

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACEUTICHE
XXIV CICLO**

**PROGETTAZIONE E SINTESI DI NUOVI LIGANDI SIGMA-1
BIFUNZIONALI CON ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE**

TESI DI DOTTORATO

Dr.ssa Emanuela Arena

Tutor: Prof. Chiar.mo Orazio Prezzavento

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Giuseppe Ronsisvalle

TRIENNIO 2008-2011

INDICE

Introduzione	pag. 4
1. Malattie neurodegenerative	
1.1 Generalità	pag. 6
1.2 Morbo di Alzheimer	pag. 7
2. Stress ossidativo	
2.1 Radicali liberi	pag. 11
2.2 Specie reattive dell'ossigeno (ROS)	pag. 11
2.3 Produzione mitocondriale di ROS... ..	pag. 12
2.4 Sistemi antiossidanti.....	pag. 13
3. Acido (\pm)- α -lipoico	
3.1 Caratteristiche generali	pag. 14
3.2 Proprietà antiossidanti	pag. 15
3.3 Proprietà neuroprotettive	pag. 15
4. Recettori sigma	
4.1 Generalità.....	pag. 17
4.2 Iter storico.....	pag. 17
4.3 Struttura del recettore sigma-1	pag. 20
4.4 Recettore sigma-2	pag. 22
4.5 Meccanismi di traduzione sigma-2.....	pag. 22
4.5.1 Effetti sui livelli intracellulari di calcio.....	pag. 22
4.5.2 Espressione cellulare e coinvolgimento nella patogenesi di malattie tumorali.....	pag. 23
4.5.3 Effetti sulla trasmissione dopaminergica	pag. 24
4.6 Localizzazione recettoriale sigma-1 e sigma-2.....	pag. 24
4.7 Localizzazione subcellulare.....	pag. 26
4.8 Recettore sigma-1 e MAM	pag. 27
4.9 Meccanismo di trasduzione sigma-1.....	pag. 30
4.9.1 Effetti sul turnover dei fosfoinositidi.....	pag. 30

4.9.2 Effetti sulla trasmissione glutammatergica.....	pag. 30
4.9.3 Effetti sulla trasmissione colinergica.....	pag. 31
4.9.4 Effetti sulla trasmissione dopaminergica.....	pag. 31
4.9.5 Effetti modulatori di canali ionici.....	pag. 32
4.9.6 Sinaptogenesi e plasticità neuronale.....	pag. 33
4.9.7 Regolazione del <i>signaling</i> del calcio.....	pag. 33
4.10 Recettori sigma-1 e neuroprotezione.....	pag. 34
4.11 Ligandi sigma-1.....	pag. 35
4.12 Ligandi endogeni.....	pag. 37
4.13 Modello farmacoforico sigma-1 recettoriale.....	pag. 38
5. Ligandi multi-target	pag. 41
6. Progettazione razionale	pag. 43
7. Discussione chimica	pag. 46
8. Sezione Sperimentale	pag. 50
9. <i>Binding</i>	pag. 62
9.1 Generalità.....	pag. 62
9.2 <i>Binding</i> Radiorecettoriale.....	pag. 66
9.3 Binding di saturazione o Scatchard experiment.....	pag 67
9.4 Analisi <i>Scatchard</i> per la determinazione della K_D della [³ H]-(+)- <i>cis</i> -pentazocina e della [³ H]-1,3-di(2-tolil)-guanidina	pag. 68
9.5 <i>Binding</i> di spiazzamento.....	pag. 69
9.5.1 <i>Binding</i> di spiazzamento sigma-1.....	pag. 70
9.5.2 <i>Binding</i> di piazzamento sigma-2.....	pag. 71
9.6 Risultati saggi di <i>binding</i>	pag. 72
10. Conclusioni.....	pag. 73
Bibliografia.....	pag. 76

Introduzione

Le malattie neurodegenerative (Alzheimer, Parkinson, Corea di Huntington, Sclerosi Laterale Amiotrofica, etc.), sono caratterizzate da un decorso strisciante e inesorabilmente progressivo che diviene palese solo quando il danno patologico è in una fase avanzata. Questa prerogativa porta a un graduale decadimento delle condizioni e della qualità di vita (*healthspan*) rendendo a poco a poco l'individuo che ne è affetto incapace di una vita normale. Numerosi studi epidemiologici hanno stimato che solo nell'Europa Occidentale gli individui affetti da morbo di Alzheimer siano tra 6 e 7 milioni e che nel 2020 potrebbero raggiungere statisticamente la cifra di 48 milioni. Le terapie farmacologiche al momento disponibili sono solo sintomatiche con un'efficacia variabile in funzione della patologia e della stadiazione clinica. La loro peculiarità è un'eziologia multifattoriale ascrivibile all'interazione di diversi fattori endogeni ed esogeni. Sebbene le manifestazioni cliniche delle diverse malattie siano eterogenee, alcuni meccanismi patogenetici sono comuni, tra questi annoveriamo il *misfolding* proteico, la disomeostasi dei metalli (ioni Fe^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+}), la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale. Numerose ricerche hanno messo in luce il ruolo chiave svolto dai ROS sia nell'insorgenza sia nella progressione delle malattie neurodegenerative.

Considerando i complessi *networks* biologici coinvolti nell'eziopatogenesi di queste malattie, appare chiaro come lo sviluppo di nuovi farmaci in grado di modulare contemporaneamente due o più *targets* possa rappresentare un valido strumento terapeutico. Le strategie per lo sviluppo di molecole in grado di rispondere a questi presupposti sono principalmente due, lo *screening approach* e lo *knowledge-based approach*. La prima prevede la consultazione di dati già esistenti come l'esame di librerie di composti strutturalmente diversi (*diversity screening*) o di classi di composti (*focused screening*). La seconda strategia, conosciuta anche come *framework combination*, prevede la combinazione in una singola struttura (*design in*) di elementi farmacoforici appartenenti a due diversi ligandi (*linked, fused* o *merged*). Per lo sviluppo del mio progetto di ricerca ho focalizzato la mia attenzione sulla possibilità di ottenere agonisti sigma-1 (σ_1) selettivi dotati di attività antiossidante (*bifunctional ligands*). La scelta del recettore σ_1 come target è dettata dal ruolo che esso svolge nella regolazione di alcuni canali ionici voltaggio e ligando-dipendenti (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^- , recettori dell'*N*-Metil-*D*-Aspartato, (NMDA) e dell'inositolo 1,4,5-trifosfato IP3) e dalla sua localizzazione subcellulare a livello della *Mitochondrial Associated Membranes* (MAM), dove modula il

flusso di ioni Ca^{2+} dal reticolo endoplasmatico (ER) ai mitocondri, agendo da *chaperone* molecolare dei recettori IP3.

Nello specifico i ligandi bifunzionali progettati sono caratterizzati da un *moiety* σ_1 e da una porzione antiossidante, rappresentata dall'acido (\pm) - α -lipoico [(\pm) - α -LA]. Per la loro progettazione sono stati presi in esame gli studi di correlazione struttura-attività (SAR) riportati da Gilligan e coll. su ligandi σ_1 selettivi a struttura benzilpiperidinica. Sui composti sintetizzati sono stati eseguiti studi *in vitro* di *binding* al fine di investigare la loro affinità per i siti sigma. Ulteriori studi sono in *progress* per valutare il loro profilo biofarmacologico.

1. MALATTIE NEURODEGENERATIVE

1.1 GENERALITÀ

Attualmente le malattie neurodegenerative (morbo di Parkinson, demenza di Alzheimer, Corea di Huntington, Sclerosi laterale amiotrofica, ecc) rappresentano una grande sfida per la medicina poiché non è stata ancora individuata una terapia per la loro cura. Ciò è ascrivibile alla loro eziologia multifattoriale come l'interazione di fattori genetici, ambientali ed endogeni. Esse rappresentano un onere notevole per la Sanità Pubblica e hanno un significativo impatto socio-sanitario perché sono una delle maggiori cause di disabilità nella popolazione. La conseguenza è una continua ricerca per migliorare il quadro epidemiologico, come una diagnosi precoce e terapie in grado di rallentare o impedirne la loro evoluzione. Morfologicamente le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una progressiva perdita di specifiche popolazioni neuronali, esse pur presentando manifestazioni cliniche diverse, hanno delle caratteristiche in comune relativamente ai meccanismi di patogenesi quali il *misfolding* proteico, la disomeostasi dei metalli (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+}), la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale.⁽¹⁾ (Fig. 1).

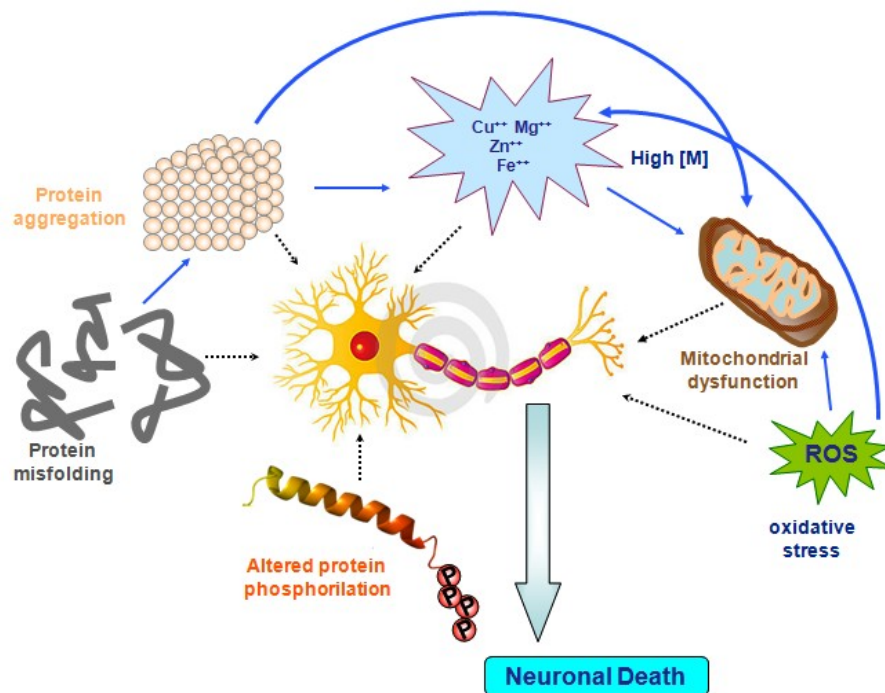


Fig. 1 Pathways patogenetiche delle malattie neurodegenerative

Le malattie neurodegenerative vengono definite “patologie da disordine della conformazione proteica” (PCD) o “patologie da *misfolding* proteico” poiché sono accomunate dalla presenza di aggregati proteici.⁽²⁾ Quest’ultimi si formano per un’alterazione dei processi di *folding*, il quale dipende dalla struttura proteica secondaria e terziaria. Una proteina può assumere conformazioni diverse, in equilibrio tra loro, ma solo lo “stato di *folding* nativo o naturale” conferisce stabilità. Nel processo di acquisizione, guidato dagli *chaperones*, dello stato di *folding* finale le proteine attraversano degli stadi intermedi, poco stabili, denominati “*molten globules*”(MG). In questi stadi intermedi i monomeri proteici espongono sulla loro superficie dei residui idrofobici mediante i quali si aggregano e formano gli oligomeri. Gli oligomeri si aggregano a formare quelle che sono definite “protofibrille” le quali sono strutture longitudinali con un diametro non superiore a 2 nm. Queste a loro volta si aggregano in “fibrille” insolubili, strutture longitudinali più spesse con un diametro di 12 nm che si ritrovano nelle inclusioni intracitoplasmatiche. Ogni alterazione da questo stato è concepito come “*misfolding*”. La proteina che costituisce questi aggregati varia in funzione del tipo di patologia, in particolare: α -sinucleina (morbo di Parkinson), huntingtina (Corea di Huntington), superossido dismutasi, Cu-Zn dipendente di tipo I (SOD I) (Sclerosi laterale amiotrofica), β -amiloide (demenza di Alzheimer), proteina prionica Scarpie (Prp sc) (malattie da prioni). Un ulteriore meccanismo condiviso dalle malattie neurodegenerative riguarda l’alterazione dello stato di fosforilazione di alcune proteine chiave, coinvolte nella cascata patogenetica e una anomala attività di specifiche chinasi e fosfatasi.^(3,4) Per quanto riguarda il ruolo svolto dai metalli (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Cu^{2+}), è stato osservato che essi favoriscono la fibrillogenesi.⁽⁵⁾ Inoltre, la loro disomeostasi incrementa la produzione di radicali liberi, in particolare di ROS e, conseguentemente lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale.⁽⁶⁾

1.2 MALATTIA DI ALZHEIMER

Oggi la malattia di Alzheimer, per la prima volta documentata nel 1906 dal medico tedesco Alois Alzheimer da cui prende il nome, rappresenta la forma più comune di demenza della popolazione anziana. Essa è una patologia invalidante che rende a poco a poco l’individuo che ne è affetto incapace di una vita normale per il progressivo declino cognitivo. La riduzione delle funzioni cognitive, in particolare il deficit della memoria che è tipico di questa patologia, è dovuta alla grave compromissione delle funzioni cerebrali a livello della

corteccia, la quale è la sede del pensiero e del linguaggio ed è coinvolta nei complicati meccanismi di memoria e concentrazione. I processi degenerativi sono presenti sia nei gangli della base dove risiedono i neuroni colinergici che presiedono a funzioni complesse come la memoria e il ragionamento sia nell'ippocampo. Quest'ultimo svolge un ruolo fondamentale nell'apprendimento e nei processi di memorizzazione ed è essenziale per la conservazione della memoria.⁽⁷⁾ (Fig. 2). La Fig. 2 riporta la sezione frontale di cervello sano (a sinistra) e di uno colpito da Alzheimer (a destra), il quale è caratterizzato da un generale raggrinzimento del tessuto cerebrale. I solchi e i ventricoli sono notevolmente allargati, invece i giri sono ristretti. Questo quadro fisiopatologico si può globalmente osservare nella figura 3.

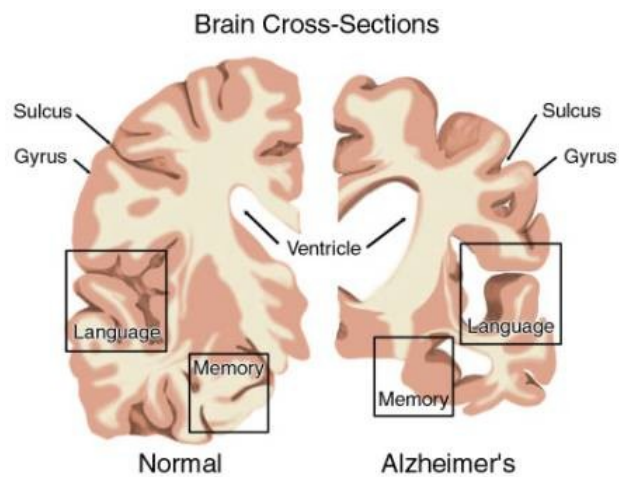


Fig. 2. Sezione frontale di cervello sano (a sinistra) e di uno colpito da Alzheimer (a destra)



Fig. 3. Immagine di un cervello colpito da Alzheimer (a sinistra) e di uno sano (a destra)

La malattia di Alzheimer è istologicamente caratterizzata da una triade costituita dalla distruzione dei neuroni colinergici, dalle placche neuritiche (aggregati proteici extraneuronali formati dalla proteina β amiloide ($A\beta$)) e dai grovigli neurofibrillari “neurofibrillary tangles” (aggregati neurofibrillari intraneuronali costituiti da una forma iperfosforilata della proteina citoscheletrica tau (τ)). Quest’ultima stabilizza i microtubuli che contribuiscono al trasporto intraneuronale di importanti sostanze come quelle nutrienti. Poiché nell’Alzheimer la proteina τ è anomala, le strutture microtubulari sono collassate (Fig. 4). La proteina $A\beta$ è un peptide formato da 42 amminoacidi ($A\beta_{1-42}$) che origina metabolicamente dal precursore proteico dell’amiloide (APP).⁽⁸⁾ Quest’ultima è una proteina transmembrana di tipo I e metabolizzata da due enzimi denominati α -secretasi (BACE) e γ -secretasi, i quali tagliano l’APP in corrispondenza delle estremità NH e COOH terminali rispettivamente della proteina $A\beta$.

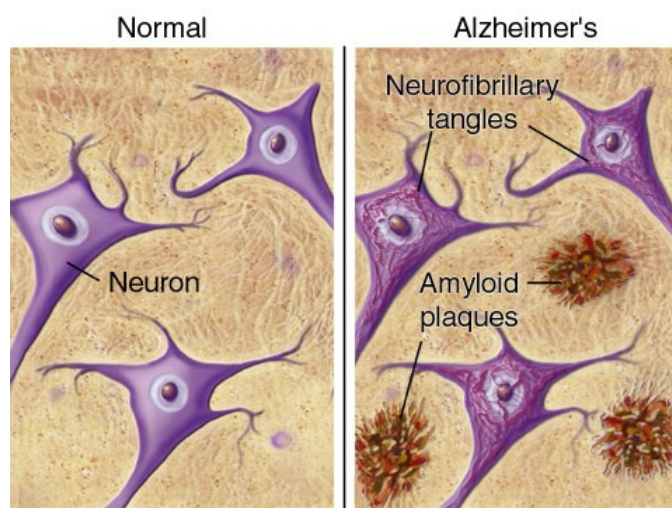


Fig. 4. Neuroni in un cervello sano (a destra) e in uno colpito da Alzheimer (a sinistra)

Numerose evidenze hanno mostrato come la $A\beta$ sia in grado di causare stress ossidativo mitocondriale, un’alterazione della catena di trasporto degli elettroni e un’incrementata produzione di anione superossido ($O_2^{\bullet-}$) con deplezione dei livelli di ATP.⁽⁹⁾ In particolare, la $A\beta$ è un potente inibitore del complesso IV della catena respiratoria mitocondriale, attacca alcuni importanti enzimi (α -chetoglutarato e piruvato deidrogenasi) del ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e danneggia il DNA mitocondriale portandolo a frammentazione.⁽¹⁰⁾ È stato riportato come forme mutate di APP e dei suoi derivati siano coinvolte nella generazione di radicali liberi a livello mitocondriale.⁽¹¹⁾ Tutto ciò

è stato avvalorato dalle analisi istopatologiche eseguite su tessuti *postmortem* di pazienti affetti da Alzheimer dove sono state evidenziati incrementati livelli di danno ossidativo su lipidi, proteine e DNA in diverse aree cerebrali.⁽¹²⁾ Inoltre, è stato osservato un aumento dell'attività di catalasi, superossidodismutasi e glutatione perossidasi nell'ippocampo e nell'amigdala.⁽¹³⁾ Durante il processo di perossidazione lipidica è generato il 4-idrossinonenale (4-HNE), un'aldeide neurotossica che modifica covalentemente le proteine reagendo con residui di lisina, cisteina e istidina. Alcune delle proteine modificate dallo stress ossidativo, A β -indotto, includono trasportatori di membrana, recettori, proteine di legame del GTP e canali ionici. I prodotti di perossidazione lipidica, 4-HNE e isoprostani, inoltre promuovono la fosforilazione e l'aggregazione della proteina τ , la quale a sua volta inibisce il complesso I della catena respiratoria mitocondriale. L'interazione della β -amiloide con ioni Fe²⁺ o Cu⁺ genera il perossido d'idrogeno (H₂O₂) il quale interagendo con le specie ioniche che lo hanno generato origina il radicale idrossilico (HO[•]) che contribuisce ulteriormente alla disfunzione dell'ER.⁽¹⁴⁾

2. STRESS OSSIDATIVO

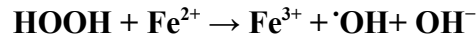
2.1 RADICALI LIBERI

Lo stress ossidativo è uno stato biologico nocivo indotto da una rottura dell'equilibrio fisiologico, in un organismo vivente, fra la produzione di specie chimiche reattive, generalmente centrate sull'ossigeno (ROS) e la loro eliminazione, da parte dei sistemi di difesa antiossidanti enzimatici e non⁽¹⁾. I radicali liberi sono specie chimiche aventi in uno degli orbitali più esterni uno o più elettroni spaiati, i quali sono responsabili della spiccata reattività. Infatti, al fine di ripristinare la normale situazione elettronica e raggiungere la propria stabilità i radicali sottraggono elettroni a qualsiasi specie chimica con la quale vengono a contatto. Essi sono classificati in funzione della natura dell'atomo avente l'orbitale con l'elettrone spaiato e tra questi annoveriamo quelli centrati sull'ossigeno, sull'azoto, sul carbonio e sul cloro.⁽¹⁵⁾ I radicali liberi possono essere generati mediante tre meccanismi: inizio, propagazione e termine. La reazione di inizio può avvenire o per scissione emolitica o per l'interazione con i metalli di transizione. Una volta innescata una reazione radicalica essa tende a propagarsi. Si distinguono 4 meccanismi di propagazione: trasferimento, addizione, frammentazione e arrangiamento. Infine, una reazione radicalica si può arrestare o per combinazione o per di sproporzione.⁽¹⁶⁾

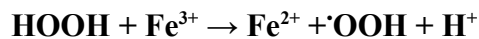
2.2 SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)

I ROS negli organismi viventi vengono prodotti durante il metabolismo cellulare sebbene alcuni agenti esogeni di natura ambientale, iatrogena, patologica e sociale possano incrementarne la produzione. Essi giocano un importante ruolo in molti processi cellulari, quali infiammazione e infezione, essendo utilizzati dal sistema immunitario come via per attaccare e uccidere agenti patogeni. Tuttavia, ad elevate concentrazioni essi possono essere importanti mediatori di danno a diverse strutture cellulari quali acidi nucleici, lipidi, carboidrati e proteine.⁽¹⁷⁾ Si distinguono due tipologie di ROS: radicalica e non. Tra quelli radicalici annoveriamo $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , il radicale idroperossile (ROO^{\bullet}), ecc. Le specie non radicaliche includono l'ozono (O_3), H_2O_2 e l'ossigeno singoletto ($^1O_2^*$), ecc. I ROS sono prodotti nella plasmamembrana, nell'ER, nei perossisomi, nel citosol e nei mitocondri. In

ciascuna sede essi sono generati o in processi metabolici o per effetto di reazioni catalizzate da enzimi o da metalli di transizione (Fe^{2+} , Cu^+) come avviene nella reazione di Fenton:⁽¹⁸⁾



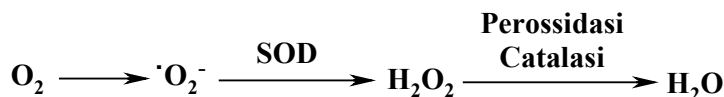
lo ione ferroso (Fe^{2+}) si ossida a ione ferrico (Fe^{3+}) e cede il suo elettrone a una molecola di H_2O_2 la quale per rottura di uno dei legami covalenti genera un anione idrossilico (OH^-) e un radicale $\text{HO}\cdot$. Quest'ultimo essendo altamente reattivo può indurre perossidazione lipidica e danno ossidativo a proteine e DNA. A sua volta lo ione Fe^{3+} si rigenera riducendosi a ione Fe^{2+} , strappando un elettrone a una seconda molecola di H_2O_2 , la quale si scinde in un radicale peridrossilico ($\text{HOO}\cdot$) e in un catione H^+ .



