), 138–146. <https://doi.org/10.1039/C4MD00349G>.

(9)

Rui, M.; Rossi, D.; Marra, A.; Paolillo, M.; Schinelli, S.; Curti, D.; Tesei, A.; Cortesi, M.; Zamagni, A.; Laurini, E.; Pricl, S.; Schepmann, D.; Wünsch, B.; Urban, E.; Pace, V.; Collina, S. Synthesis and Biological Evaluation of New Aryl-Alkyl(Alkenyl)-4-Benzylpiperidines, Novel Sigma Receptor (SR) Modulators, as Potential Anticancer-Agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *124*, 649–665. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.067>.

(10)

Correia, J. H.; Rodrigues, J. A.; Pimenta, S.; Dong, T.; Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (9), 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>.

(11)

Fuchter, M. J. On the Promise of Photopharmacology Using Photoswitches: A Medicinal Chemist's Perspective. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (20), 11436–11447.

<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00629>.

(12)

Volarić, J.; Szymanski, W.; Simeth, N. A.; Feringa, B. L. Molecular Photoswitches in Aqueous Environments. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50* (22), 12377–12449.

<https://doi.org/10.1039/D0CS00547A>.

(13)

Weinstain, R.; Slanina, T.; Kand, D.; Klán, P. Visible-to-NIR-Light Activated Release: From Small Molecules to Nanomaterials. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (24), 13135–13272.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00663>.

(14)

Yu, C.; Schimelman, J.; Wang, P.; Miller, K. L.; Ma, X.; You, S.; Guan, J.; Sun, B.; Zhu, W.; Chen, S. Photopolymerizable Biomaterials and Light-Based 3D Printing Strategies for Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2020**, *120* (19), 10695–10743.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00810>.

(15)

Szymański, W.; Beierle, J. M.; Kistemaker, H. A. V.; Velema, W. A.; Feringa, B. L. Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular

Photoswitches. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (8), 6114–6178. <https://doi.org/10.1021/cr300179f>.

(16)

Merino, E.; Ribagorda, M. Control over Molecular Motion Using the *Cis – Trans* Photoisomerization of the Azo Group. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 1071–1090.

<https://doi.org/10.3762/bjoc.8.119>.

(17)

Hüll, K.; Morstein, J.; Trauner, D. *In Vivo* Photopharmacology. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (21), 10710–10747. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00037>.

(18)

Broichhagen, J.; Frank, J. A.; Trauner, D. A Roadmap to Success in Photopharmacology. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (7), 1947–1960. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00129>.

(19)

Axelrod, S.; Shakhnovich, E.; Gómez-Bombarelli, R. Thermal Half-Lives of Azobenzene Derivatives: Virtual Screening Based on Intersystem Crossing Using a Machine Learning Potential. *ACS Cent. Sci.* **2023**, *9* (2), 166–176. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.2c00897>.

(20)

Lerch, M. M.; Hansen, M. J.; van Dam, G. M.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Emerging Targets in Photopharmacology. *Angew Chem Int Ed* **2016**, *55* (37), 10978–10999. <https://doi.org/10.1002/anie.201601931>.

(21)

Schoenberger, M.; Damijonaitis, A.; Zhang, Z.; Nagel, D.; Trauner, D. Development of a New Photochromic Ion Channel Blocker via Azologization of Fomocaine. *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5* (7), 514–518. <https://doi.org/10.1021/cn500070w>.

(22)

Velema, W. A.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Photopharmacology: Beyond Proof of Principle. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (6), 2178–2191. <https://doi.org/10.1021/ja413063e>.

(23)

Mukherjee, A.; Seyfried, M. D.; Ravoo, B. J. Azoheteroarene and Diazocine Molecular Photoswitches: Self-Assembly, Responsive Materials and Photopharmacology. *Angew Chem Int Ed* **2023**, *62* (42), e202304437. <https://doi.org/10.1002/anie.202304437>.

(24)

Irie, M. Diarylethenes for Memories and Switches. *Chem. Rev.* **2000**, *100* (5), 1685–1716. <https://doi.org/10.1021/cr980069d>.

(25)

Di Martino, M.; Sessa, L.; Di Matteo, M.; Panunzi, B.; Piotto, S.; Concilio, S. Azobenzene as Antimicrobial Molecules. *Molecules* **2022**, *27* (17), 5643.

<https://doi.org/10.3390/molecules27175643>.

(26)

Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (5), 1809–1825.

<https://doi.org/10.1039/C1CS15179G>.

(27)

Kobauri, P.; Dekker, F. J.; Szymanski, W.; Feringa, B. L. Rational Design in Photopharmacology with Molecular Photoswitches. *Angew Chem Int Ed* **2023**, *62* (30), e202300681. <https://doi.org/10.1002/anie.202300681>.

(28)

Chankeshwara, S. V.; Chakraborti, A. K. Catalyst-Free Chemoselective *N*-*Tert*-Butyloxycarbonylation of Amines in Water. *Org. Lett.* **2006**, *8* (15), 3259–3262.

<https://doi.org/10.1021/ol0611191>.

(29)

Mohapatra, D. K.; Durugkar, K. A. Efficient and Selective Cleavage of the *Tert*-Butoxycarbonyl (Boc) Group under Basic Condition. *Arkivoc* **2005**, *2005* (14), 20–28.

<https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0006.e03>.

(30)

Alarcon, K.; Martz, A.; Mony, L.; Neyton, J.; Paoletti, P.; Goeldner, M.; Foucaud, B. Reactive Derivatives for Affinity Labeling in the Ifenprodil Site of NMDA Receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18* (9), 2765–2770.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.04.019>.

(31)

Li, P.; Ma, N.; Wang, Z.; Dai, Q.; Hu, C. Base-Mediated Intramolecular Decarboxylative Synthesis of Alkylamines from Alkanoyloxycarbamates. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (15), 8233–8240. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b00970>.

(32)

Martínez, R. F.; Cravotto, G.; Cintas, P. Organic Sonochemistry: A Chemist's Timely Perspective on Mechanisms and Reactivity. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (20), 13833–13856. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.1c00805>.

(33)

Navazio, F. *Lewis Acid catalysis in the Synthesis of Small Molecules: Carbon-Nitrogen bond formation*. Ph.D. Thesis, Università degli Studi di Camerino, Camerino, Italia, 2020.

(34)

Hayama, N.; Kuramoto, R.; Földes, T.; Nishibayashi, K.; Kobayashi, Y.; Pápai, I.; Takemoto, Y. Mechanistic Insight into Asymmetric Hetero-Michael Addition of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Carboxylic Acids Catalyzed by Multifunctional Thioureas. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (38), 12216–12225. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b07511>.

(35)

Patschinski, P.; Zhang, C.; Zipse, H. The Lewis Base-Catalyzed Silylation of Alcohols—A Mechanistic Analysis. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (17), 8348–8357. <https://doi.org/10.1021/jo5016568>.

(36)

Morita, T.; Makino, K.; Tsuda, M.; Nakamura, H. Chemoselective  $\alpha$ -Trifluoroacetylation of Amides Using Highly Electrophilic Trifluoroacetic Anhydrides and 2,4,6-Collidine. *Org. Lett.* **2023**, *25* (49), 8901–8905. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.3c03719>.

(37)

Wang, X.; Zhang, L.; Sun, X.; Xu, Y.; Krishnamurthy, D.; Senanayake, C. H. Addition of Grignard Reagents to Aryl Acid Chlorides: An Efficient Synthesis of Aryl Ketones. *Org. Lett.* **2005**, *7* (25), 5593–5595. <https://doi.org/10.1021/ol052150q>.