2.3 PRODUZIONE MITOCONDRIALE DI ROS

I mitocondri sono organuli citoplasmatici rivestiti da due membrane, una esterna e una interna. Quest'ultima delimita quello che viene definito lo "spazio matrice" nel quale si invagina in numerose ripiegature dette "creste". I mitocondri rappresentano la centrale energetica cellulare poiché sono sede della fosforilazione ossidativa, la quale si compone della catena di trasporto degli elettroni (ETC) e della sintesi dell'ATP. La ETC è un processo cellulare di riduzione dell' O_2 ad opera della nicotinammide adenina dinucleotide (NADH) e della flavina adenina dinucleotide (FADH_2). La catena di trasporto degli elettroni è costituita da cinque complessi multienzimatici localizzati sulla membrana interna, che fanno dei mitocondri la principale fonte metabolica di ROS. Il complesso I converte il NADH a NAD^+ , mentre il complesso II converte il succinato in fumarato. I complessi I, III e IV trasportano protoni (H^+) attraverso la membrana, durante questo processo i complessi I e III generano la specie $\text{O}_2\cdot^-$. Quest'ultimo è convertito dalla superossido dismutasi manganese dipendente (MnSOD) in H_2O_2 , la quale può diffondere nei compartimenti citoplasmatici dove è convertita ad H_2O dagli enzimi glutazione perossidasi e catalasi, ma può anche interagire con Fe^{2+} o Cu^+ e generare $\text{HO}\cdot$ (reazione di Fenton). Pertanto, i maggiori produttori di $\text{O}_2\cdot^-$ sono il Complesso I (che lo rilascia nella matrice) e il III (che lo rilascia nello spazio tra le due membrane). Dopo la sintesi di ATP, idealmente il trasferimento elettronico dal NADH al citocromo C e da

questo all'ossigeno si dovrebbe concludere con la produzione di H₂O. Tuttavia, l'1-2% di elettroni sfugge al trasporto dei vari coenzimi e reagisce direttamente con l'ossigeno molecolare (O₂) generando l'anione O₂•⁻ (riduzione univalente dell'O₂) e/o H₂O₂ (riduzione bivalente dell'O₂).⁽¹⁹⁻²⁰⁾



Riduzione dell'ossigeno molecolare

I radicali liberi sono anche generati dall'attività degli enzimi mitocondriali monoammino-ossidasi (MAOA-MAOB), coinvolti nel metabolismo di dopamina, serotonina e norepinefrina.

2.4 SISTEMI ANTIOSSIDANTI

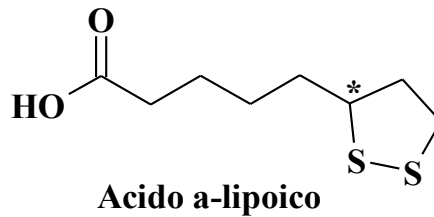
I radicali liberi sono potenziali agenti lesivi per cui nel corso dell'evoluzione gli organismi viventi hanno sviluppato numerosi sistemi di difesa endogeni ed esogeni per fronteggiare la loro azione.⁽²¹⁾ Essi possono essere classificati in funzione dell'origine, endogeni ed esogeni, sulla base della solubilità, liposolubili e idrosolubili e in funzione della natura chimica in enzimatici e non enzimatici.⁽²²⁾ Sulla base del meccanismo di azione sono classificati in quattro tipologie:

- 1) **Scavenger**: sono molecole che eliminano le specie radicaliche man mano che vengono prodotte. Essi possono inibire l'iniziazione di una reazione radicalica (SOD) o interrompere la sua propagazione oppure dare origine a un radicale meno reattivo e stabile. Fanno parte di questa classe la vitamina E, l'acido ascorbico, le melanine, i carotenoidi, i bioflavonoidi e il glutathione ridotto.
- 2) **antiossidanti preventivi**: prevengono la formazione di specie reattive chelando i metalli di transizione o sequestrando ioni metallici. Appartengono a questa categoria la catalasi, la glutathione perossidasi e reduttasi, la transferrina, la ceruloplasmina, la lattoferrina e la glucosio-6-fosfato deidrogenasi.
- 3) **agenti di riparo**: sono esclusivamente enzimi che intervengono solo dopo che si è instaurato il danno. Tra questi annoveriamo le idrolasi (proteasi, lipasi e glicosidasi), le polimerasi e le transferasi.
- 4) **agenti di adattamento**: comprendono sostanze e tecniche finalizzate al potenziamento del sistema antiossidante fisiologico

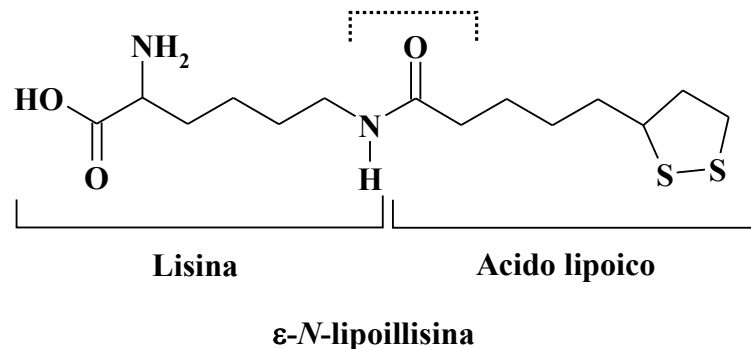
3. ACIDO (\pm)- α -LIPOICO

3.1 CARATTERISTICHE GENERALI

L'acido (\pm)- α -lipoico [acido 5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoico] (LA) è stato isolato e chimicamente identificato nel 1951 da Reed e coll.⁽²³⁾



Sebbene in piccolissime quantità l'organismo è in grado di produrlo a livello mitocondriale a partire dalla cisteina e dall'acido ottanoico, ma esso viene principalmente introdotto con la dieta. Può esistere sia in forma ridotta (acido diidrolipoico, DLA) nella quale gli atomi di zolfo sono presenti come gruppi tiolici (-SH) liberi sia in forma ossidata, caratterizzata da un anello ditiolanico per formazione di un legame disolfuro. È importante sottolineare come entrambe le forme abbiano attività antiossidante.⁽²⁴⁾ La sua particolare struttura gli permette di prendere parte a reazioni di ossido-riduzione (redox) e di fungere da trasportatore di elettroni. Infatti l'acido lipoico funge da cofattore di alcuni enzimi mitocondriali quali la piruvato deidrogenasi (PDH) e della α -chetoglutarato deidrogenasi (KGDH). LA è il cofattore della diidrolipoil transacetilasi, indicata con E2, enzima appartenente al complesso della piruvato deidrogenasi deputato alla conversione del piruvato in Acetil Coenzima A. Nello specifico, esso è unito covalentemente in posizione ϵ al gruppo amminico di un residuo di lisina di E2 mediante un legame carboammidico.⁽²⁵⁾



L'acido lipoico presenta un atomo di carbonio chirale, pertanto esistono due strutture enantiomeriche, denominate *R*-(+) e *S*-(-), ma solo la forma *R*-(+) è biologicamente attiva.⁽²⁶⁾ Essendo una molecola abbastanza piccola, esso viene prontamente assorbito e trasportato attraverso le membrane cellulari poiché ha la peculiarità di essere attivo nei compartimenti cellulari sia lipidici (plasmalemma) sia acquosi (citoplasma).

3.2 PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI

L'acido α -lipoico è un importante composto dotato di proprietà antiossidanti, le quali sono ascritte alla presenza del ponte disolfuro che si comporta da accettore di elettroni.⁽²⁷⁾ In particolare, il sistema -SH/S-S rispettivamente forma ridotta e forma ossidata dà luogo a reazioni di ossido-riduzione basate sull'interconversione tiolo-disolfuro. La presenza di due gruppi tiolici vicinali rende l'acido diidrolipoico un forte riducente rispetto ai monotioli. Esso è un antiossidante polimodale nella misura in cui espleta la sua attività mediante diversi meccanismi: è uno *scavenger* sia dei ROS, incrementando i livelli di glutazione ridotto sia dei prodotti di perossidazione lipidica, è un chelante dei metalli di transizione inibendo la formazione del H₂O₂ e dei radicali \cdot OH. Inoltre, è in grado di rigenerare mediante riduzione delle loro forme ossidate numerosi antiossidanti endogeni come la vitamina E, la vitamina C, il coenzima Q e il glutazione mantenendo il *balance* antiossidante intracellulare.⁽²⁸⁾ A differenza degli altri antiossidanti, essendo una molecola abbastanza piccola, esso viene prontamente assorbito e trasportato attraverso le membrane cellulari poiché ha la peculiarità di essere attivo nei compartimenti cellulari sia lipidici (plasmalemma) sia acquosi (citoplasma). Tra tutti presenta il vantaggio di poter attraversare la barriera ematoencefalica e viene prontamente ridotto ad acido diidrolipoico dalla diidrolipoamide deidrogenasi mitocondriale NADH-dipendente.

3.3 PROPRIETÀ NEUROPROTETTIVE

Recentemente numerose ricerche hanno documentato gli effetti benefici dell'acido α -lipoico nel trattamento di diverse patologie quali, ipertensione, aterosclerosi, iperlipomia, diabete mellito e nel declino vascolare-cognitivo associato all'invecchiamento.⁽²⁹⁾ Sono stati messi in luce anche importanti effetti neuroprotettivi da esso espletati nelle malattie

neurodegenerative. Esso è in grado di proteggere i neuroni dalla citotossicità $A\beta$ –indotta stabilizzando le funzioni cognitive nei pazienti affetti da Alzheimer.⁽³⁰⁾ Incrementa la produzione di acetilcolina (ACh) mediante attivazione della colina acetiltransferasi e aumento del *uptake* del glucosio fornendo così più acetilCoenzima A per la sintesi dell’ACh.⁽³¹⁾ Mediante analisi di fluorescenza è stato osservato che l’acido α -lipoico in associazione con l’acido diidrolipoico è in grado di inibire in modo dose-dipendente la formazione e l’estensione delle fibrille $A\beta$ dal peptide $A\beta$.⁽³²⁾ In modelli animali di Parkinson e di Corea di Huntington, l’acido α -lipoico delimita la neurotossicità indotta dal rotenone, dall’acido 3-nitro-propionico e dal 1-metil-4-fenilpiridinio.⁽³³⁾

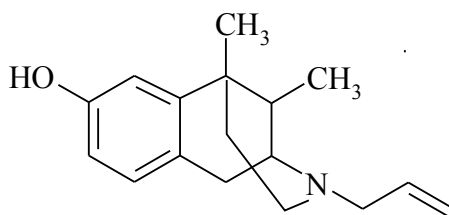
4. RECETTORI SIGMA

4.1 GENERALITÀ

Fino a oggi sono stati individuati due sottotipi di recettore sigma denominati sigma-1 e sigma-2 (σ_1 e σ_2)⁽³⁴⁾ Essi differiscono per profilo chimico e farmacologico, per il loro peso molecolare (PM), localizzazione anatomica, meccanismo di trasduzione e per *pattern* di selettività. Sono coinvolti sia a livello cellulare che sistemico in numerosi processi in quanto regolano una varietà di funzioni quali il *signaling* di ioni calcio, la sinaptogenesi, il *turnover* dei fosfoinositidi, il rilascio di diversi neurotrasmettitori (dopamina, acetilcolina e glutammato), la contrazione di varie fibre muscolari, la regolazione di alcuni canali ionici a voltaggio (Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cl^-) e ligando-dipendenti (recettori dell'*N*-Metil-*D*-Aspartato, (NMDA) e dell'inositolo 1,4,5-trifosfato IP3). Diversi *reports* suggeriscono il loro coinvolgimento nel dolore, nelle patologie tumorali, nei processi apoptotici, nelle funzioni immunitarie ed endocrine e soprattutto nei meccanismi che mediano la neuroprotezione. Considerata la molteplicità di processi fisio-patologici in cui i recettori σ sono coinvolti, essi sono oggetto di numerosi studi nella misura in cui potrebbero rappresentare dei potenziali *target* per il trattamento di numerose patologie.

4.2 ITER STORICO

Tra le principali scoperte realizzate in ambito chimico-farmaceutico si può annoverare quella che ha condotto all'identificazione dei recettori σ . Essa risale al 1976, quando Martin e i suoi collaboratori ipotizzarono l'esistenza di tali recettori in seguito agli studi *in vivo* condotti con la "*N*-allilnormetazocina" (\pm)-SK&F-10,047 e dei relativi benzomorfanici racemici. L'origine del termine sigma deriva per l'appunto dalla prima lettera "S" della sigla della *N*-allilnormetazocina, considerata il ligando prototipo per questi recettori.⁽³⁵⁾



(\pm)-SKF 10,047

Inizialmente si riteneva che i recettori σ fossero una tipologia di recettori oppioidi, affermazione smentita da studi successivi, i quali permisero di chiarire attraverso la risoluzione racemica di (\pm)-SK&F10,047 che l'isomero levo si lega principalmente ai recettori oppioidi MOP e KOP, mentre l'enantiomero opposto interagiva con i recettori σ e con i recettori NMDA, e precisamente sul sito della fenciclidina (PCP), un allucinogeno a struttura fenil-cicloesilamminica.⁽³⁶⁾ Tale scoperta portò a sostenere l'ipotesi controversa circa la reale identità dei recettori σ , essi, infatti vennero postulati come un sito di *binding* per la PCP presente sul recettore NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato).⁽³⁷⁾ Questa ipotesi, successivamente rivelatasi non veritiera, fu formulata intorno agli anni '80 poiché l'(+)-SK&F10,047 era in grado di spiazzare la [³H]PCP dal suo sito di legame. Tuttavia, uno studio condotto sulle suddette sostanze smentì questa associazione, emerse, infatti, un diverso *pattern* di selettività e una differente distribuzione anatomica delle relative strutture recettoriali. In realtà, ulteriori ricerche misero in luce che l'(+)-SK&F10,047 oltre a legarsi ai recettori σ si lega ad un sito addizionale presente sul recettore NMDA.

Durante gli anni '80, le conoscenze sui recettori σ furono ampliate per merito di nuove e innovative ricerche condotte da numerosi studiosi tra cui Tsung-Ping Su e William Tam. Su⁽³⁸⁻³⁹⁾, utilizzando omogenati di cervello di cavia, caratterizzò i siti di *binding* dell' [³H](\pm)-SK&F10,047, inaccessibili all'etorfina. Dalle sue ricerche si osservò che i recettori σ mostravano un'elevata affinità sia per diversi composti a struttura benzomorfanica ad esempio per la (+)-pentazocina, per il destrallorfanolo e la(+)-ciclazocina, sia per altri composti appartenenti a differenti classi chimiche e farmacologiche quali: neurolettici (aloperidolo), antidepressivi (imipramina), β -bloccanti (propranololo), anestetico dissociativo (PCP).

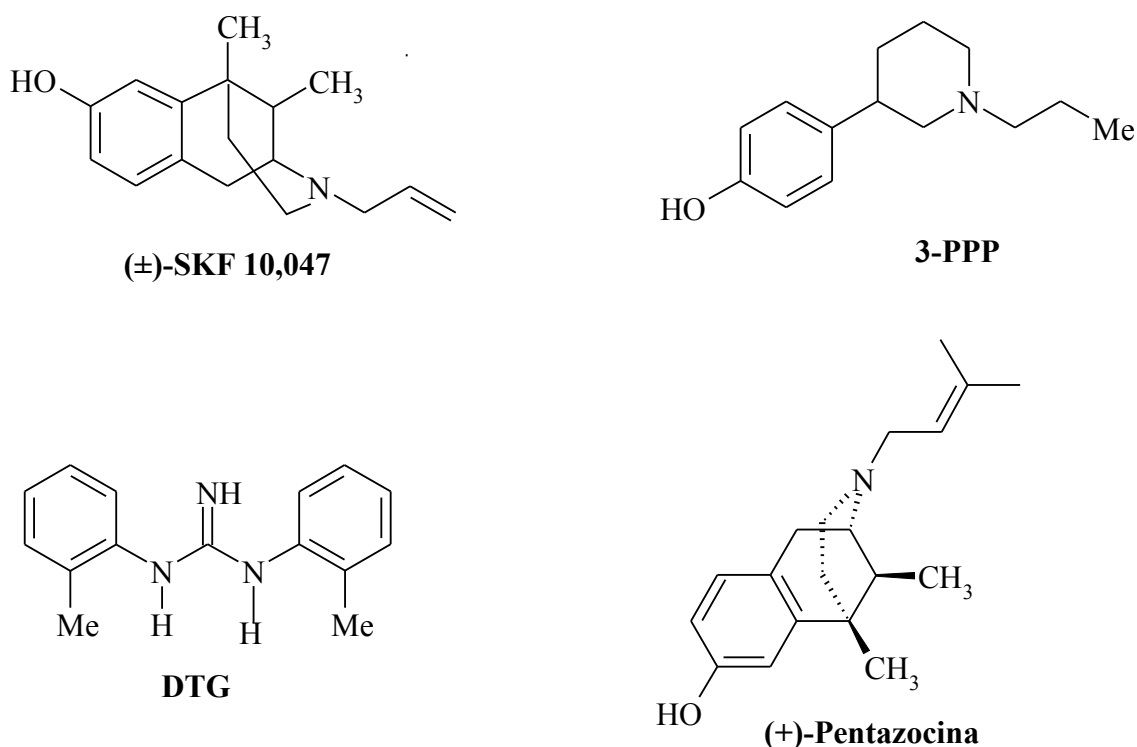
Gli studi di Su ripresi e proseguiti da William Tam⁽⁴⁰⁾ pervennero alle medesime conclusioni. Egli individuò come ligandi σ con affinità nanomolare anche i neurolettici Perfenazina, Flufenazina, Molindone, Pimozide, Tioridazina, Clorpromazina. Tam vide anche che erano in grado di interagire con i siti σ gli anti H₁ pirilamina, prometazina e clorfeniramina.

Al fine di caratterizzare meglio i recettori σ furono sintetizzati dei radioligandi più selettivi, la [³H](+)-3-(3-idrossifenil)-*N*-(1-propil)piperidina (3-PPP)⁽⁴¹⁾, venne utilizzata negli studi di *binding* per distinguere i recettori σ dai recettori oppioidi, NMDA e dopaminergici, anche se presenta un'attività agonista sull'autorecettore presinaptico dopaminergico.

Significativi sviluppi si ebbero con l'introduzione, ad opera di Weber⁽⁴²⁾ e del suo gruppo di lavoro, della [³H]di-*o*-tolilguanidina (DTG) (Fig. 5). Questo infatti, rappresentò il primo radioligando veramente selettivo per i recettori σ , anche se non era in grado di discernere tra i due sottotipi. Data la selettività mostrata della (+)-pentazocina per i siti σ_1 questa venne marcata e successivamente usata negli studi di legame come marcatore selettivo.

La presenza dei due sottotipi è stata evidenziata per la prima volta nel cervello di cavia nel 1988 da Rothman⁽⁴³⁾ e coll., essi mediante studi di *binding* accertarono l'esistenza di due diversi siti per il [³H] DTG, i quali vennero definiti "sito-1 e sito-2". Sebbene questi due siti avessero una paragonabile affinità per il DTG presentavano marcate differenze di affinità per i (+)-benzomorfolani e per la (+)-morfina. In particolare, il sito-1 legava i (+)-benzomorfolani e la (+)-morfina con alta affinità mentre il sito-2 per i suddetti composti esibiva un'affinità molto bassa. Inoltre, l'aloiperidolo sebbene possieda un'elevata affinità per entrambi i siti, lega con un'affinità più bassa il sito-2, invece la (+)-3-PPP lega il sito-2 con una moderata affinità.

Fig. 5



4.3 STRUTTURA RECETTORE SIGMA-1

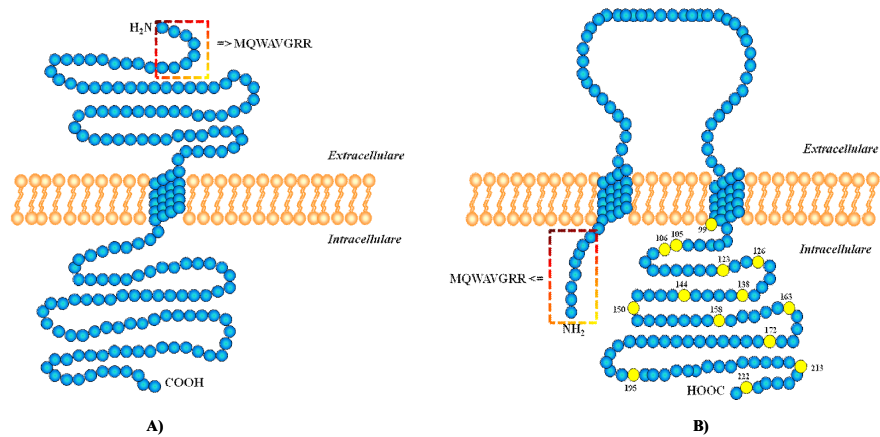
La caratterizzazione dei recettori σ_1 e σ_2 è avvenuta nel 1992 ad opera di Bowen e coll.⁽³⁴⁾ I due siti si differenziano per il peso molecolare, la localizzazione anatomica, il meccanismo di trasduzione e per il *pattern* di selettività. Il recettore meglio caratterizzato è indubbiamente il sottotipo σ_1 in quanto è il solo tra i due a essere stato clonato, sia in specie animali quali topo, ratto e cavia, sia nell'uomo. Nel 1996 è stato clonato nel fegato di cavia da Hanner e coll.⁽⁴⁴⁾, e due anni dopo nell'uomo ad opera di Prasad.⁽⁴⁵⁾ Il recettore σ_1 , sia umano che murino, è una proteina integrale di membrana costituita da 223 amminoacidi, ma differisce per il PM che nel topo e nell'uomo è pari rispettivamente a 25,3 e 25-29 kDa. La struttura proteica è codificata da una sequenza nucleotidica lunga 1857 bp e presenta un'estremità *N*-terminale caratterizzata da una sequenza segnale di ancoraggio per il reticolo endoplasmatico, definita dai seguenti amminoacidi "MQWAVGRR". Questa struttura proteica non mostra alcuna analogia strutturale con i recettori oppioidi o con altri recettori leganti neurotrasmettitori, ma mostra un'omologia, del 30% circa, con ERG-2, gene codificante per la C₈-C₇ sterol-isomerasi che è un enzima coinvolto nella biosintesi degli steroli nei funghi. Sebbene i recettori σ_1 non presentino attività sterolo-isomerasica,⁽⁴⁶⁾ essi sono in grado di legare gli steroli perché almeno il 5% degli amminoacidi, concentrati nella seconda regione idrofobica che costituisce un dominio transmembrana, è comune a quello dell'isomerasi dei lieviti; ciò spiegherebbe perché i recettori σ_1 legano gli steroli pur non avendo attività isomerasica. Benché il recettore sigma-1 umano abbia una sequenza amminoacidica identica per il 93% a quella del murino, il suo "*locus*" codificante ha una differente localizzazione, sul cromosoma 9 nell'uomo e sul cromosoma 4 nel topo.⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾

Grazie agli studi di analisi idropatica della sequenza amminoacidica sono stati proposti due differenti modelli strutturali quello di Mei e Pasternak⁽⁴⁹⁾, secondo i quali la struttura recettoriale σ_1 è caratterizzata da un solo dominio transmembrana le cui regioni *C*-terminale e *N*-terminale, ripiegate a formare delle anse, sono rispettivamente intra ed extracellulare. (Fig. 6). In quello di Aydar e coll.⁽⁵⁰⁾ il modello proposto ha due porzioni transmembrana, un *loop* extracellulare di circa 50 amminoacidi e uno intracellulare *C*-terminale di circa 223 amminoacidi. L'estremità *N*-terminale è molto corta ed è localizzata a livello intracellulare e non extracellulare a differenza di quanto viene sostenuto nel primo modello. La seconda

regione idrofobica (gli amminoacidi Serina 99, Tirosina 103 e Leucina 105, 106) sembra essere importante per il *binding* della (+)-pentazocina.⁽⁵¹⁾ In particolare, mediante studi sito-mutagenesi è stato osservato che si impedisce il *binding* della (+)-pentazocina apportando le seguenti sostituzioni:

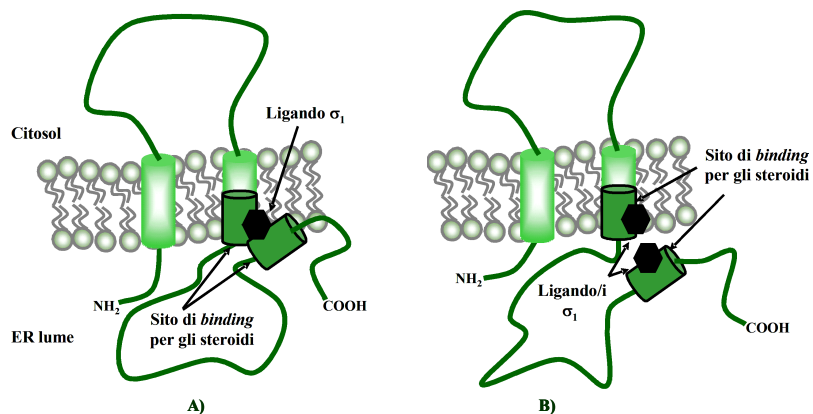
- Serina 99 con Alanina,
- Tirosina 103 con Fenilalanina,
- Leucina 105 e 106 con Alanina.

Fig. 6 A) Modello proposto da Mei e Pasternak; B) Modello proposto da Aydar



Recentemente è stato proposto un ulteriore modello da Pal e coll.⁽⁵²⁾ nel quale oltre alle regioni idrofobiche transmembrana, individuate da Aydar, sono stati identificati due ulteriori segmenti idrofobici, uno dei quali è parzialmente sovrapposto al secondo dominio transmembrana. Questi segmenti rappresenterebbero siti di *binding* degli steroidi (Fig. 7).

Fig. 7 Modello proposto da Pal. In A) e B) sono riportati due possibili modelli di interazione ligando – recettore σ_1 .



4.4 RECETTORE SIGMA-2

Il recettore σ_2 è una proteina di 21,5 kDa la cui struttura non è stata ancora determinata. A differenza dei σ_1 che sono stati selettivamente radiomarcati utilizzando la [^3H] (+)-pentazocina, per i σ_2 non esiste tutt'oggi un radioligando selettivo. Sono marcati utilizzando un ligando σ_1/σ_2 selettivo come la [^3H]1,3-di-*o*-tolilguanidina (DTG), in presenza di un mascherante sigma-1 come la (+)-pentazocina, il destrallorfano o SK&F10,047. I recettori σ_2 analogamente ai σ_1 sono coinvolti nella regolazione dei livelli di calcio, della proliferazione cellulare e della trasmissione dopaminergica. Di seguito tali aspetti saranno trattati più in dettaglio.

4.5 MECCANISMI DI TRASDUZIONE SIGMA-2

4.5.1 Effetti sui livelli intracellulari di calcio

I recettori σ_2 intervengono nell'omeostasi dei livelli di calcio,⁽⁵³⁾ che com'è noto gioca un ruolo importante nella regolazione della proliferazione cellulare. In seguito a stimolazione, indotta da ormoni e/o fattori di crescita, si ha un transiente aumento dei livelli intracitoplasmatici di calcio libero; tale aumento si verifica anche ogniqualvolta l'omeostasi del calcio viene disregolata, determinando conseguentemente un quadro patologico dovuto all'attivazione di proteasi, nucleasi o altri enzimi che degradano i vari componenti cellulari portando a una disfunzione mitocondriale e successivamente a morte. Bowen e coll.⁽⁵⁴⁾ mostrarono, mediante uno studio condotto su linee cellulari SK-N-SH di neuroblastoma, che gli agonisti σ_2 selettivi CB-64D e l'ibogaina determinano un rapido e transiente aumento di calcio che raggiunge il picco nell'arco di 1,5-3 minuti per poi ritornare a valori quasi basali dopo circa 5 minuti. Questo calcio deriva dal *pool* tapsigargina-sensibile presente nel ER. Viceversa, gli agonisti σ_1 selettivi destrallorfano e (+)-pentazocina, non sono in grado di indurre alcun effetto a riguardo. Le cellule trattate con gli agonisti σ_2 per un tempo maggiore di 20 minuti causavano un aumento dei livelli di calcio che si protraeva fino a 1h. Ciò era dovuto alla mobilizzazione di calcio dai depositi intracellulari tapsigargina-insensibili e probabilmente anche dai depositi mitocondriali.

4.5.2 Espressione cellulare e coinvolgimento nella patogenesi di malattie tumorali

Estremamente interessante è l'osservazione secondo la quale i livelli dei recettori σ_2 variano in funzione dello stadio di proliferazione cellulare. Match e coll.⁽⁵⁵⁾ in cellule di adenocarcinoma mammario di topo e differenziando tra cellule quiescenti e cellule in rapida proliferazione, riscontrarono in quest'ultime elevati livelli del recettore σ_2 . Questi recettori sono espressi, analogamente ai σ_1 , non solo dalle cellule sane ma anche da quelle tumorali, in particolare sono stati individuati in linee cellulari di neuroblastomi, gliomi, melanomi, di tumore mammario, prostatico e polmonare⁽⁵⁶⁾. Sebbene siano espresse entrambe le tipologie recettoriali, i σ_2 risultano overespressi, circa 300.000 su 1000.000 di recettori per cellula.

I recettori σ_2 potrebbero quindi contribuire al trattamento di molteplici patologie tumorali e al superamento della farmaco-resistenza verso gli agenti antineoplastici a seguito di differenti e molteplici meccanismi nei quali sono coinvolti. Nello studio condotto da Crawford e coll.⁽⁵⁷⁾ è emerso che l'attivazione σ_2 recettoriale induce apoptosi in diverse linee cellulari di tumore mammario, anche in quelle che risultano essere resistenti agli effetti apoptotici dei classici antitumorali. In particolare, è stato osservato che i ligandi σ_2 selettivi CD-64D e CB-184 inducono apoptosi in modo dose-dipendente in diverse linee cellulari di carcinoma mammario (MCF-7, MCF-7/Adr, SKBr3 e T47D) nelle quali è stata osservata una frammentazione del DNA. Sembra che l'apoptosi σ_2 -mediata sia caspasi-indipendente,⁽⁵⁸⁾ poiché gli inibitori di questa proteasi non riescono a bloccare il processo apoptotico indotto da CB-184 e CB-64D nelle cellule MFC-7. Si suppone che l'apoptosi σ_2 -indotta sia anche indipendente da $p53$ ⁽⁵⁹⁻⁶⁰⁾ in quanto è stato osservato che la potenza citotossica degli agonisti σ_2 non è influenzata dallo stato funzionale o meno di $p53$. Neppure eventuali mutazioni di $p53$ conferiscono resistenza all'apoptosi indotta da agonisti σ_2 . I ligandi σ_2 hanno considerevoli effetti anche sull'espressione di pompe di efflusso. In cellule SK-N-SH di neuroblastoma umano e in cellule C6 di glioma di ratto è stato osservato che gli agonisti σ_2 CB-64D e BD737 riducono l'espressione del gene della resistenza multipla (MDR-1)⁽⁶¹⁻⁶²⁾. L'elevata espressione dei recettori σ_2 in differenti tipologie di linee cellulari tumorali, la capacità degli agonisti σ_2 di inibire la proliferazione cellulare e di indurre apoptosi ha stimolato l'investigazione di questi recettori come possibili *targets* di neoplasie e i loro ligandi come agenti diagnostici tumorali.

4.5.3 Effetti sulla trasmissione dopaminergica

I recettori σ_2 sono coinvolti nella modulazione del rilascio di dopamina e nella patogenesi di deficit cognitivi. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, Couture⁽⁶³⁾ osservarono che gli agonisti σ_2 Lu28-1798, BD1008 e l'ibogaina potenziano la risposta neuronale nella regione CA3 ippocampale di ratto in seguito all'attivazione del recettore NMDA. Invece, in merito ai loro effetti sulla trasmissione dopaminergica,⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾ è stato riscontrato che l'attivazione del recettore σ_2 aumenta il rilascio di [³H]dopamina agendo sul suo trasportatore (DAT). La dopamina dopo aver legato il DAT viene veicolata all'interno della cellula o del neurone, quando siamo in presenza di amfetamina, si osserva una inversione dell'effetto del trasportatore che porta al rilascio del neurotrasmettitore nello spazio extracellulare. Questo effetto di rilascio mediante l'attivazione dei recettori σ_2 è calcio- e PKC-dipendente. La PKCs, dopo essere stata attivata, trasloca e fosforila diverse proteine, ma può anche essere desensibilizzata e/o downregolata, sebbene al momento non si hanno chiare evidenze.

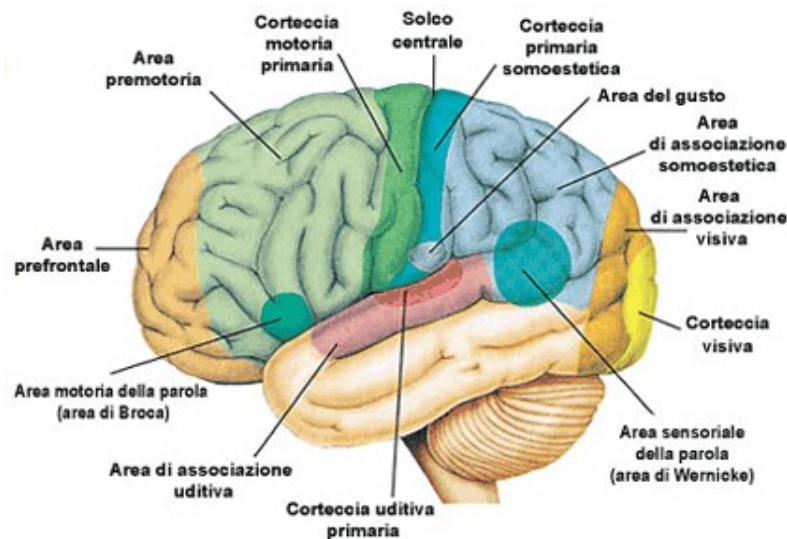
4.6 LOCALIZZAZIONE RECETTORIALE SIGMA-1 E SIGMA-2

Grazie a molteplici tecniche di immunocitochimica e di biologia molecolare è stato possibile determinare la localizzazione dei recettori σ sia nel SNC sia nei tessuti periferici. Perifericamente sono localizzati nel cuore, nella milza⁽⁶⁶⁾, nel fegato, nel tratto gastrointestinale, nei polmoni, nell'occhio, nel rene e negli organi riproduttivi. A livello cardiaco e splenico predominano nettamente i σ_1 (nel cuore oltre l'80%), essendo soprattutto presenti sugli stessi miociti e sui neuroni parasimpatici che innervano l'intera struttura cardiaca;⁽⁶⁷⁾ questa localizzazione rende ragione della loro influenza sulla contrattilità e sull'influsso di calcio. Anche nel fegato, sono presenti considerevoli livelli di entrambe le tipologie recettoriali σ , anche se a livello microsomiale prevalgono i σ_1 , potenzialmente in grado di interagire con molteplici sostanze xenobiotiche. Sono ampiamente espressi nel sistema immunitario, in particolare nei leucociti, nei granulociti, nei timociti e nelle cellule *natural killer* (NK)⁽⁶⁸⁾.

La localizzazione anatomica a livello del SNC (Fi.8) è stata definita mediante l'utilizzo dei seguenti radioligandi, [³H](+)-3-PPP, [³H]-SK&F10,047, [³H]NE-100, [³H](+)-pentazocina e [³H]DTG in presenza di (+)-pentazocina non marcata.⁽⁶⁹⁾ Leitner coll.⁽⁷⁰⁾, prendendo in

esame la distribuzione nel sistema nervoso centrale (SNC), riscontrarono la più alta concentrazione di recettori σ nei nuclei motori del tronco encefalico, nel rombencefalo e nel mesencefalo. Sono espressi anche nei nuclei dei nervi craniali quali facciale, ipoglosso, oculomotore e trigemino. Considerevoli livelli sono stati individuati nello strato piramidale dell'ippocampo e nel giro dentato, i quali sono deputati ai processi di apprendimento e memoria. Significativi quantità sono state rilevate nelle aree limbiche e paralimbiche, quali corteccia prefrontale, bulbo olfattorio, amigdala, ippocampo, nucleo accumbens, talamo e ipotalamo), le quali sono deputate alla modulazione dei comportamenti affettivi ed emozionali. Sono ampiamente presenti in aree deputate sia alle funzioni visive (collicolo superiore e genicolato laterale) sia alle funzioni motorie (nucleo rosso, cervelletto e *substantia nigra*). Gli elevatissimi livelli riscontrati in quest'ultima area potrebbero giustificare gli effetti che essi inducono sulla neurotrasmissione dopaminergica. Sono riccamente localizzati sia in aree neuroendocrine (nuclei sopraottico e paraventricolare) sia nelle radici dorsali dei gangli, coinvolte nella modulazione della trasmissione dolorosa. Inoltre, mediante l'ausilio dei radioligandi [^3H]SK&F10,047 e [^3H](+)-pentazocina, è stato osservato che il sottotipo σ_1 è abbondantemente espresso negli oligodendrociti, nel soma dei neuroni e nella frazione mielinica. Questa loro ampia e diffusa localizzazione rende ragione del ruolo che essi giocano in molteplici meccanismi fisiologici e del ruolo che potrebbero svolgere nella fisiopatologia di numerose malattie o di deficit cognitivi.

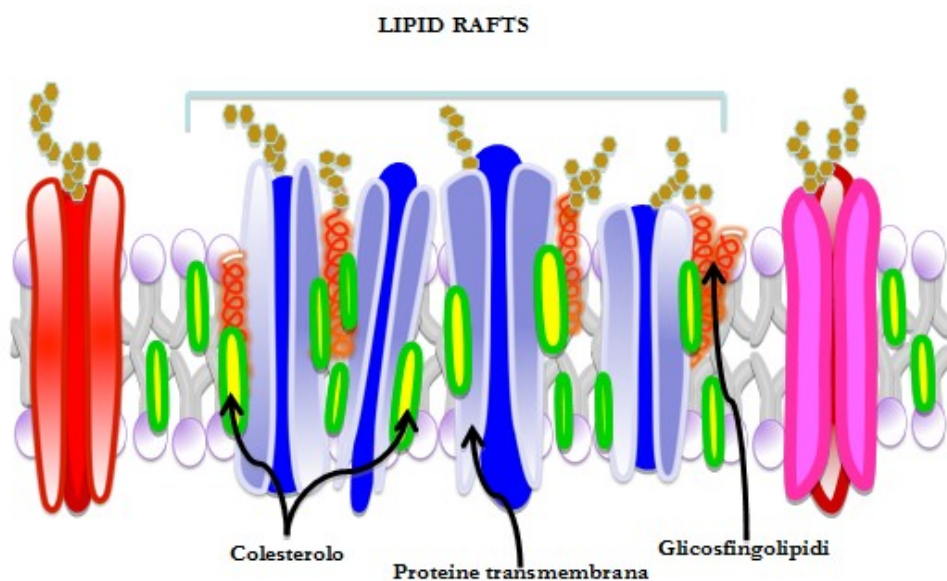
Fig.8 Localizzazione sigma recettoriale nel SNC



4.7 LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE

Numerosi studi di *radioligand binding* e di immunocitochimica hanno documentato la localizzazione subcellulare dei recettori σ_1 . Essi sono presenti nelle membrane microsomiali, sinaptiche e mitocondriali. Elevati livelli sono stati individuati nel reticolo endoplasmatico (ER). In quest'ultimo e nell'*envelope* nucleare essi sono localizzati in *cluster* altamente ricchi di colesterolo, lipidi neutri e sfingolipidi (ceramide, sfingomieline e sfingolipidi), noti come *lipid rafts* (zattere lipidiche)⁽⁷¹⁾ (Fig. 9). I *lipid rafts* sono implicati in molte vie di traduzione del segnale come quelle che regolano l'adesione e la migrazione cellulare, l'organizzazione del citoscheletro, il *sorting* proteico e l'apoptosi. In seguito, è stato proposto che gli stessi recettori σ_1 nella sua regione C-terminale presenta domini di *binding* per il colesterolo⁽⁷²⁾. Anche nell'ER degli oligodendrociti, questi recettori formano *lipid rafts* molto ricchi di galattosilceramide (GalCer)⁽⁷³⁾. Di recente è stato dimostrato che i recettori σ_1 sono prevalentemente espressi in subdomini dell'ER, i quali sono fisicamente associati alla membrana mitocondriale esterna. L'associazione fisica tra il reticolo endoplasmatico e la membrana mitocondriale esterna (OMM) è definita MAM (*mitochondria – associated ER membrane*), a livello della quale il recettore σ_1 si comporta da *chaperone* molecolare.⁽⁷⁴⁾

Fig.9. Lipid rafts



4.8 RECETTORE SIGMA-1 E MAM

Sebbene la MAM sia stata teorizzata nel 1960 la sua identificazione risale ai primi anni '90. È stato stimato che solo una piccola porzione della OMM (~ 12%) sia associata all'ER. Originariamente si riteneva che la distanza tra il reticolo endoplasmatico e la membrana mitocondriale esterna fosse pari a 100 nm, tuttavia studi di tomografia elettronica hanno mostrato una distanza compresa tra 10 e 25 nm la quale favorirebbe la diretta associazione tra le proteine dell'ER e le lipoproteine mitocondriali. La MAM svolge un ruolo fondamentale in diverse funzioni cellulari quali il *signaling* degli ioni calcio, il trasporto dei lipidi, il metabolismo energetico, la sopravvivenza cellulare e il controllo dell'apoptosi. Vitale è la sua attività regolatoria del calcio mitocondriale per la bioenergetica cellulare poiché alcuni enzimi (piruvato deidrogenasi, α -chetoglutarato e isocitrato deidrogenasi) del ciclo di Krebs o ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) e la catena di trasporto degli elettroni sono strettamente calcio-dipendenti per la produzione dell'adenosina trifosfato (ATP). L'ingresso del calcio nei mitocondri è controllato da specifiche proteine residenti a livello della membrana mitocondriale interna (IMM) quali i canali uniporto del calcio e gli antiporti Na^+/H^+ e $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ e della OMM quali i canali del calcio voltaggio-dipendenti (VDAC) (Fig. 10). Sono state identificate numerose proteine MAM-specifiche, quali mitofusina 2, PACS-2, citocromo C, enzimi metabolici come il diacilglicerolo aciltransferasi (DGAT), canali ionici e trasportatori quali la Ca^{2+} -ATPasi, recettori IP₃, VDAC, (Fig.10). La maggior parte di esse sono localizzate nell'ER, mentre solo poche sono presenti nei mitocondri. Di particolare importanza è la presenza di molteplici *chaperoni* molecolari quali la *Binding immunoglobulin protein* (Bip), la Calnexina, la Calreticulina, Grp75, ERp44, ERp47, hsp60 e FKBP12, ecc). Hayashi e coll.⁽⁷⁵⁾ hanno dimostrato che anche il recettore σ_1 risiede a livello della MAM dove modula il flusso di ioni Ca^{2+} dall'ER ai mitocondri, agendo da *chaperone* molecolare dei recettori IP₃. Nello specifico solo la sequenza amminoacidica 113-123 svolge questa funzione. In condizioni fisiologiche, nelle quali la concentrazione di calcio nel lume citoplasmatico dell'ER è pari a 0.5-1 nM, esso si trova sotto forma di complesso con un'altra proteina ER *chaperone* il Bip, o GRP78 (Fig.10). In seguito all'attivazione dei recettori IP₃ di tipo 1 e 3, si ha una diminuzione della concentrazione di ioni Ca^{++} nella MAM e il recettore σ_1 si dissocia dal Bip per legarsi al recettore dell'inositolo 1,4,5-trifosfato (IP₃) di tipo 3 ed espletare l'attività *chaperonina*. Tale legame evita che quest'ultimo, divenuto instabile poiché

iperstimolato da una aumentata concentrazione intracitoplasmatica divenga ubiquitinato e degradato dal proteosoma (Fig. 11). Il recettore σ_1 assicura così il corretto *signaling* del calcio dal reticolo endoplasmatico al mitocondrio pertanto, i neuroni danneggiati potrebbero trarre beneficio dagli agonisti σ_1 . Il successivo riempimento dei depositi intracitoplasmatici di calcio inattiva lo *chaperone* σ_1 mediante la riassociazione al Bip. È importante sottolineare come l'attività *chaperonina* σ_1 recettoriale sia modulata da agonisti e antagonisti. Pentazocina e SK&F 10.047 favoriscono l'attività di *chaperone* sostenendo la dissociazione del complesso σ_1 -Bip, mentre gli antagonisti NE-100 e aloperidolo rafforzando questa associazione e inibendo completamente la dissociazione indotta dagli agonisti minimizzano l'attività di *chaperone*. Il recettore σ_1 ha un'attività *chaperonina* molto diversa da quella dei classici *chaperoni* molecolari, la cui principale funzione è quella di mantenere l'esatta struttura proteica assicurandone il corretto *folding*, prevenendo associazioni non corrette e aggregando catene polipeptidiche non ripiegate, in condizioni sia fisiologiche sia di stress.

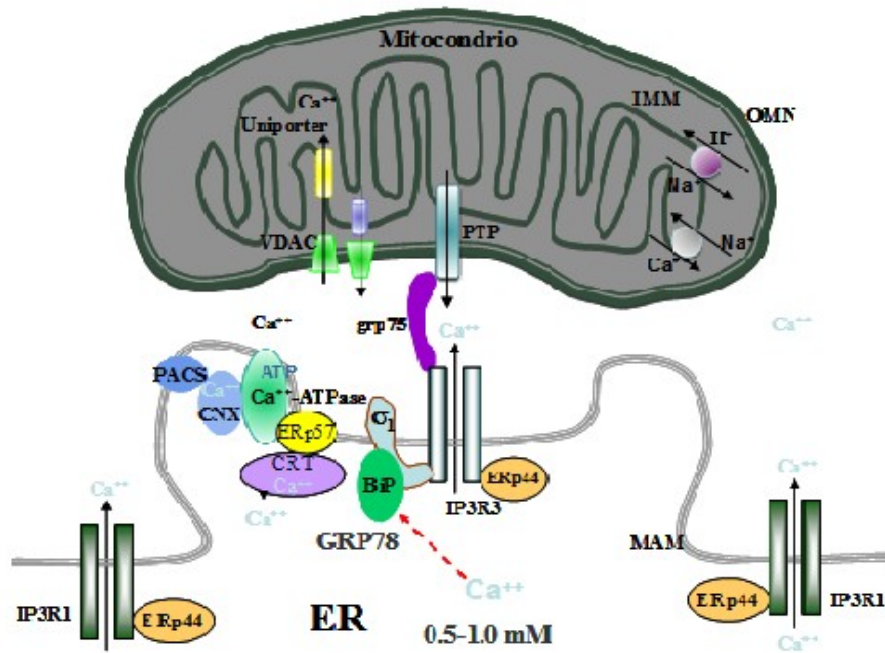


Fig.10 Associazione recettore σ_1 -Bip

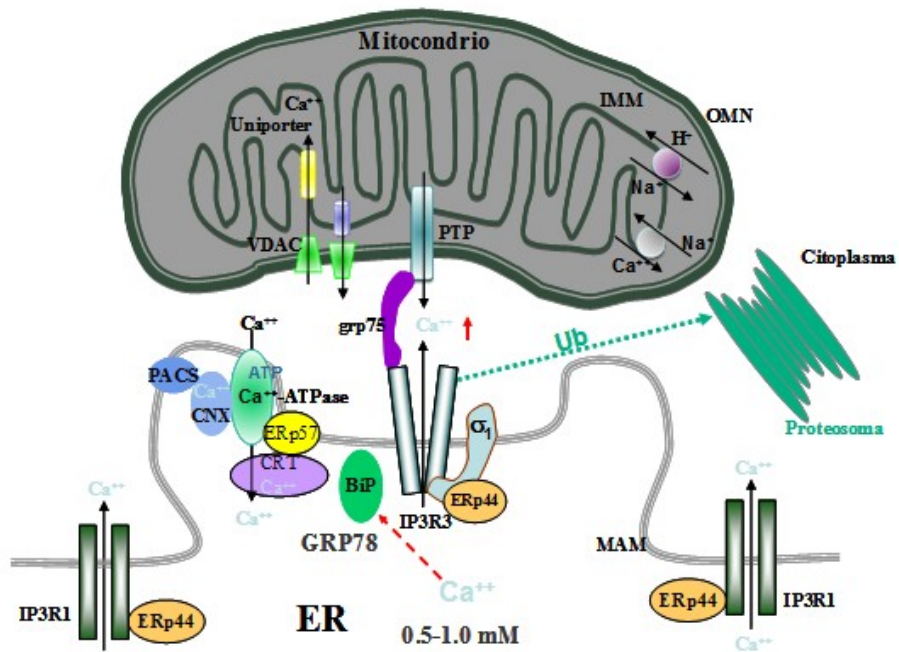


Fig. 11 Dissociazione recettore σ_1 -Bip

4.9 MECCANISMO DI TRASDUZIONE SIGMA-1

4.9.1 Effetti sul turnover dei fosfoinositidi

Gli agonisti σ_1 (+)SK&F 10,047, (+)-pentazocina e DTG e l'antagonista aloperidolo inibiscono il turnover dei fosfoinositidi nell'intestino e nel cervello a livello sinaptosomiale. Dal 1992 numerose ricerche hanno investigato la relazione tra i recettori σ_1 e il metabolismo dei fosfoinositidi via fosfolipasi C (PLC), tuttavia, l'esatto meccanismo di questa regolazione non è stato ancora chiarito.⁽⁷⁶⁾

4.9.2 Effetti sulla trasmissione glutammatergica

Studi di neurochimica e di elettrofisiologia hanno indicato che a livello del SNC i recettori σ_1 hanno un ruolo modulatorio sull'attività del recettore NMDA⁽⁷⁷⁾ e sono coinvolti nei meccanismi responsabili dell'eccitabilità neuronale e nel rilascio del glutammato.⁽⁷⁸⁾ Quest'ultimo insieme al calcio gioca un importante ruolo nei processi di plasticità neuronale, di invecchiamento, di apprendimento e memoria, soprattutto nel processo di potenziamento a lungo termine (LTP)⁽⁷⁹⁾. È stato suggerito che i recettori σ_1 incidono sul funzionamento del recettore NMDA, essi hanno osservato che concentrazioni μM di (+)-pentazocina, DTG e aloperidolo riducono in modo concentrazione-dipendente l'aumento di Ca^{2+} mediato dal recettore NMDA. Successivamente, Monnet⁽⁸⁰⁾ e Hayashi⁽⁸¹⁾ mediante la somministrazione intravenosa di DTG dimostrarono come esso potenzia l'attivazione NMDA-indotta dei neuroni piramidali CA3. Simili risultati furono ottenuti con altri agonisti σ , invece, con gli antagonisti aloperidolo, NE-100 e BMY 14802 non è stato osservato alcun effetto. Klette coll.⁽⁸²⁾, hanno riportato che il destrometorfano, il (+)-SK&F10,047 e la (+)-pentazocina agendo sui recettori σ_1 inducevano un breve effetto inibitorio sull'incremento della concentrazione di Ca^{2+} NMDA-indotto, mentre il DTG e l'aloferidolo erano praticamente inattivi. In seguito, Ellis⁽⁸³⁾ suggerirono che i ligandi σ_1 possono anche modulare il rilascio di glutammato. Essi riportarono che l'aloferidolo, l'aloferidolo ridotto, il rimcazolo e l'ifenprodil erano in grado di ridurre, ma solo ad alte concentrazioni, il rilascio di glutammato endogeno, potassio-indotto, da porzioni striatali di ratto.

4.9.3 Effetti sulla trasmissione colinergica

Numerose evidenze correlano i recettori σ_1 alla regolazione dei processi colinergici. Essi giocano un ruolo modulatore nell'attività della trasmissione colinergica a livello cerebrale. I ligandi (+)-SK&F 10,047, DTG e igmesina hanno mostrato di aumentare il rilascio di acetilcolina (ACh) in differenti modelli *in vitro* e *in vivo*. *In vitro* è stato osservato che il rilascio di ACh da fettine di striato e di ippocampo di ratto, è modulato da agonisti σ_1 selettivi. Invece, mediante uno studio *in vivo* di microdialisi, Matsuno e coll. ⁽⁸⁴⁻⁸⁵⁾ hanno mostrato che i livelli extracellulari di ACh nella corteccia prefrontale del ratto, ma non nello striato, sono incrementati dagli agonisti σ_1 DTG, (+)-pentazocina, (+)-3-PPP, (+)-SK&F10,047 e (1-(3,4-dimetossifenetil)-4-(3-fenilpropil)piperazina) (SA4503). L'effetto di quest'ultimo, confermato da Horan⁽⁸⁶⁾ e coll., veniva potenziato dalla concomitante associazione con (+)-SK&F10,047⁽⁸⁷⁾ inducendo un incremento del rilascio di ACh dalla corteccia prefrontale e riducendo l'amnesia scopolamina-indotta. Studi di microdialisi permisero di osservare come l'applicazione subcutanea di (+)-SK&F 10,047 e di DTG aumentava il rilascio di ACh dalla corteccia prefrontale, rilascio inibito dall'aloiperidolo.

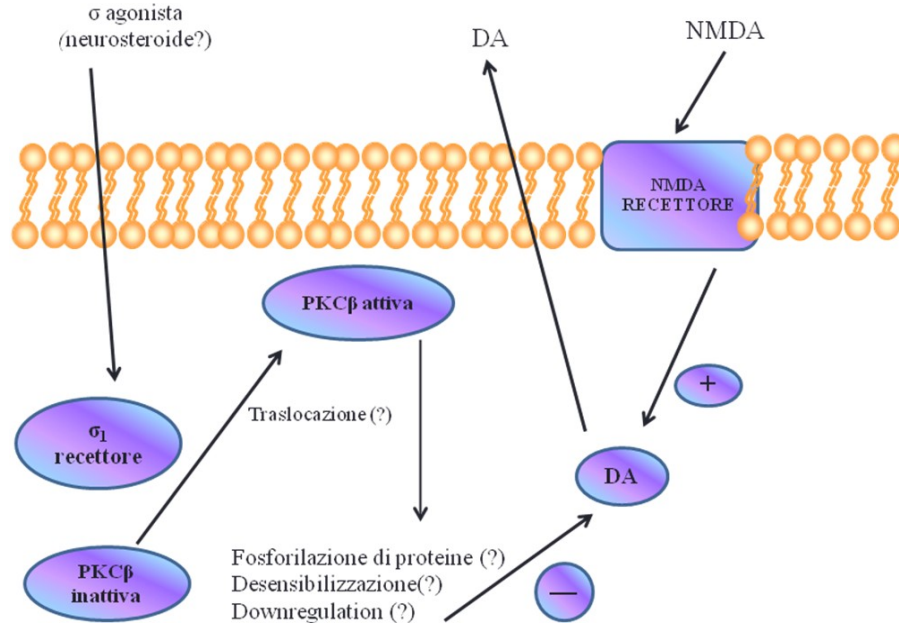
4.9.4 Effetti sulla trasmissione dopaminergica

I recettori σ sono ampiamente presenti nella sostanza nera e nel nucleo accumbens, di conseguenza, i ligandi σ sono stati testati sia sull'attività neuronale dopaminergica, sia sul rilascio di dopamina. La somministrazione degli agonisti σ_1 quali (+)-pentazocina e (+)-SK&F10,047 aumenta il rilascio di dopamina nello striato e nella corteccia prefrontale⁽⁸⁸⁾, effetto successivamente confermato anche da Booth e Baldessarini.⁽⁸⁹⁾ Essi riportarono che in preparazioni striatali di ratto i suddetti composti erano in grado di stimolare la sintesi di dopamina, la quale veniva antagonizzata da ligandi come il BMY 14802.⁽⁹⁰⁻⁹¹⁾ Nuwayhid⁽⁹²⁾ osservò che gli agonisti σ_1 inibiscono il rilascio di [³H]dopamina NMDA-indotto da porzioni striatali di ratto e di cavia, dal nucleo accumbens e dalla corteccia prefrontale. L'inibizione del rilascio veniva bloccata dagli antagonisti σ_1 selettivi aloiperidolo e DuP734. La regolazione del rilascio vescicolare di dopamina da parte dei σ_1 ⁽⁹³⁾ (Fig. 12) è dipendente dalla protein chinasi beta (PKC β). In particolare la PCKs, costituita dalle subunità α , β e γ che è calcio-dipendente e generalmente trasloca dopo essere stata attivata, tuttavia, potrebbero

essere coinvolti anche altri meccanismi come la fosforilazione di proteine, una sua desensibilizzazione o una *downregulation*. Si potrebbe perciò postulare la fosforilazione di una proteina vescicolare o di un'altra proteina sempre coinvolta nel processo di esocitosi, in quanto il rilascio di dopamina, NMDA-indotto, è inibito dall'attivazione σ_1 recettoriale (FIG.12).

Gudelski⁽⁹⁴⁾ misurò le concentrazioni extracellulari di dopamina nello striato in seguito a infusione intrastriatale di ligandi σ e trovò che la (+)-pentazocina, a concentrazioni 300 μ M e 1mM, produce una risposta bifasica, essa inizialmente determina un incremento del rilascio di dopamina (circa il 20%) e, in seguito un prolungato decremento (circa il 65%). Effetti simili sono stati osservati con il DTG, invece, con il 3-(2-carbossipiperazina-4-il)propil-1-acido fosforico (CPP), che è un'antagonista NMDA, si ha il blocco dell'incremento iniziale, ma non l'inibizione prodotta dagli agonisti σ .

Fig.12



4.9.5 Effetti modulatori di canali ionici

I recettori σ svolgono un ruolo modulatorio nell'attività di alcuni canali ionici (K^+ e Ca^{++}). Gli agonisti σ_1 selettivi (+)-pentazocina e igmesina riducono in cellule melanotropiche di rana il flusso-corrente del potassio⁽⁹⁵⁾, inoltre, essi impediscono in fettine ippocampali di

ratto l'attivazione dei canali del potassio, calcio-dipendenti a bassa conduttanza (SK_{Ca}).⁽⁹⁶⁾ Questi effetti vengono reversati dagli antagonisti σ_1 aloperidolo e NE-100. L'altra famiglia di canali ionici modulata dai recettori σ_1 è quella degli ioni calcio. I ligandi σ_1 riducono l'incremento della concentrazione intracellulare di calcio, depolarizzazione mediata, in colture neuronali.⁽⁹⁷⁾ Invece, gli agonisti σ_1 , (+)-pentazocina e il 2-(4-morpholinethyl)1-phenylcyclohexanecarboxylate (PRE084), inducono un'effetto opposto sull'incremento della concentrazione intracellulare di calcio, depolarizzazione mediata, in cellule ibride di neuroblastoma-glioma (NG 108).⁽⁹⁸⁾ Considerando che i dati ottenuti sono piuttosto controversi, risulta chiaro come tutt'oggi sono in corso numerosi studi al fine di chiarire quale sia il ruolo di questi recettori nella funzionalità dei VDAC.

4.9.6 Sinaptogenesi e plasticità neuronale

I recettori σ_1 controllano la traslocazione/attivazione delle proteine chinasiche A e C, le quali giocano un importante ruolo nella regolazione del gene *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) e nella plasticità neuronale. Tsai e coll. hanno osservato che i suddetti recettori promuovono lo sviluppo dendritico e la maturazione delle spine dendritiche.⁽⁹⁹⁾ Il meccanismo che sta alla base della regolazione sinaptogenica σ_1 -mediata, sembra coinvolgere la regolazione della produzione e dell'attività dei ROS. In particolare, recenti studi hanno suggerito che i recettori σ_1 sembrano intrinsecamente sopprimere la formazione e l'accumulo cellulare di ROS dal momento che il *knockdown* σ_1 recettoriale di per sé può promuovere l'accumulo di ROS.⁽¹⁰⁰⁾ La fonte dei ROS generata da questo *knockdown* non è stata identificata, ma è probabile che possa coinvolgere sia i mitocondri che l'ER. Tutto ciò è avvalorato dall'osservazione che una loro *upregulation* porta a soppressione dello stress ossidativo promuovendo la sopravvivenza cellulare.⁽¹⁰⁰⁾

La perdita σ_1 recettoriale oltre ad un accumulo di ROS, comporta l'attivazione della caspasi 3 e la degradazione ROS-indotta del Tiam1, un attivatore selettivo della Rac, una **GTPasi** della superfamiglia RAS.^(99,100)

4.9.7 Regolazione del *signaling* del calcio

Come già descritto, i recettori σ_1 agendo da *chaperoni* molecolari dei recettori IP3, modulano il flusso di ioni Ca^{2+} dall'ER ai mitocondri. Numerosi studi hanno evidenziato che

questi recettori nel ER delle cellule NG 108 formano, a livello dei *lipid rafts* un complesso trimetrico con una proteina adattatrice del citoscheletro l'anchirina (isoforma ANK220) e, con il recettore IP3. Questo complesso inibisce il rilascio di calcio IP3-mediato. Gli agonisti σ_1 causano una dissociazione dal recettore IP3 del complesso recettore σ_1 -anchirina, il quale trasloca sul plasmalemma o sulla membrana nucleare, permettendo all'IP3 di legarsi al suo recettore e incrementare il rilascio di calcio. In presenza di un antagonista σ_1 , l'anchirina rimane legata al recettore IP3, ma il recettore sigma-1 si dissocia dal complesso impedendo il potenziamento dell'efflusso di calcio.⁽¹⁰¹⁾ I recettori σ_1 , inoltre, sono in grado di attivare la cascata, calcio-dipendente, della fosfolipasi C-proteina chinasi C (PLC-PKC), facilitando l'influsso di calcio e il suo rilascio dai depositi intracellulari del reticolo endoplasmatico.⁽¹⁰²⁾ Uno dei principali ruoli dei recettori σ_1 è pertanto la modulazione dell'omeostasi dei livelli di calcio, agendo alla stregua di modulatori dei processi indotti dal calcio.

4.10 RECETTORI SIGMA-1 E NEUROPROTEZIONE

È stato dimostrato come gli agonisti σ_1 esercitino potenti effetti neuroprotettivi in diverse tipologie cellulari come neuroni cerebrali primari, cellule gangliari retiniche e in particolare nelle cellule cristalliniche oculari⁽¹⁰³⁾. A metà degli anni '90 era stato suggerito il coinvolgimento del recettore σ_1 nei meccanismi che mediano la neuroprotezione, sebbene rimangano molteplici aspetti da elucidare. DeCoster e coll. hanno osservato che nei neuroni corticali di ratto trattati con glutammato, i ligandi (+)-pentazocina, DTG, aloperidolo, (+)-SK&F 10,047 espletavano un effetto neuroprotettivo poiché contrastavano l'incremento del rilascio della lattato deidrogenasi (LDH) e i cambiamenti morfologici indotti.⁽¹⁰⁴⁾

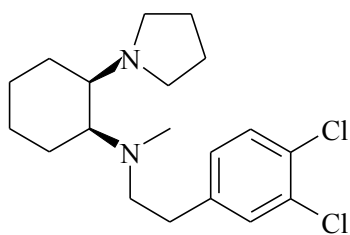
Alcuni anni dopo, Kato e coll.⁽¹⁰⁵⁾ hanno riportato che il donepezil, un'inibitore dell'acetilcolinesterasi, presenta una affinità significativa per il recettore σ ($IC_{50} = 14,06 \pm 0,5$ nM) ed è in grado, nelle cellule PC12, di potenziare la crescita neuritica indotta dal fattore di crescita nervoso (NGF). Questa azione è bloccata dall'antagonista σ_1 selettivo NE-100 e dalla xestospongina C, un antagonista selettivo del recettore IP3.⁽¹⁰⁶⁾ Recentemente sono stati riportati gli effetti neuroprotettivi degli enantiomeri del ligando σ selettivo *cis*-(\pm)-metil (1*R*,2*S*/1*S*,2*R*)-2-[(4-idrossi-4-fenilpiperidin-1-il)metil]-1-(4-metilfenil)ciclopropancarbossilato [(\pm)-PPCC]. In colture primarie di astrociti esposte al glutammato, entrambi gli enantiomeri

sono stati in grado di ristabilire lo *status* ossidativo ripristinando i livelli fisiologici di glutazione e di ROS.⁽¹⁰⁷⁾ Rilevante è anche l'effetto neuroprotettivo esercitato dall'agonista sigma-1 PRE084. Esso a livello ippocampale attenua la perossidazione lipidica β -amiloide 25-35-indotta. Tale effetto viene bloccato dagli antagonisti σ_1 .⁽¹⁰⁸⁾ Un dato analogo era già stato ottenuto precedentemente in uno studio condotto in neuroni corticali di ratto. Dopo una prolungata esposizione alla $A\beta_{25-35}$, in presenza della dizocilpina e del 6,7-dinitrochinossalin-2,3-dione, antagonisti NMDA e AMPA rispettivamente era stata osservata l'espressione del gene proapoptotico Bax e morte neuronale. Quest'ultimo effetto veniva sostanzialmente attenuato dal PRE084, la cui azione era antagonizzata da NE-100.⁽¹⁰⁹⁾ Ciò evidenzia come la protezione cellulare sia una delle principali azioni biologiche dei recettori σ_1 . Un'azione avvalorata dall'osservazione che la vulnerabilità cellulare alla $A\beta_{25-35}$, allo stress ossidativo e alla perdita di glucosio sono incrementate dal *knockdown* σ_1 recettoriale. L'effetto citoprotettivo dei recettori σ_1 è mediato dalla *upregulation* trascrizionale, ROS-dipendente, del gene antiapoptotico Bcl-2. In particolare, il *knockdown* σ_1 promuove l'*upregulation* di *p105*, precursore del fattore trascrizionale NF-kB e determina un accumulo di ROS, il quale induce una *downregulation* di Bcl-2 mediante attivazione del fattore di trascrizione NF-kB.
(110)

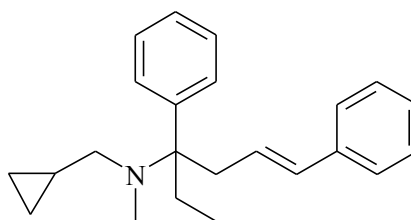
4.11 LIGANDI SIGMA

I recettori σ rappresentano una particolare tipologia di recettori perché sono in grado di legare, anche se con un diverso grado di affinità, una nutrita varietà di composti appartenenti a diverse classi chimico-farmacologiche, quali neurolettici (butirrofenoni, fenotiazine, tioxantine), ansiolitici, antidepressivi triciclici, inibitori della monoammino-ossidasi, anticolinergici, inibitori della citocromo-ossidasi e steroidi. In seguito alla scoperta dei composti capostipiti appartenenti alla classe dei (+)-benzomorfoloni, i quali hanno rappresentato i composti guida per lo sviluppo di nuovi e più selettivi ligandi σ , sono stati sintetizzati numerosissimi ligandi σ selettivi e non, sia agonisti come il DTG, la (+)-pentazocina, il BD.737, l'igmesina, il PRE084 e l'SA4503 sia antagonisti quali l'aloiperidolo, il NE-100, il BD-1047 e DuP734.

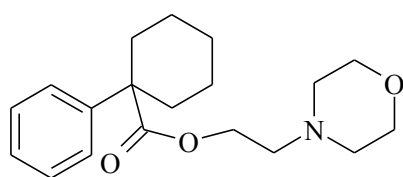
Agonisti sigma-1 selettivi



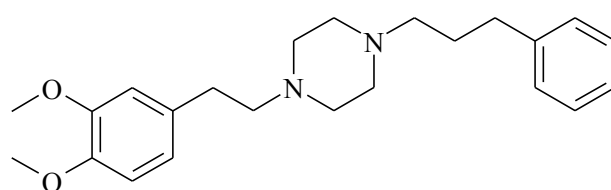
BD737



Igmesina

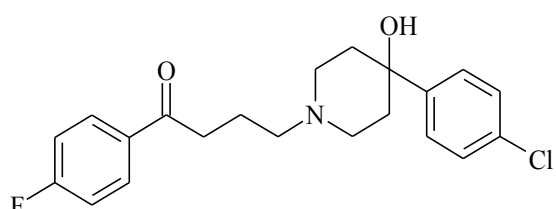


PRE-084

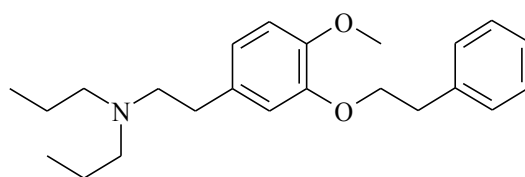


SA4503

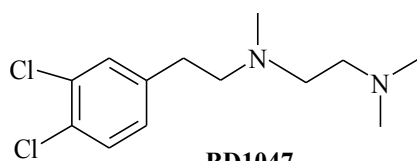
Antagonisti sigma-1 selettivi



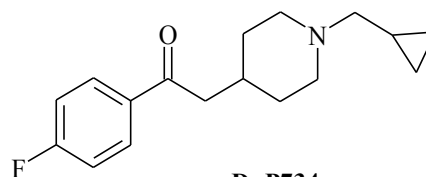
Aloperidolo



NE-100

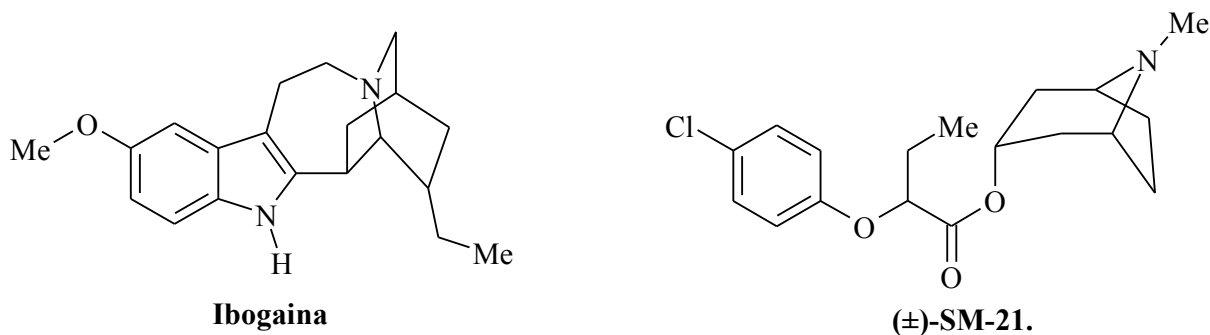


BD1047



DuP734

Decisamente minore è il numero di ligandi σ_2 selettivi attualmente presenti, tra questi ricordiamo i derivati fenilmorfanici CB-64D e CB-184, l'alcaloide ibogaina, e il derivato tropanico (\pm)-SM-21.

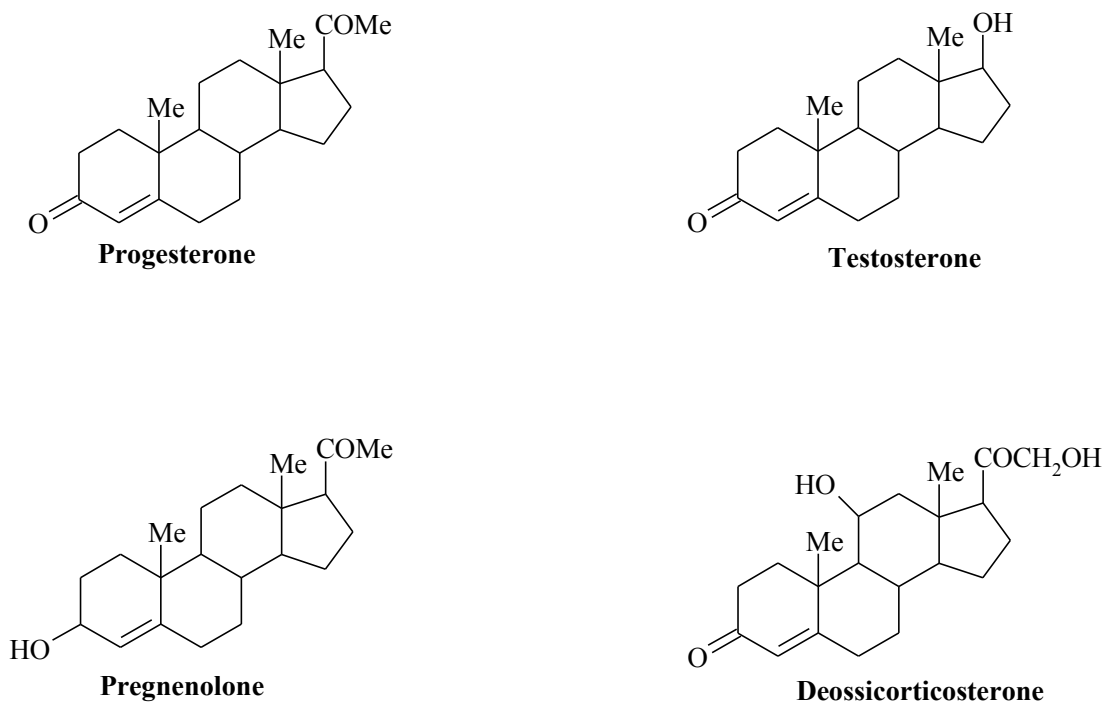


4.12 LIGANDI ENDOGENI

Nonostante i numerosi progressi fatti nel lungo *iter* di identificazione e caratterizzazione dei recettori σ , non è ancora stato individuato con certezza un ligando endogeno, sebbene siano state avanzate diverse ipotesi sui possibili candidati. L'identificazione di un ligando endogeno potrebbe sicuramente aiutare a chiarire quale sia il ruolo svolto dai recettori σ sulle funzioni cerebrali fisiologiche e patofisiologiche. Un notevole numero di peptidi, di amminoacidi e di neurotrasmettitori non sono in grado di spiazzare ligandi sigma selettivi; tra questi bisogna ricordare la serotonina, la norepinefrina, la dopamina, l'istamina, l'aspartato, la cisteina, le endorfine, le dinorfine, le encefaline e la sostanza P.⁽¹¹¹⁾ La ricerca di un ligando endogeno ha condotto alla scoperta di alcuni neurosteroidi⁽¹¹²⁾ sigma-affini. Yamada e coll. per primi osservarono che il progesterone⁽¹¹³⁾ (Fig. 13) esibiva un'affinità nanomolare per i siti σ presenti nel cervello di cavia e nella milza. L'interazione progesterone/recettori σ , così come quella del testosterone (Fig. 13) è di tipo competitivo; essi sono inibitori competitivi del [³H](+)-SK&F10,047 e si legano allo stesso sito dei classici ligandi σ . Anche altri steroidi quali pregnenolone solfato (Fig. 13) e deossicorticosterone esibivano affinità per i siti σ . Alcune evidenze sperimentali suggerirono come possibile ligando endogeno sigma agonista il neuropeptide Y (NPY)⁽¹¹⁴⁾. Agli inizi degli anni '90 Roman e coll.⁽¹¹⁵⁾, mediante studi di *binding*, avevano mostrato che i peptidi NPY e

YY, esibivano un'elevata affinità σ ed erano in grado di spiazzare l' [^3H](+)-SK&F10,047, tuttavia i dati da loro ottenuti non sono stati riprodotti da altri laboratori di ricerca.

Fig. 13

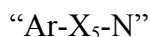


4.13 MODELLO FARMACOFORICO SIGMA-1 RECETTORIALE

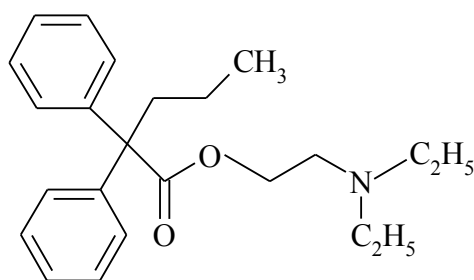
La capacità dei recettori σ di legare, anche se con un diverso grado di affinità, una numerosa varietà di composti strutturalmente differenti, suggerisce che essi siano delle strutture dinamiche sufficientemente flessibili. Pertanto sono stati condotti numerosi studi al fine di identificare i gruppi farmacoforici e di costruire i relativi modelli. Affinché un farmaco o più in generale un ligando (L), si leghi al suo recettore in modo stereospecifico è necessario che gruppi funzionali presenti sul ligando interagiscano con gruppi funzionali complementari presenti sul sito recettoriale. Numerose ricerche hanno tentato di trovare un modello farmacoforico generale che potesse spiegare il *binding* dei diversi ligandi, in modo da definire le correlazioni struttura attività (SAR). Nel corso degli anni sono stati proposti diversi modelli

dei quali ricordiamo il modello di Largent, quello di Manallack, di Gilligan fino ad arrivare all'ultimo proposto da Glennon e Ablordeppey.⁽¹¹⁷⁾

Glennon e Ablordeppey dopo aver passato in rassegna una cospicua serie di composti osservarono che quelli σ affini presentavano una arile (Ar) o una regione idrofobica separata da un'ammina basica terziaria (N) mediante una catena a 5 atomi. Il farmacoforo, da essi individuato, fu schematizzato nel seguente modo:



dove X è il gruppo spaziatore che poteva essere lineare o ramificato (includendo la presenza di saturazioni e di strutture cicliche), poteva anche contenere gruppi chetonici o amminici. L'affinità di *binding* veniva influenzata considerevolmente non tanto dalla natura dello *spacer*, ma piuttosto dalla sua lunghezza. Emblematico fu l'esempio dell'SK&F-525A, inibitore della citocromo-ossigenasi epatica che mostrava di legarsi con elevata affinità ai recettori σ_1 ($K_{i\sigma_1} < 10$ nM; $K_{i\sigma_2} = 200$ nM). Esso possiede una struttura arilica separata dall'ammina mediante una catena di 5 atomi contenente una funzione esterea.



SK&F-525A

Fu osservato che l'affinità più elevata era associata alla presenza di una catena alchilica e in particolare a quella pentilica. Alla luce di tutto ciò, il modello originariamente proposto fu successivamente modificato in "Ar-C₅-N". In seguito alla revisione del modello, essi affermarono che "Ar" non doveva essere necessariamente un anello aromatico, ma la sua interazione con il recettore era sempre chiaramente di natura idrofobica; "C₅" non doveva necessariamente essere formato da 5 atomi di carbonio, ma la lunghezza poteva essere variabile in quanto esisteva nella porzione adiacente una regione di "*bulk tolerance*" (Fig. 14)

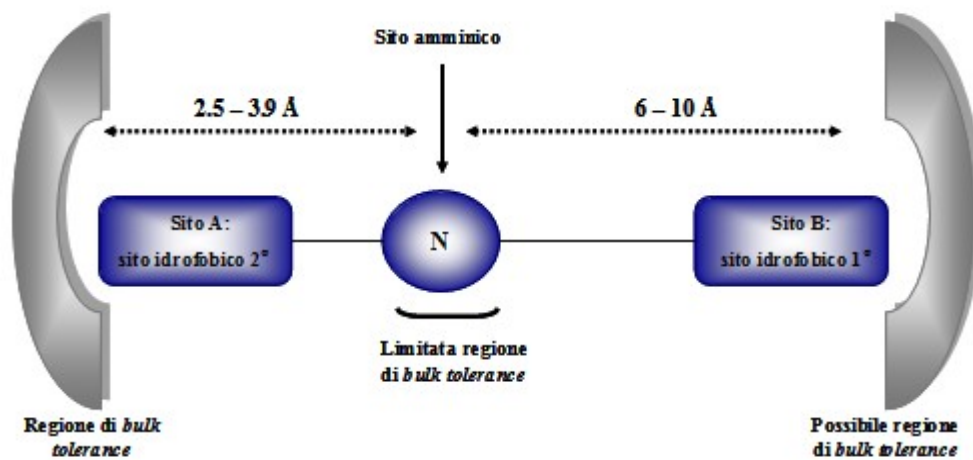


Fig. 14 Modello farmacoforico σ_1 recettoriale proposto da Glennon e Ablordeppey

5.LIGANDI MULTITARGET

Considerando i complessi *networks* biologici coinvolti nell'eziopatogenesi di numerose malattie, appare chiaro come il tradizionale approccio “*one molecule-one target*” (farmaco in grado di agire su un solo *target*) non sempre rappresenta la terapia ottimale, così come la somministrazione di un farmaco multicomponente (formulazione contenente due o più principi attivi). Una possibile strategia alternativa potrebbe essere rappresentata dallo sviluppo di una singola entità chimica capace di modulare contemporaneamente e selettivamente più *targets*. La progettazione razionale di una molecola in grado di rispondere a questi presupposti è il *designed multiple ligands* (DML).⁽¹¹⁷⁾ Rispetto ai farmaci *monotargets*, i DML potrebbero essere dotati di una maggiore efficacia terapeutica, di regimi di dosaggio semplificati, un migliore profilo farmacocinetico e una maggiore *compliance* del paziente ovviando il problema dell'interazione tra farmaci. Chiaramente lo sviluppo di tali ligandi richiede una maggiore complessità nella fase di progettazione e di ottimizzazione del profilo bio-farmacologico, tuttavia, nel caso in cui i ligandi utilizzati siano già stati caratterizzati, le difficoltà associate sono ovviate da un iter più rapido e meno costoso rispetto a quello caratterizzante la scoperta di un nuovo farmaco. Nonostante ciò, i rischi e i costi di sviluppo in linea di principio non sono diversi da quelli per l'ottenimento di qualsiasi altro farmaco. Le strategie impiegate nella fase progettuale sono principalmente due, lo *screening approach* e lo *knowledge-based approach*.⁽¹¹⁸⁾ Lo *screening approach* è quello più comunemente utilizzato, esso prevede la consultazione di dati già esistenti, in particolare si possono esaminare librerie di composti strutturalmente diversi (*diversity screening*) soprattutto mediante il *high-throughput screening* (HTS) oppure classi di composti (*focused screening*), i quali sono già attivi su uno dei *targets* di interesse e sono esaminati su un altro target. In seguito a questo *screening* è possibile individuare un composto che sia diversamente attivo su due *targets*, per cui esso richiede un *balancing* al fine di ottimizzare le due attività e ottenere il profilo desiderato. Un'altra possibilità è trovare un composto che sia attivo su due *targets* specifici e anche su uno o più *targets* non desiderati. In questo caso lo scopo della ricerca è il mantenimento della specificità richiesta e la rimozione degli effetti sui *targets* non richiesti (*designing out*).

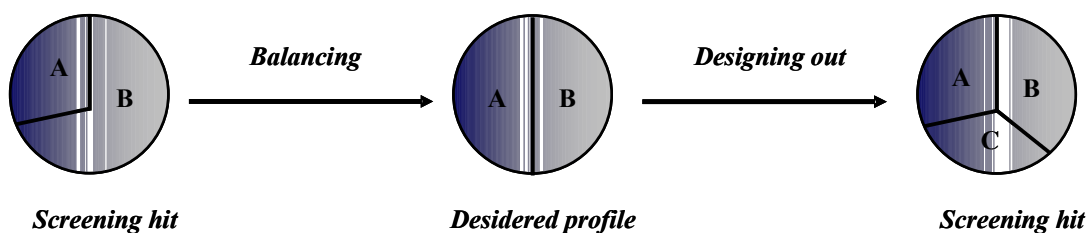


Fig. 15 *Screening approach*

Lo *knowledge-based approach*, conosciuta anche come *framework combination*, prevede la combinazione in una singola struttura (*design in*) di elementi farmacoforici appartenenti a due ligandi molto selettivi verso i rispettivi *targets*. I risultanti ligandi *multi-target* sono definiti *linked*, *fused* o *merged* in funzione del tipo di combinazione effettuata (Fig. 16).⁽¹¹⁸⁾ Nei DML di tipo *linked*, i *frameworks* sono uniti da un legame (*link*) che può essere clivabile o non clivabile e non è presente nei ligandi selettivi di partenza. I *fused* sono ottenuti instaurando un opportuno legame tra i farmacofori presenti nei composti originari, pertanto i rispettivi *frameworks* sono direttamente attaccati. Infine, per la realizzazione dei ligandi di tipo *merged*, si integrano elementi strutturali comuni alle molecole di partenza nella misura in cui i *frameworks* sono fusi insieme.

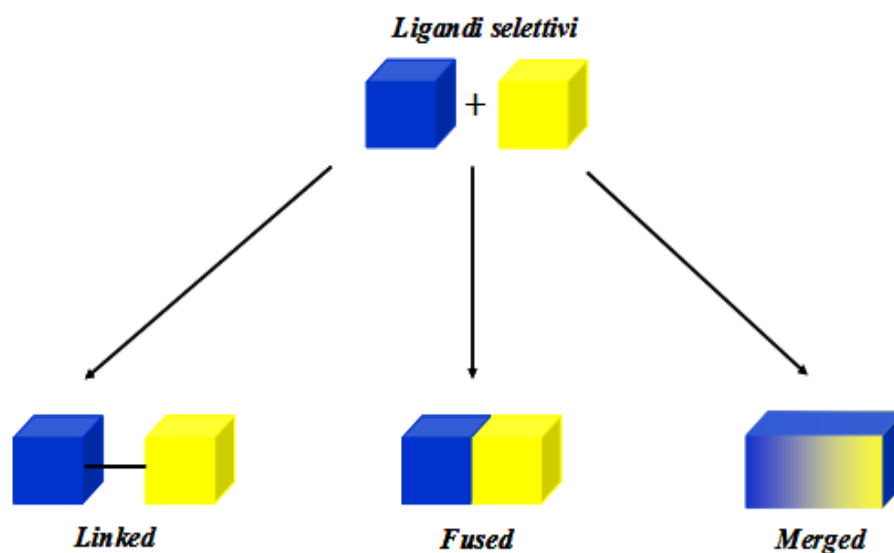


Fig. 16 *Knowledge-based approach*. Ligandi multitarget derivanti da ligandi selettivi

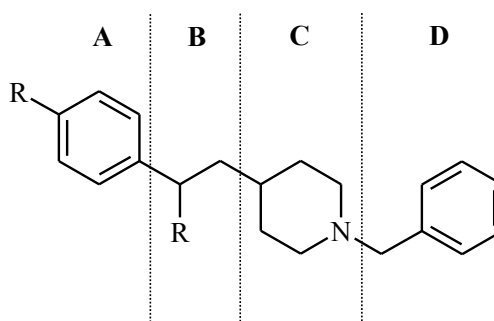
6. Progettazione razionale

Numerose ricerche hanno messo in luce l'importanza dei ROS nell'insorgenza e nella progressione delle malattie neurodegenerative, pertanto lo sviluppo del mio progetto di ricerca è stato finalizzato alla progettazione di agonisti σ_1 selettivi dotati di attività antiossidante (*bifunctional ligands*). La scelta del recettore σ_1 come target è data dal suo coinvolgimento nei processi che mediano neuroprotezione. Diversi *reports*, infatti, documentano la sua partecipazione nei meccanismi di protezione cellulare. Il donepezil, un'inibitore dell'acetilcolinesterasi attualmente in uso clinico, presenta una affinità significativa per il recettore σ ($IC_{50} = 14,06 \pm 0,5$ nM) ed è in grado, nelle cellule PC12, di potenziare la crescita neuritica indotta dal fattore di crescita nervoso (NGF). Quest'azione è bloccata dall'antagonista σ_1 selettivo NE-100 e dalla xestospongina C, un antagonista selettivo del recettore IP3. Nel 2007 Hayashi e coll. hanno dimostrato che il recettore σ_1 risiede a livello della MAM, dove agendo da *chaperone* molecolare dei recettori IP3, modula il flusso di ioni Ca^{2+} dall'ER ai mitocondri.⁽¹¹⁹⁾

I composti sono stati progettati prendendo in esame gli studi di correlazione struttura-attività (SAR) riportati da Gilligan e coll.⁽¹²⁰⁾ su ligandi σ_1 selettivi a struttura benzilpiperidinica (Fig. 17). Essi, in particolare, identificarono 4 regioni:

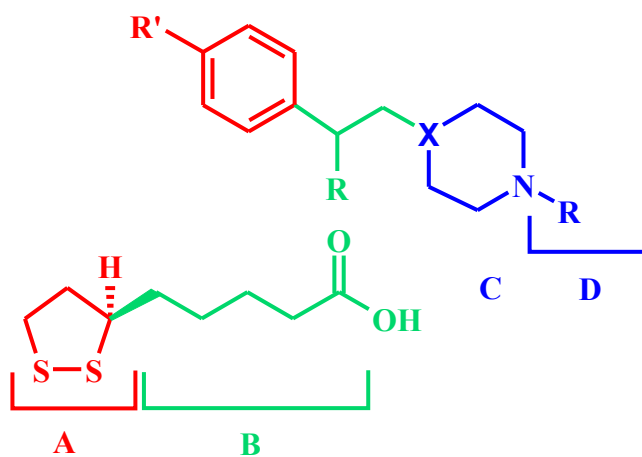
- A) Un gruppo idrofobico distale
- B) Una catena spaziatrice (*Spacer*)
- C) Un eterociclo azotato
- D) Un gruppo idrofobico prossimale

Fig.17 Modello di Gilligan per il *binding* σ_1



L'analisi delle quattro regioni ha evidenziato che è possibile variare la lunghezza dello *spacer* senza influenzare significativamente l'affinità σ , anche se la catena pentilica sembra conferire una distanza ottimale. Inoltre, la sostituzione dell'anello fenilico distale con altri nuclei arilici o eteroarilici non produce effetti apprezzabili sia sull'affinità sia sulla selettività. I composti progettati hanno come σ_1 *moiety* il nucleo piperazinico o quello piperidinico variamente sostituito all'atomo di azoto. La porzione antiossidante è data dalla presenza dell'anello 1,2-ditiolanico, questo nucleo, infatti, è presente nella struttura dell'acido (\pm)- α -lipoico il quale presenta numerose proprietà antiossidanti (*scavenger* dei ROS e dei prodotti di perossidazione lipidica, chelante dei metalli di transizione). Esso inoltre possiede dei requisiti strutturali ottimali richiesti per la sostituzione del gruppo idrofobico distale. Quest'ultimo, tramite una catena pentilica è collegato all'eterociclo azotato, mentre i sostituenti presenti sull'atomo di azoto per l'interazione con il sito idrofobico prossimale sono stati scelti in modo da investigare la loro influenza sulla affinità recettoriale (Fig. 18).

Fig. 18 Progettazione razionale



Questi presupposti strutturali hanno portato alla sintesi dei composti *N*-(1-benzilpiperidin-4-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamide (CVPO-1), (1-benzilpiperidin-4-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato (**13**), 1-(4-benzilpiperazin-1-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentan-1-one (**25**) e 5-(1,2-ditiolan-3-il)-1-[4-(2-feniletil)piperazin-1-il]pentan-1-one (**26**) sui quali sono stati eseguiti i saggi di *binding* dalla Cerep⁽¹²¹⁻¹²²⁾ in modo da analizzare l'affinità e la selettività verso i recettori σ_1 e σ_2 . Tutti i composti sintetizzati si sono dimostrati affini per il recettore σ_1 , mentre

sono poco affini per il sottotipo σ_2 (Tab.1). Questi composti sono stati selezionati come leads per lo sviluppo di nuovi ligandi bifunzionali.

Tab. 1

σ affinità di legame (K_i, nM)			
	σ_1	σ_2	
Composto	[^3H] (+)-PTZ	[^3H] (+)-DTG + PTZ	$K_i\sigma_2/K_i\sigma_1$
CVPO-1	30	810	27
13	0.39	8300	21282
25	2.5	2500	1000
26	6.5	3000	461

7. DISCUSSIONE CHIMICA

I composti intermedi 1-(2-feniletil)piperidin-4-ol (**5**), 1-(3-fenilpropil)piperidin-4-ol (**6**) e 1-(cicloesilmetil)piperidin-4-ol (**7**) pur essendo commercialmente disponibili, presentavano un costo notevolmente esoso, per tale ragione sono stati preparati in accordo al metodo sintetico, mostrato nello schema 1 ⁽¹²³⁾ Brevemente, a una soluzione di piperidin-4-ol (**4**) in toluene (PhMe) anidro si aggiungono, in presenza di carbonato di potassio (K₂CO₃), i corrispondenti alogenuri alchilici, previamente deacidificati con allumina basica (Al₂O₃), (2-bromoetil)benzene (**1**), 1-bromo-3-fenilpropano (**2**) e (bromometil)cicloesano (**3**).

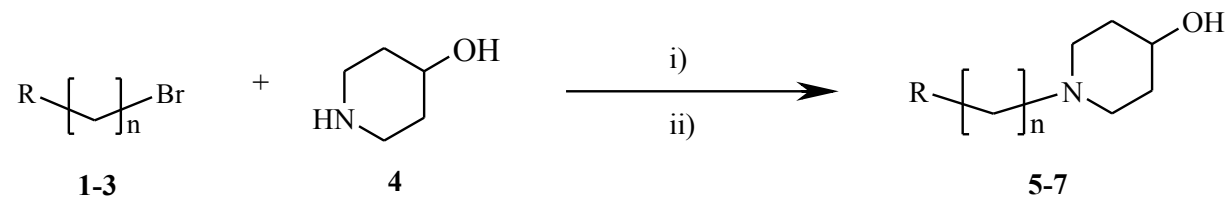
I prodotti finali **10-13** e **21-27** riportati rispettivamente negli schemi **2** e **3**, sono stati ottenuti attivando la funzione carbossilica dell'acido lipoico mediante la *N,N'*-dicicloesilcarbodiimide (DCC). La sintesi dei composti 1-(2-feniletilpiperidin-4-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato (**10**), 1-(3-fenilpropilpiperidin-4-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato (**11**), (1-cicloesilmetilpiperidin-4-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato (**12**) e (1-benzilpiperidin-4-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato (**13**) è stata effettuata in un unico *step* aggiungendo a una soluzione di [(±)-α-LA] (**9**) in diclorometano (CH₂Cl₂) anidro, in presenza di *N,N'*-dicicloesilcarbodiimide (DCC) e quantità catalitiche di 4-dimetilaminopiridina (DMAP), le corrispondenti piperidine **5-8**. La 1-benzilpiperidin-4-ol (**8**) è stata acquistata alla Sigma-Aldrich (schema **2**)⁽¹²⁴⁾. Questa procedura sintetica presenta l'inconveniente della formazione della *N,N'*-dicicloesilurea (DCU). Quest'ultima, infatti, non essendo completamente insolubile nei solventi organici comunemente utilizzati è alquanto difficile da eliminare. La sintesi dei seguenti composti: 5-(1,2-ditiolan-3-il)-1-(4-metilpiperazin-1-il)pentan-1-one (**21**), 1-(4-cicloesilpiperazin-1-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentan-1-one (**22**), 1-[4-(cicloesilmetil)piperazin-1-il]-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentan-1-one (**23**), 5-(1,2-ditiolan-3-il)-1-(4-fenilpiperazin-1-il)pentan-1-one (**24**), 1-(4-benzilpiperazin-1-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentan-1-one (**25**), 5-(1,2-ditiolan-3-il)-1-[4-(2-feniletil)piperazin-1-il]pentan-1-one (**26**) e del 5-(1,2-ditiolan-3-il)-1-[4-(3-fenilpropil)piperazin-1-il]pentan-1-one (**27**) è stata condotta seguendo la procedura riportata da Zhang e coll. ⁽¹²⁵⁾ (schema **3**).

La sintesi si esegue in ambiente inerte aggiungendo ad una soluzione diclorometanica di DCC, una soluzione di [(±)-α-LA] in CH₂Cl₂. Alla miscela risultante si aggiungono lentamente le corrispondenti piperazine commerciali **14-20** sciolte in CH₂Cl₂. La reazione si

mantiene sotto agitazione fino a scomparsa dell'ammina di partenza. In analogia alla reazione di esterificazione anche in questo caso abbiamo la formazione della DCU.

SCHEMI DI REAZIONE

SCHEMA 1



i) K_2CO_3 , PhMe, a riflusso, 24 h.

ii) HCl, H_2O , t.a.

1: R= Ph; n = 2

2: R= Ph; n = 3

3: R= Cicloesil; n = 1

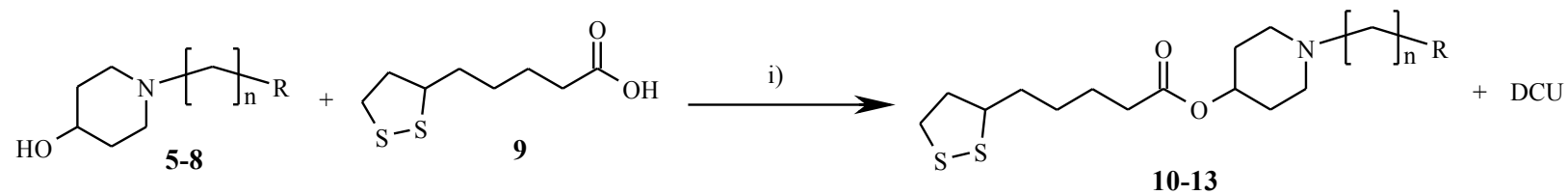
5: R= Ph; n = 2

6: R= Ph; n = 3

7: R= Cicloesil; n = 1

8: R= Ph n = 1

SCHEMA 2



i) DCC, CH_2Cl_2 anidro, DMAP, 3h, t.a.

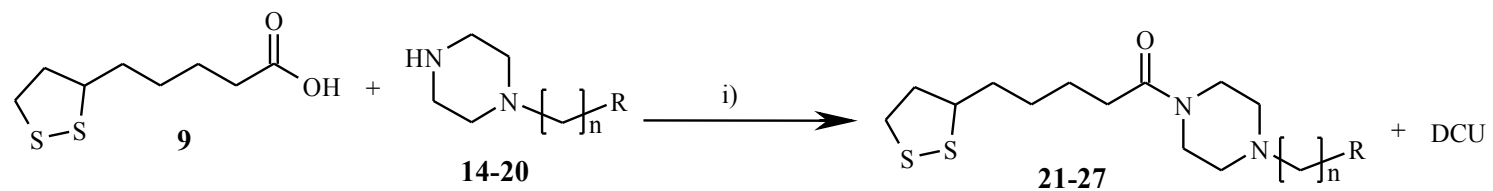
10: R = Ph; n = 2

11: R = Ph; n = 3

12: R = Cicloesil; n = 1

13: R = Ph; n = 1

SCHEMA 3



i) DCC, CH₂Cl₂ anidro, t.a.

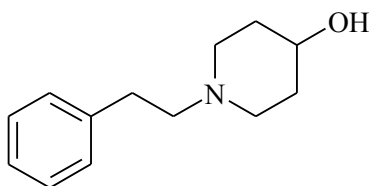
- 21: R = Me; n = 0
- 22: R = Cicloesil; n = 0
- 23: R = Cicloesil; n = 1
- 24: R = Ph; n = 0
- 25: R = Ph; n = 1
- 26: R = Ph; n = 2
- 27: R = Ph; n = 3

8. SEZIONE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

Se non diversamente specificato, i reagenti e i reattanti sono stati acquistati da fornitori commerciali e sono stati utilizzati come tali senza operare alcuna purificazione. Gli spettri ^1H NMR e ^{13}C NMR sono stati registrati su uno spettrometro Varian Inova 200 o 500 MHz (Varian, Leini, Italia) e sono stati eseguiti come soluzioni in cloroformio deuterato (CDCl_3). I dati sono riportati come spostamenti chimici o “*chemical shifts*”, i quali sono indicati con delta “ δ ” e misurati in parti per milione (ppm) (Hz/MHz). Per convenzione, lo zero della scala δ è attribuito all’assorbimento del tetrametilsilano (CH_3)₄Si (TMS). Per l’interpretazione degli ^1H NMR e ^{13}C NMR spettri si utilizzano come riferimento i picchi corrispondenti al CDCl_3 , i cui valori δ sono 7.27 e 77 rispettivamente. Tutte le reazioni sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile (TLC), la quale è stata eseguita utilizzando lastre di gel di silice dello spessore di 0.2 mm, (Silical gel 60 F₂₅₄, Merck) su fogli di alluminio. Tali lastre sono visualizzate per mezzo di una lampada UV ($\lambda = 254$ nm). La purificazione dei prodotti sintetizzati è stata eseguita tramite cromatografia flash usando colonne impaccate con gel di silice 60, 230-400 mesh Merck. I punti di fusione sono stati determinati mediante uno strumento Electrothermal modello 9100 e non sono corretti. La massa molecolare è stata identificata mediante analisi gascromatografia-spettrometria di massa (GC/MS) [GC/MS Shimadzu QP500 EI 151 (70 eV)]. Tali spettri sono stati eseguiti su una soluzione di diclorometano CH_2Cl_2 . Gli spettri infrarosso (IR) sono stati registrati usando uno spettrofotometro Perkin Elmer Spectrum RX I FT-IR System. Essi sono stati eseguiti sia in soluzioni di diclorometano (CH_2Cl_2) sia in dispersioni solide in (KBr).

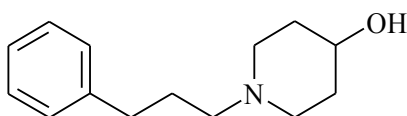
1-(2-FENILETIL)PIPERIDIN-4-OL (5)



Ad una soluzione di piperidin-4-ol (**4**) (2.023 g, 20 mmol) in 100 ml di PhMe anidro, in presenza di K_2CO_3 (1.38 g, 10 mmol), si aggiungono goccia a goccia, sotto agitazione e sotto azoto, 5.46 ml di (2-bromoetil)benzene (**1**) (7.40 g, 40 mmol), previamente deacidificato con Al_2O_3 . La miscela ottenuta è lasciata a riflusso e sotto agitazione per 24 h, quindi si filtra e, il filtrato, dopo essere stato portato a secco, viene acidificato con 20-25 ml HCl 2N. La soluzione acida è lavata con etere dietilico $(C_2H_5)_2O$ (3 x 10 ml) per rimuovere l'eccesso di agente alchilante. La fase acquosa è quindi alcalinizzata con ammoniaca (NH_3) ed estratta con $(C_2H_5)_2O$ (3 x 10 ml). Le fasi organiche riunite sono lavate con acqua distillata (5 x 10 ml), anidificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate e portate a secco. Il prodotto ottenuto è utilizzato senza successive purificazioni.

RESA = 47%; R_f = 0.51 [CH_2Cl_2/CH_3OH , 8:2]; Pf = 95-97 °C; IR (KBr) 3153, 2948, 2811, 1453, 1068, 773, 698; 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H 1.51-1.67 (m, 2H), 1.85-1.93 (m, 3H), 2.18 (t, 2H, J = 11 Hz), 2.51-2.54 (m, 2H), 2.66-2.86(m, 4H), 3.63-3.74 (m, 1H), 4.68 (broad s, 1H), 7.15-7.30 (m, 5H). ^{13}C NMR (200 MHz, $CDCl_3$) 140.3, 128.6, 128.3, 125.9, 67.9, 60.4, 51.0, 34.4, 33.8.

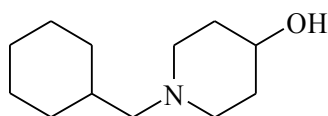
1-(3-FENILPROPIL)PIPERIDIN-4-OL (6)



Una soluzione di piperidin-4-ol (**4**) (1.16 g, 11.5 mmol) in 57.5 ml di PhMe anidro è posta sotto agitazione e sotto azoto, in presenza di K_2CO_3 (0.79 g, 5.75 mmol). Alla miscela di reazione si aggiunge a goccia a goccia l'1-bromo-3-fenilpropano (**2**) (4.57 g, 23 mmol), previamente deacidificato con Al_2O_3 . Dopo 24 h a refluxo la miscela ottenuta si filtra e il filtrato viene portato a secco. L'olio ottenuto è addizionato di HCl 2N (20-25 ml) e lavato con $(C_2H_5)_2O$ (3 x 10 ml). La fase acquosa è alcalinizzata con NH_3 ed estratta con $(C_2H_5)_2O$ (3 x 10 ml). Le fasi eteree riunite sono quindi lavate con acqua distillata (5 x 10 ml), anidificate su Na_2SO_4 anidro, filtrate e portate a secco. Il prodotto ottenuto è utilizzato senza successive purificazioni.

RESA = 67%; R_f = 0.45 [$CH_2Cl_2/MeOH$, 8:2]; Pf = 57-59 °C; IR (KBr) 3131, 2944, 2815, 1074, 779, 745, 697; 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H 1.49-1.66 (m, 2H), 1.74-2.22 (m, 6H), 2.27-2.42 (m, 2H), 2.58-2.85 (m, 4H), 3.58-3.74 (m, 1H), 4.68 (broad s, 1H), 7.07-7.65 (m, 5H). ^{13}C NMR (200 MHz, $CDCl_3$) 142.4, 128.3, 128.2, 125.9, 68.1, 58.1, 51.5, 34.5, 33.8, 28.8.

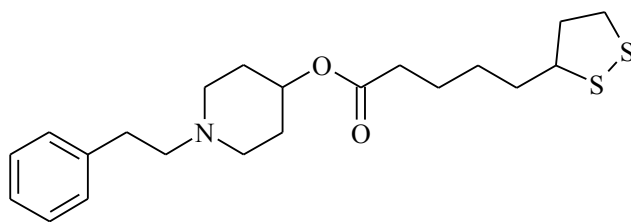
1-(CICLOESILMETIL)PIPERIDIN-4-OL (7)



A una sospensione di piperidin-4-ol (**4**) (1.17 g, 11.6 mmol) in 58 ml di PhMe anidro e K_2CO_3 (0.8 g, 5.81 mmol) si aggiungono lentamente sotto azoto, 4.11 grammi (23.23 mmol) di (bromometil)cicloesano (**3**) previamente deacidificato con Al_2O_3 . La miscela ottenuta è lasciata a riflusso e monitorata mediante TLC. Dopo 24 h sotto agitazione, la miscela di reazione si filtra e il filtrato viene portato a secco. Al residuo si aggiungono 20-25 ml di HCl 2N e si lava con dietilere (4 x 10 ml). Dopo separazione la fase acquosa è alcalinizzata con NH_4OH e lavata con $(C_2H_5)_2O$ (4 x 10 ml). Le fasi organiche raccolte sono lavate con acqua distillata (5 x 10 ml), anidificate con Na_2SO_4 anidro, filtrate e portate a secco. Il prodotto ottenuto è utilizzato senza successive purificazioni.

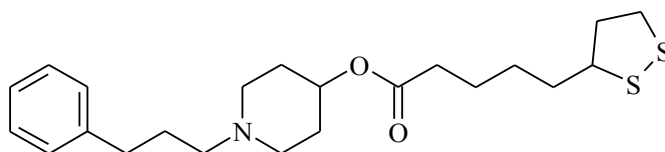
RESA = 20%; $R_f = 0.52$ [$CH_2Cl_2/MeOH$, 8:2], IR (NaCl) 3338, 2921, 2849, 1449, 1066; 1H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ_H 0.75-0.93 (m, 2H), 1.10-1.26 (m, 2H), 1.35-2.07 (m, 15H), 2.63-2.76 (m, 2H), 3.61-3.73 (m, 1H), 4.68 (broad s, 1H). ^{13}C NMR (200 MHz, $CDCl_3$) 68.3, 65.5, 51.6, 35.4, 34.5, 31.9, 26.7, 26.1.

1-(2-FENILETIL)PIPERIDIN-4-IL-5-(1,2-DITIOLAN-3-IL)PENTANOATO (10)



Una miscela composta da [(±)-α-LA] (**9**) (1 g, 4.85 mmol), 1-fenetil-piperidin-4-ol (**5**) (0.995 g, 4.85 mmol) e quantità catalitiche di DMAP (0.06 g, 0.485 mmol) in 12 ml di CH₂Cl₂ anidro è posta sotto agitazione, in ambiente inerte ed è opportunamente protetta dalla luce. A questa si aggiunge 1 g di DCC (4.85 mmol) e si lascia a temperatura ambiente per circa 3 h. La miscela ottenuta è filtrata sottovuoto per eliminare la DCU e il filtrato è lavato con una soluzione di NaHCO₃ 5% (2 x 10 ml) e dopo con una soluzione satura di NaCl (2 x 10 ml). La fase organica residua viene quindi anidrificata su Na₂SO₄ anidro, filtrata e portata a secco. L'olio giallo residuo è ripreso con CH₂Cl₂ e rifiltrato sottovuoto per eliminare la DCU residua. Dopo evaporazione del solvente a secco, l'olio ottenuto è purificato mediante cromatografia flash con acetato di etile (AcOEt)/cicloesano (C₆H₁₂) (7:3). L'olio giallo ricavato è salificato con diossano cloridrato (4 N) e cristallizzato da metanolo (CH₃OH). RESA = 69.5%; R_f = 0.5 [AcOEt/CH₃OH, 8:2]; Pf = 155.8 °C dec; MS *m/z* [M]⁺ = 394.3; IR (NaCl) 3026, 2932, 2808, 1728, 1603, 1548; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ_H 1.38-2.02 (m, 11H), 2.29-2.85 (m, 11H), 3.10-3.326 (m, 2H), 3.51-3.61 (m, 1H), 4.75-4.88 (m, 1H), 7.16-7.34 (m, 5H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) 172.9, 140.3, 128.6, 128.3, 125.9, 70.1, 60.4, 56.3, 50.8, 40.2, 38.4, 34.6, 34.4, 33.8, 30.8, 28.7, 24.7.

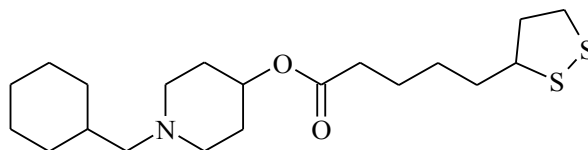
1-(3-FENILPROPIL)PIPERIDIN-4-IL-5-(1,2-DITIOLAN-3-IL)PENTANOATO (11)



Un grammo 1 di [(±)-α-LA] (**9**) (4.85 mmol), 1.06 di 1-(3-fenilpropil)-piperidin-4-ol (**6**) (4.85 mmol) e 0.06 g di DMAP (0.485 mmol) sono sciolti in 12 ml di CH₂Cl₂ anidro. Alla soluzione sotto agitazione, in ambiente inerte e opportunamente preservata dalla luce, si aggiunge 1 g di DCC (4.85 mmol) a temperatura ambiente. Dopo 3 h il *mix* di reazione viene filtrato sottovuoto e la fase organica lavata con una soluzione di NaHCO₃ 5% (2 x 10 ml) e successivamente con una soluzione satura di NaCl (2 x 10 ml). La fase organica, essiccata su Na₂SO₄ anidro, è filtrata e portata a secco. L'olio giallo ottenuto è ripreso con CH₂Cl₂ e rifiltrato sottovuoto per rimuovere l'ulteriore DCU. Dopo averlo riportato a secco, il prodotto è purificato su colonna cromatografica flash utilizzando come sistema eluente AcOEt/C₆H₁₂ (7:3). L'olio giallo ottenuto è salificato mediante diossano cloridato (4N). Il cloridrato, un solido di colore bianco, è cristallizzato da CH₃OH.

RESA = 76.2%; R_f = 0.53 [AcOEt/CH₃OH, 8:2]; P_f = 121.4 °C dec; MS *m/z* [M]⁺ = 407.15; IR (NaCl) 3024, 2929, 2856, 1729, 1453; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ_H 1.26-2.03 (m, 13H), 2.18-2.84 (m, 11H), 3.05-3.25 (m, 2H), 3.50-3.64 (m, 1H), 4.72-4.84 (m, 1H), 7.14-7.32 (m, 5H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) 172.9, 142.1, 128.3, 128.2, 125.7, 70.2, 57.9, 56.3, 50.8, 40.2, 38.4, 34.6, 34.3, 33.7, 30.8, 28.8, 28.7, 24.7.

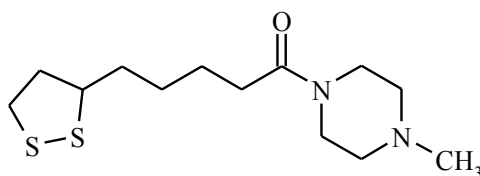
(1-CICLOESILMETIL)PIPERIDIN-4-IL-5-(1,2-DITIOLAN-3-IL)PENTANOATO (12)



Una soluzione di [(±)-α-LA] (**9**) (0.45 g, 2.20 mmol) e di 1-cicloesilmetil-piperidin-4-ol (**7**) (0.434 g, 2.20 mmol), in presenza della 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0.026 g, 0.22 mmol) è posta al buio e sotto agitazione in 5.42 ml di CH₂Cl₂ anidro. Alla miscela di reazione sotto azoto si aggiungono 0.453 g (2.20 mmol) di DCC. Dopo 3 h sotto agitazione a temperatura ambiente la miscela di reazione si filtra sottovuoto e si lava con una soluzione di NaHCO₃ 5% (2 x 10 ml) e dopo con una soluzione satura di NaCl (2 x 10 ml). La fase organica si anidrifica con Na₂SO₄, si filtra e si porta a secco. Il grezzo ottenuto è addizionato di CH₂Cl₂, rifiltrato sottovuoto e poi portato a secco. La purificazione è eseguita su colonna cromatografia flash con acetato di etile/cicloesano (7:3). L'olio giallo ottenuto è salificato con diossano cloridrato (4N) e cristallizzato da CH₃OH.

RESA = 39.6%; R_f = 0.55 (AcOEt); P_f = 174.1 °C dec; MS *m/z* [M]⁺ = 385.2; IR (NaCl) 2921, 2850, 2803, 1730, 1449, 1179, 1034; ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ_H 0.70-0.94 (m, 2H), 1.05-2.83 (m, 27H), 3.05-3.26 (m, 2H), 3.50-3.61 (m, 1H), 4.70-4.87 (m, 1H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) 172.9, 70.5, 65.5, 56.3, 51.3, 40.2, 38.4, 35.3, 34.5, 34.4, 31.9, 30.8, 28.7, 27.7, 26.1, 24.7.

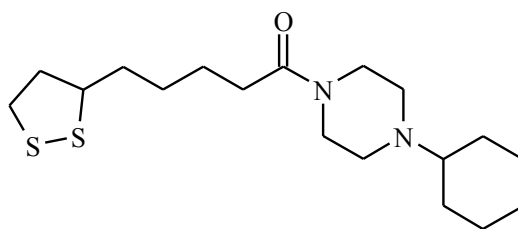
5-(1,2-DITIOLAN-3-IL)-1-(4-METILPIPERAZIN-1-IL)PENTAN-1-ONE (21)



A una soluzione di DCC (1.031 g, 5 mmol) in 20 ml di CH_2Cl_2 anidro si aggiunge sotto agitazione e sotto azoto una soluzione di [(±)- α -LA] (**9**) (1 g, 5 mmol) in 20 ml di CH_2Cl_2 anidro. Dopo 10 minuti si addiziona goccia a goccia e sotto agitazione una soluzione di 1-Metilpiperazina (**14**) (0.5 g, 5 mmol) in 10 ml di CH_2Cl_2 anidro. Dopo 3 h a temperatura ambiente al buio, il *mix* di reazione è filtrato due volte sottovuoto per rimuovere la DCU formatesi. Il filtrato è lavato con una soluzione di NaHCO_3 5% (2 x 10 ml) e dopo con una soluzione satura di NaCl (2 x 10 ml). La fase organica è anidrificata su Na_2SO_4 , filtrata e portata a secco. Data ancora la presenza di DCU si riprende con CH_2Cl_2 , si rifiltra sottovuoto e si porta a secco, facendo ripetuti lavaggi con $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ (3 x 10 ml). L'olio ricavato si purifica su colonna cromatografica flash mediante una fase mobile a gradiente [CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (10, 9.75:0.25, 9.5:0.5)]. L'olio giallo ottenuto è salificato con etere cloridrato (2 N) e cristallizzato da CH_3OH .

RESA = 20%; $R_f = 0.52$ [$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 8:2]; $P_f = 141.7$ °C dec; MS m/z $[\text{M}]^+ = 288.1$; IR (NaCl) 2924, 2852, 2792, 1642, 1440, 1375; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} 1.43-1.52 (m, 2H), 1.60-1.74 (m, 4H), 1.87-1.94 (m, 1H), 2.30-2.34 (m, 5H), 2.40-2.48 (m, 5H), 3.08-3.10 (m, 1H), 3.11-3.20 (m, 1H), 3.44-3.47 (m, 2H), 3.49-3.50 (m, 1H), 3.54-3.65 (broad s, 2H). ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3) 171.1, 56.4, 55.0, 54.6, 45.8, 45.2, 41.2, 40.2, 38.5, 34.7, 32.9, 29.1, 24.9.

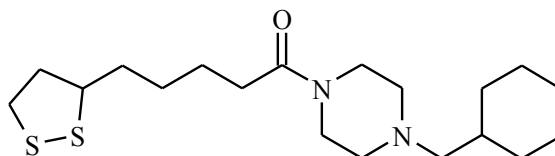
1-(4-CICLOESILPIPERAZIN-1-IL)-5-(1,2-DITIOLAN-3-IL)PENTAN-1-ONE (22)



Un grammo (4.85 mmol) di [(±)-α-LA] (**9**), 0.787 g (4.84 mmol) di 1-cicloesilpiperazina (**15**) e 0.06 g (0.484 mmol) di DMAP in 12 ml di CH₂Cl₂ anidro sono posti sotto agitazione in ambiente inerte. Alla miscela di reazione si aggiunge 1 g (4.85 mmol) di DCC e si lascia sotto agitazione per circa 3 h a temperatura ambiente. La miscela si filtra sottovuoto e la fase organica si lava con una soluzione di NaHCO₃ 5% (2 x 10 ml) e con una soluzione satura di NaCl (2 x 10 ml). La fase organica essiccata su Na₂SO₄ anidro si filtra e si porta a secco. Data ancora la presenza di DCU si riprende con CH₂Cl₂, si rifiltra sottovuoto e si porta a secco, facendo ripetuti lavaggi con (C₂H₅)₂O (3 x 10 ml). Il residuo ottenuto è purificato su colonna cromatografia flash mediante una fase mobile a gradiente [acetato di etile/cicloesano, acetato di etile, acetato di etile/etanolo (8:2, 10, 9.5:0.5)]. Il prodotto ottenuto, olio di colore giallo, viene salificato mediante dietilere cloridrato (2 N) e cristallizzato con CH₃OH.

RESA = 44.1%; *R_f* = 0.55 [CH₂Cl₂/MeOH, 9:1]; *P_f* = 173.1 °C dec; MS *m/z* [M]⁺ = 356; IR (KBr) 2933, 2850, 2809, 1634, 1433, 1244. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ_H 1.0-2.40-2.48 (m, 4H), 1.30-2.06 (m, 11H), 2.24-2.66 (m, 9H), 3.15-3.27 (m, 2H), 3.46-3.78 (m, 6H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) 171.0, 63.6, 56.4, 49.3, 48.7, 46.1, 42.0, 40.2, 38.5, 34.8, 32.9, 29.1, 28.9, 26.2, 25.8, 25.0.

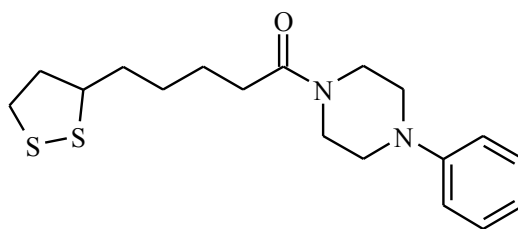
1-[4-(CICLOESILMETIL)PIPERAZIN-1-IL]-5-(1,2-DITIOLAN-3-IL)PENTAN-1-ONE
(23)



A una soluzione di DCC (1.031 g, 5 mmol) in 20 ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiunge sotto agitazione e sotto azoto una soluzione di [(±)-α-LA] (**9**) (1 g, 5 mmol) in 20 ml di CH₂Cl₂ anidro. Dopo 10 minuti si addiziona goccia a goccia e sotto agitazione una soluzione di 1-(cicloesilmetil)piperazina (**16**) (0.91 g, 5 mmol) in 10 ml di CH₂Cl₂ anidro. Dopo 3 h a temperatura ambiente al buio, il *mix* di reazione è filtrato due volte sottovuoto per rimuovere la DCU formatesi. Il filtrato è lavato con una soluzione di NaHCO₃ 5% (2 x 10 ml) e dopo con una soluzione satura di NaCl (2 x 10 ml). La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e portata a secco. Data ancora la presenza di DCU si riprende con CH₂Cl₂, si filtra sottovuoto e si porta a secco, facendo ripetuti lavaggi con (C₂H₅)₂O (3 x 10 ml). L'olio ricavato si purifica su colonna cromatografica flash acetato di etile/cicloesano (8:2). L'olio giallo ottenuto è salificato con etere cloridrato (2 N) e cristallizzato da CH₃OH.

RESA = 31.2%; R_f = 0.47 [AcOEt/EtOH, 9:1]; P_f = 202 °C dec; MS *m/z* [M]⁺ = 370.3; IR (NaCl) 2922, 2850, 1643, 1444, 1004, 801. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 1.08-1.20 (m, 6H), 1.38-1.43 (m, 3H), 1.57-1.71 (m, 9H), 1.80-1.85 (m, 1H), 2.24-2.30 (m, 6H), 3.02- 3.14 (m, 2H), 3.34-3.43 (m, 3H), 3.48-3.54 (m, 3H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) 171.1, 65.4, 56.4, 53.9, 53.2, 45.6, 41.5, 40.2, 38.4, 34.9, 34.7, 32.9, 31.8, 29.1, 26.7, 26.0, 24.9.

5-(1,2-DITIOLAN-3-IL)-1-(4-FENILPIPERAZIN-1-IL)PENTAN-1-ONE (24)

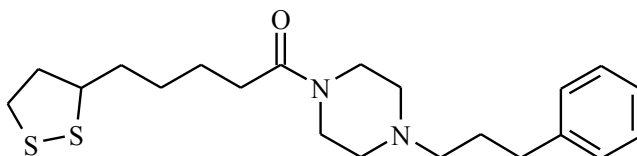


A una soluzione di DCC (1.03 g, 5 mmol) in 20 ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiunge sotto agitazione e sotto azoto una soluzione di [(±)-α-LA] (9) (1.03 g, 5 mmol) in 20 ml di CH₂Cl₂ anidro. Dopo 10 minuti si addiziona goccia a goccia e sotto agitazione una soluzione di 1-fenilpiperazina (17) (0.811 g, 5 mmol) in 10 ml di CH₂Cl₂ anidro. Dopo 3 h a temperatura ambiente al buio, il *mix* di reazione è filtrato due volte sottovuoto per rimuovere la DCU formatesi. Il filtrato è lavato con una soluzione di NaHCO₃ 5% (2 x 10 ml) e dopo con una soluzione satura di NaCl (2 x 10 ml). La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e portata a secco. Data ancora la presenza di DCU si riprende con CH₂Cl₂, si rifiltra sottovuoto e si porta a secco, facendo ripetuti lavaggi con (C₂H₅)₂O (3 x 10 ml). L'olio ricavato si purifica su colonna cromatografica flash mediante AcOEt. L'olio giallo ottenuto è salificato con etere cloridrato (2 N) e cristallizzato da CH₃OH.

RESA = 49.2 %; R_f = 0.64 [AcOEt/C₂H₅OH), 9:1]; Pf = 136.2 °C dec; MS *m/z* [M]⁺ = 350.1; IR (KBr) 3042, 2932, 2853, 1642, 1599, 1578. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ_H 1.47-1.57 (m, 2H), 1.64-1.78 (m, 4H), 1.89-1.96 (m, 1H), 2.38 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 2.44-2.50 (m, 1H), 3.10-3.22 (*overlapping* m, 6H), 3.58-3.64 (m, 3H), 3.78 (t, 2H, J = 5 Hz), 6.89 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 6.93 (dd, 2H, J = 7.5 Hz), 7.29 (dd, 2H, J = 7.5 Hz). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) 171.2, 150.9, 129.2, 120.6, 116.6, 56.4, 49.8, 49.4, 45.5, 41.5, 40.2, 38.5, 34.8, 33.0, 29.1, 24.9.

5-(1,2-DITIOLAN-3-IL)-1-[4-(3-FENILPROPILO)PIPERAZIN-1-IL]PENTAN-1-ONE

(27)



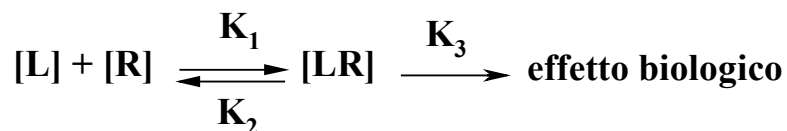
A una soluzione di DCC (1.03 g, 5 mmol) in 20 ml di CH₂Cl₂ anidro si aggiunge sotto agitazione e sotto azoto una soluzione di [(±)-α-LA] (**9**) (1.03 g, 5 mmol) in 20 ml di CH₂Cl₂ anidro. Dopo 10 minuti si addiziona goccia a goccia e sotto agitazione una soluzione di 1-(3-fenilpropil)piperazina (**20**) (1.02 g, 5 mmol) in 10 ml di CH₂Cl₂ anidro. Dopo 3 h a temperatura ambiente al buio, il *mix* di reazione è filtrato due volte sottovuoto per rimuovere la DCU formatesi. Il filtrato è lavato con una soluzione di NaHCO₃ 5% (2 x 10 ml) e dopo con una soluzione satura di NaCl (2 x 10 ml). La fase organica è anidrificata su Na₂SO₄, filtrata e portata a secco. Data ancora la presenza di DCU si riprende con CH₂Cl₂, si rifiltra sottovuoto e si porta a secco, facendo ripetuti lavaggi con (C₂H₅)₂O (3 x 10 ml). L'olio ricavato si purifica su colonna cromatografica flash acetato di etile/cicloesano (8:2). L'olio giallo ottenuto è salificato con etere cloridrato (2 N) e cristallizzato da CH₃OH.

RESA = 31.2%; R_f = 0.36 [AcOEt/ EtOH, 8:2], PF = 142.3 °C dec; MS *m/z* [M]⁺ = 392.2; IR (NaCl) 3024, 2931, 1643, 1440, 748, 702. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ_H 1.31-2.06 (m, 10H), 2.27-2.79 (m, 10H), 3.01-3.26 (m, 1H), 3.45-3.66 (m, 6H), 7.17-7.34 (m, 5H). ¹³C NMR (200 MHz, CDCl₃) 171.1, 141.9, 128.3, 125.8, 57.7, 56.4, 53.4, 52.8, 45.6, 41.5, 40.2, 38.5, 34.8, 33.5, 32.9, 29.1, 28.4, 24.9.

9. BINDING

9.1 GENERALITÀ

Applicati per la prima volta all'inizio degli anni '70, gli studi di *binding* (studi di legame) hanno dato grande impulso alla farmacologia molecolare e in particolare allo studio recettoriale.⁽¹²⁶⁾ Essi permettono di analizzare la diretta interazione farmaco-recettore determinandone i parametri caratteristici (costante di affinità, densità recettoriale, costanti di cinetica della reazione); inoltre consentono di individuare sottoclassi recettoriali e la loro relativa localizzazione cellulare e subcellulare. La maggior parte dei farmaci per poter esplicare la sua azione biologica deve interagire con specifiche macromolecole, per lo più di natura proteica, presenti o sulla superficie o all'interno della cellula, denominate recettori; in particolare la *International Union of Pharmacology* (IUPHAR), definisce recettore le "macromolecole o insieme di macromolecole cellulari direttamente o specificatamente deputate alla trasmissione di un segnale chimico fra e all'interno delle cellule". Quindi un farmaco, sia esso eziologico o sostitutivo o sintomatico, non crea un effetto, ma modula una funzione o un processo biologico preesistente, pertanto esso può incrementare o diminuire la funzione fisiologica di organi e tessuti, ma non può dotarli di nuove funzioni. La "*conditio sine qua non*" affinché tali farmaci possano generare il loro effetto biologico è dunque la formazione del complesso tra il ligando (farmaco) e il suo sito recettoriale; il processo di interazione farmaco-recettore può essere schematicamente rappresentato dalla seguente equazione:



dove [L] è la concentrazione del ligando (*free ligand*), [R] è la concentrazione recettore, [LR] è concentrazione del complesso ligando-recettore (*bound*), K_1 o K_{on} e K_2 o K_{off} sono rispettivamente la costante di associazione e di dissociazione del suddetto complesso e la K_3 indica l'entità dell'effetto biologico.

La formazione del complesso LR è una reazione reversibile per cui obbedisce alla legge chimica proposta nel 1864 dai norvegesi Guldberg e P. Waage (REF 1,2,3), nota come "legge dell'azione di massa o legge dell'equilibrio chimico". Sebbene sia definita una "legge", essa è semplicemente un modello basato sui seguenti presupposti:

- Tutti i recettori sono egualmente accessibili ai ligandi

- Tutti i recettori sono liberi o legati al ligando. Il modello ignora eventuali stati di legame parziale
- Il legame è reversibile
- Né il ligando né il recettore sono alterati dal legame

La K_1 , espressa come il reciproco della molarità e del tempo in minuti ($M^{-1} \text{ min}^{-1}$) e definita anche “costante di associazione o di affinità” (K_a), indica quanto la reazione è spostata verso la formazione del complesso ed è pertanto strettamente correlata al numero e all’entità dei legami chimici che si instaurano fra L e R. In particolare, essa è un indice del tempo che è necessario per raggiungere l’equilibrio nella reazione di legame L-R.

La K_2 (min^{-1}) è la costante di equilibrio della reazione inversa, ovvero della reazione di dissociazione del complesso, denominata per l’appunto, “costante di dissociazione”. Essa è inversamente correlata all’affinità recettoriale del ligando e direttamente alla permanenza del complesso [LR] essendo fortemente influenzata dal numero di legami chimici deboli che si stabiliscono tra L e R; pertanto essi più sono chimico-fisicamente complementari, più lenta sarà la loro separazione. All’equilibrio, il numero di molecole di complesso LR che si forma nell’unità di tempo è uguale al numero di molecole di complesso che si dissocia, come indicato dall’equazione (1). K_{on} e K_{off} sono delle costanti cinetiche che regolano i tempi di formazione e di scissione di LR, rispettivamente.

$$[L] \cdot [R] \cdot K_{on} = [LR] K_{off} \quad (1)$$

Pertanto all’equilibrio la costante di dissociazione, indicata con K_d , sarà la seguente:

$$\frac{[L] [R]}{[LR]} = \frac{K_{off}}{K_{on}} = \frac{1}{K_a} = K_d \quad (2)$$

La K_d (M) è utilizzata per definire l’affinità di un farmaco per il suo recettore, rappresenta la concentrazione di ligando che occupa il 50% dei recettori all’equilibrio e il suo valore esprime in maniera inversa l’affinità di R per L. Grandi e piccoli valori di K_d indicano rispettivamente bassa ed elevata affinità del recettore per il ligando.

Strettamente legato alla K_d , è l'importante parametro indicato come frazione occupazionale dei recettori (*fractional receptor occupancy*). Essa indica la frazione di tutti i recettori legati a L ed è determinata mediante l'equazione (3).

$$\text{Fractional occupancy} = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (3)$$

Rielaborando l'equazione (2) e considerando la concentrazione totale dei recettori $[R_T]$, la quale è indicata anche come B_{\max} ed è definita dall'equazione (4), si ottiene l'equazione fondamentale (5) che correla la [L] alla [LR]. Quest'ultima equazione prende il nome di "isoterma di legame o isoterma di Langmuir" e può essere rappresentata o come iperbole rettangolare, determinata mediante regressione non lineare, (Fig. 19.) oppure in grafico semi-logaritmico (Fig.19). Al fine di agevolare l'interpolazione dei dati sperimentali, l'equazione (5) può essere linearizzata per ottenere grafici rettilinei. Ci sono diversi metodi come quelli di Lineweaver-Burke and Eadie-Hofstee per realizzare ciò, ma tra tutti la più usata è la trasformazione lineare secondo *Scatchard* (*Scatchard plots*) (più precisamente attribuito a Rosenthal), la quale permette di ottenere l'equazione (6). Prendendo in esame i valori della B_{\max} e della K_d , nei 3 grafici della Fig. 19, si evince come essi siano diversamente ottenuti in funzione del tipo di diagramma. Mentre nei primi 2 grafici, la B_{\max} è ottenuta dal valore del plateau a cui la curva tende asintoticamente, invece, nell'ultimo diagramma essa si ottiene dall'intercetta sull'asse delle ascisse. Per quanto concerne la K_d , essa è pari alla $[free]$ che determina la saturazione del 50% dei recettori nei grafici 1 e 2, invece, nel grafico 3 è il negativo reciproco della pendenza (*slope*).

Analizzando più in dettaglio il grafico di *Scatchard* (Fig.19.3), è importante sottolineare che è possibile scegliere l'unità di misura per l'asse delle ordinate (Y). In particolare, si hanno due opzioni: 1) una scelta è quella di esprimere sia il *free* che il *bound* in cpm (conta per minuto) affinché il rapporto *bound/free* sia dimensionale-senza unità. 2) L'altra possibilità è riportare sull'asse delle Y i valori di siti/cellule/nM o fmol/mg/nM dove fmol (fentomoli, 1 fmol = 10^{-15} moli) è espressione della capacità legante dei recettori. La prima modalità di rappresentazione ha lo svantaggio di dover necessariamente eseguire conversioni di unità per interpretare la pendenza della retta, invece, la seconda semplifica molto il calcolo della K_d , in quanto il suo valore è pari al reciproco negativo dello *slope* ed è espresso in unità di concentrazione (nM). Sebbene l'analisi *Scatchard* sia molto utile per visualizzare i dati, non è il modo più accurato per analizzare i dati perché la trasformazione lineare altera- distorce l'errore sperimentale. Ciò

è ascrivibile al fatto che vengono violate alcune delle assunzioni sulle quali si basa il modello di regressione lineare. La regressione assume che la dispersione- distribuzione dei punti attorno alla retta segue una distribuzione gaussiana e che la deviazione standard è la stessa ad ogni valore di X. Queste assunzioni non sono vere, con i dati trasformati. Un secondo problema è che la trasformazione *Scatchard* altera il rapporto tra X e Y. Il valore di X (*bound*) viene utilizzato per calcolare Y (*Bound/free*), e questo viola le ipotesi di regressione lineare, secondo la quale ogni incertezza è in Y, mentre X è conosciuta con precisione.

$$[R_T] = [R] + [LR]$$

(4)

$$[LR] = \frac{[L] [R_T]}{K_d + [L]}$$

(5)

$$\frac{[LR]}{[L]} = - \frac{1}{K_d} \cdot [LR] + \frac{[R_T]}{K_d}$$

(6)

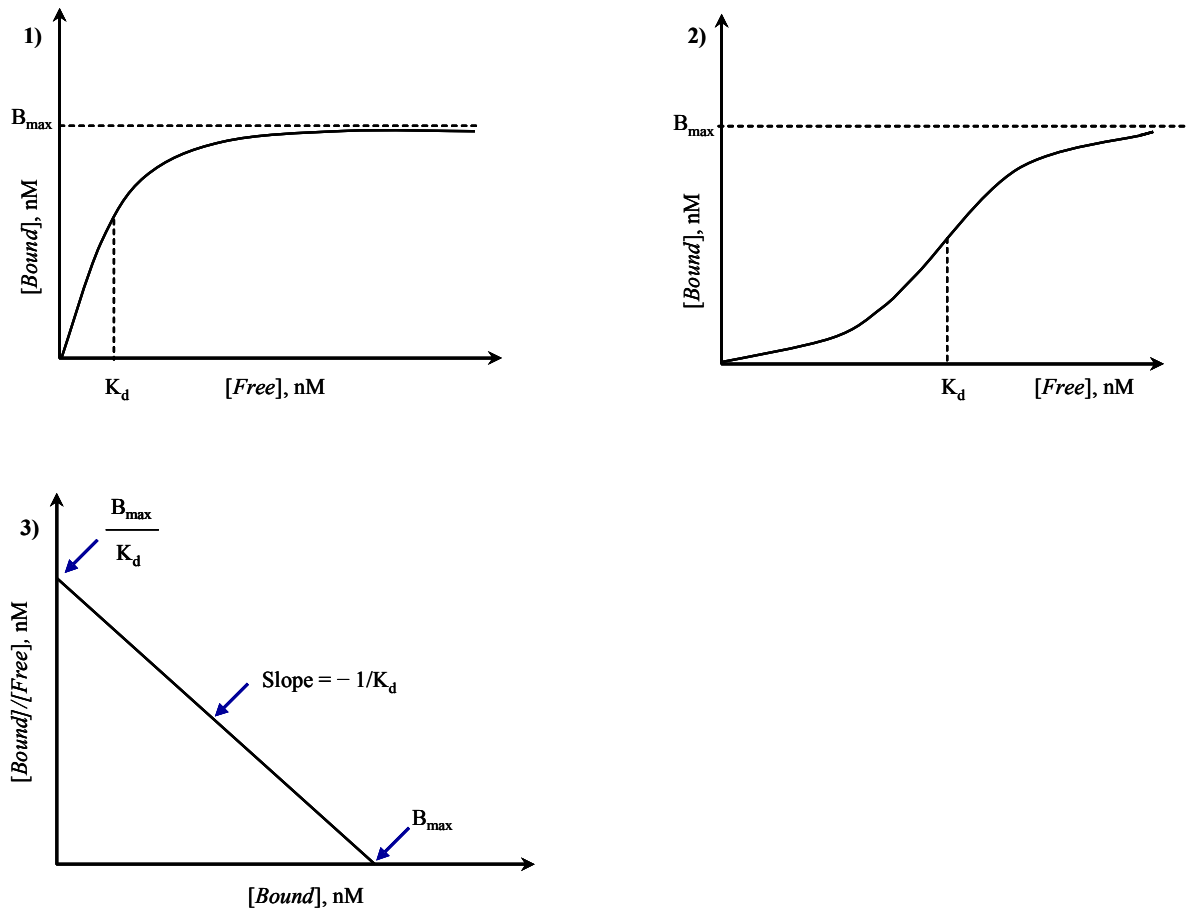


Fig.19 Isotherma di Langmuir: grafico in scala aritmetica (pannello 1); grafico in scala semilogaritmica (pannello 2). Grafico di *Scatchard* (pannello 3).

9.2 BINDING RADIORETTORIALE

L'affinità di legame dei composti sintetizzati è stata investigata mediante la tecnica di “*Radioligand binding*” (Legame radiorettoriale). In particolare, sono state utilizzate le metodiche di *saturation assay* (saggio di saturazione) e *competitive assays* (saggio di competizione o spiazzamento).

Ho valutato quantitativamente l'interazione fra un radioligando e i due sottotipi recettoriali σ , σ_1 e σ_2 . Un radioligando è un ligando marcato con un isotopo radioattivo, il quale è in grado di legarsi a un recettore, trasportatore, enzima o altra proteina di interesse. Un ideale radioligando dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- Elevata affinità ($K_d \leq 1$)
- Basso *binding* aspecifico

- Specificità recettoriale
- Bassa o nulla tossicità

Le principali tecniche di “*binding* radiorecettoriale” sono:

- 1) *saturation assay* o *Scatchard experiment* (saggio di saturazione) → consente di misurare all’equilibrio il legame recettoriale di crescenti concentrazioni di radioligando al fine di determinare la K_d e la B_{max} .
- 2) *competitive assay* (saggio di competizione o spiazzamento) → permette di valutare quantitativamente l’affinità recettoriale di un ligando non marcato in presenza di un radioligando molto affine per la medesima tipologia recettoriale.
- 3) *kinetics assay* (saggio di cinetica) → consente di determinare le costanti di associazione e di dissociazione del radioligando

Nel mio progetto di ricerca ho utilizzato per lo studio dei recettori σ_1 e σ_2 le prime due metodiche, le quali saranno qui di seguito dettagliatamente discusse. In particolare, mediante il *saturation binding experiment* ho determinato i valori di K_d dei radiomarcanti [3H]-(+)-*cis*-Pentazocina e [3H]-1,3-di(2-tolil)-guanidina (DTG) Mentre la PTZ è sigma-1 selettiva, il DTG ha la stessa affinità per i recettori σ_1 e σ_2 , pertanto essa è stata utilizzata in presenza della *N*-allilnormetazocina (SK&F 10,047) come bloccante sigma-1. Attraverso gli esperimenti di *competitive binding* ho valutato sia l’affinità dei composti sintetizzati e di alcuni standard per i siti σ_1 e σ_2 .

9.3 BINDING DI SATURAZIONE O SCATCHARD EXPERIMENT

La K_d e la B_{max} sono state determinate mediante *saturation binding experiments*. Il grafico riportato in figura 20 è stato ottenuto ponendo sull’asse delle ascisse la concentrazione di radioligando e su quella delle ordinate la concentrazione di *binding* (Fig 20), da queste si ricavano tre 3 curve, ovvero, quella del *binding* totale, quella del *binding* specifico e quella del *binding* aspecifico. Il *binding* totale rappresenta il legame con tutti i recettori, quello specifico con i recettori oggetti di studio, l’aspecifico mostra il legame con altri siti e può essere dovuto al preparato biologico e al metodo di filtrazione. Quest’ultimo di solito rappresenta il 10-20% del legame totale e viene misurato valutando il legame di ciascuna

concentrazione di radioligando in presenza di un forte eccesso (> di 1000) di ligando non marcato. Il ligando non marcato usato in questi esperimenti deve avere un'elevata affinità per il recettore da studiare e può avere la stessa struttura del radioligando o una struttura differente. Il *binding* recettoriale specifico è calcolato come la differenza tra il binding totale e quello aspecifico.

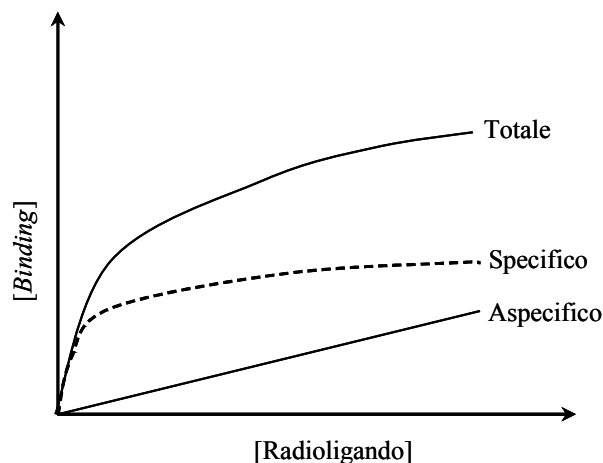


Fig. 20 *Binding* di saturazione o *Scatchard experiment*: *Binding* specifico

9.4 ANALISI SCATCHARD PER LA DETERMINAZIONE DELLA K_D DELLA $[^3\text{H}]$ - (+)-*CIS*-PENTAZOCINA E DELLA $[^3\text{H}]$ -1,3-DI(2-TOLIL)-GUANIDINA

Le procedure sperimentali per la determinazione della K_d della $[^3\text{H}]$ -(+)-*cis*-Pentazocina e della $[^3\text{H}]$ -1,3-di(2-tolil)-guanidina sono qui di seguito riportate.

K_d della $[^3\text{H}]$ -(+)-*cis*-Pentazocina

La $[^3\text{H}]$ -(+)-*cis*-Pentazocina viene incubata per 2 h e 30' a 37 °C, a differenti concentrazioni (5, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,1 nM), con 500 µg/400 µl di membrane (TRIS HCL 50 mM pH=7,4 a 25 °C). Il *binding* aspecifico è stato determinato con aloperidolo (10 µM). Dopo incubazione si filtra su filtri GF6/C WHATMAN, 1 h prima trattati con una soluzione di polietilenimmina 0,5% e, si lavano (2 x 4 ml) con TRIS HCL 50 mM (pH=7,4 a 4 °C). Ai filtri, posti nelle corrispondenti *vials*, si aggiungono 4 ml di liquido

di scintillazione (Ultima Gold MV) e dopo circa 10-12 ore si esegue la lettura dei campioni al β -counter 1414 Winspectral PerkinElmer Fallace. I dati ottenuti vengono elaborati mediante il software *EBDA-radlig* al fine di calcolare la K_d (nM). Mediante l'analisi *Scatchard* che ho eseguito, il valore della K_d da me ottenuto è pari a 14 nM.

K_d della ($[^3\text{H}]$ -1,3-di(2-tolil)-guanidina) (DTG)

La [^3H]-1,3-di(2-tolil)-guanidina viene incubata per 2 h a 25 °C, a differenti concentrazioni (5, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,1 nM), con 360 $\mu\text{g}/300 \mu\text{l}$ di membrane (TRIS HCL 50 mM pH=8 a 25 °C). Il *binding* aspecifico è stato determinato con DTG (5 μM). Dopo incubazione si filtra su filtri GF6/C WHATMAN, 1 h prima trattati con una soluzione di polietilenimina 0,5% e, si lavano (2 x 4 ml) con TRIS HCL 10 mM (pH=8 a 4 °C). Ai filtri, posti nelle corrispondenti *vials*, si aggiungono 4 ml di liquido di scintillazione (Ultima Gold MV) e dopo circa 10-12 ore si esegue la lettura dei campioni al β -counter 1414 Winspectral PerkinElmer Fallace. I dati ottenuti vengono elaborati mediante il software *EBDA-radlig* al fine di calcolare la K_d (nM). Mediante l'analisi *Scatchard* che ho eseguito, il valore della K_d da me ottenuto è pari a 11 nM.

9.5 BINDING DI SPIAZZAMENTO

Gli esperimenti di spiazzamento o competizione consentono di misurare il legame di una singola concentrazione di radioligando in presenza di varie concentrazioni di ligando da testare detto "ligando freddo", il quale può essere uguale o diverso dal radiomarcato per cui si parla rispettivamente di "spiazzamento omologo o eterologo". Si ottengono delle curve dette appunto di "spiazzamento", la cui pendenza è descritta da un fattore detto *slope* o *Hill slope*. Esse sono costruite ponendo in ascissa la concentrazione del ligando spiazzante o ligando non marcato e in ordinata la % di radioattività letta, espressa in conteggi per minuto (CPM) o disintegrazioni al minuto (DPM) (Fig 21). Nella figura 21 è possibile distinguere: a) il *binding* totale, rappresentato dalla parte superiore (*top*) della curva b) il *binding* aspecifico è un *plateau*, il quale è rappresentato dalla parte inferiore (*bottom*) della curva. Il *binding* specifico è dato dalla differenza tra il *bottom* e il *top*.

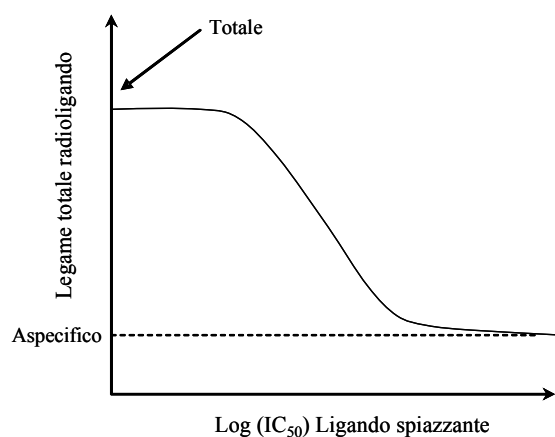


Fig. 21

La concentrazione di ligando non marcato in grado di spiazzare il 50% del radioligando è indicata come IC_{50} . A partire dalla IC_{50} viene calcolata la costante di affinità (K_i) del ligando freddo mediante la seguente equazione, nota come equazione di Cheng e Prusoff:

$$[K_i] = \frac{IC_{50}}{1 + [Radioligando] / K_d}$$

(7)

9.5.1 BINDING DI SPIAZZAMENTO SIGMA-1

Sei diverse concentrazioni di ligando da testare (da 10^{-5} a 10^{-10} M) vengono incubate a $37\text{ }^\circ\text{C}$ per 2 h e 30' con la [^3H]-(+)-*cis*-Pentazocina (3 nM, 29 Ci/mM, $K_d = 14$) e con 500 $\mu\text{g}/400\ \mu\text{l}$ di membrane, opportunamente preparate da cervello di cavia⁽¹²⁷⁾ in un buffer di TRIS HCL 50 mM, pH=7,4 e a $25\text{ }^\circ\text{C}$. Il *binding* aspecifico è stato determinato con aloperidolo (10 μM). Dopo incubazione si filtra su filtri GF6/C WHATMAN, 1 h prima trattati con una soluzione di polietilenimmina 0,5% e, si lavano (2 x 4 ml) con TRIS HCL 50 mM (pH=7,4 a $4\text{ }^\circ\text{C}$). Ai filtri, posti nelle corrispondenti *vials*, si aggiungono 4 ml di liquido di scintillazione (Ultima Gold MV) e dopo circa 10-12 ore si esegue la lettura dei campioni al β -counter 1414 Winspectral PerkinElmer Fallace. I dati ottenuti vengono elaborati mediante il software *EBDA-radlig* al fine di calcolare il valore di K_i (nM) del composto saggiato.

9.5.2 BINDING DI SPIAZZAMENTO SIGMA-2

Sei diverse concentrazioni di ligando da testare (da 10^{-5} a 10^{-10} M) vengono incubate a 25 °C per 2 h con 360 µg/300 µl di membrane, opportunamente preparate da cervello di cavia⁽¹²⁸⁾ e con la [³H]-1,3-di(2-tolil)-guanidina (3 nM, 53.3 Ci/mM, $K_d = 11$) in presenza del bloccante sigma-1 selettivo, SK&F10,047 (400 nM) in un buffer di TRIS HCL 50 mM, pH= 8 e a 25 °C. Il *binding* aspecifico è stato determinato con DTG (5 µM). Dopo incubazione si filtra su filtri GF6/C WHATMAN, 1 h prima trattati con una soluzione di polietilenimmina 0,5% e, si lavano (2 x 4 ml) con TRIS HCL 10 mM (pH=8 a 4 °C). Ai filtri, posti nelle corrispondenti *vials*, si aggiungono 4 ml di liquido di scintillazione (Ultima Gold MV) e dopo circa 10-12 ore si esegue la lettura dei campioni al β -counter 1414 Winspectral PerkinElmer Fallace. I dati ottenuti vengono elaborati mediante il software *EBDA-radlig* al fine di calcolare il valore di K_i (nM) del composto saggiato.

9.6 RISULTATI SAGGI DI BINDING

Tab. 2

σ affinità di legame (K_i , nM)			
	σ_1	σ_2	
Composto	[³ H] (+)-PTZ	[³ H] (+)-DTG + SK&F 10,047	$K_i\sigma_2/K_i\sigma_1$
10	13.5 ± 0.5	160.4 ± 8	11.8
11	25.69 ± 2	100.8 ± 4	3.9
12	1.14 ± 0.8	14 ± 2	12.3
13	5.56 ± 0.5	2302 ± 45	414
21	115 ± 1	21000 ± 400	182.6
22	0.4 ± 0.0	11.25 ± 0.55	28
23	1.25 ± 0.25	35.5 ± 2.5	28.4
24	1700 ± 100	10600 ± 300	6.23
25	1.8 ± 0.2	637 ± 15	353.8
26	8.4 ± 1	209 ± 11	24.8
27	10 ± 2	91.6 ± 7	9.16
R-13	17.7 ± 1.5	1870 ± 20	105.6
R-25	6.1 ± 0.4	1245 ± 17	204.1
R-26	8.5 ± 0.3	157 ± 3	18.47
Aloperidolo	1.319 ± 0.3	3.18 ± 0.2	2.4
Pentazocina	3.62 ± 0.4	N.D*	-

* Non determinato

10. CONCLUSIONI

In conclusione, sui composti *N*-(1-benzilpiperidin-4-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanamide (**CVPO-1**), (1-benzilpiperidin-4-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentanoato (**13**), 1-(4-benzilpiperazin-1-il)-5-(1,2-ditiolan-3-il)pentan-1-one (**25**) e 5-(1,2-ditiolan-3-il)-1-[4-(2-feniletil)piperazin-1-il]pentan-1-one (**26**) sono stati eseguiti dalla Cerep saggi di *binding* σ_1 e σ_2 recettoriale al fine di valutare la loro affinità e selettività. Tutti i composti sintetizzati si sono dimostrati affini per il recettore σ_1 , mentre sono poco affini per il sottotipo σ_2 . Pertanto, essi hanno rappresentato i miei composti *leads* per lo sviluppo di ligandi bifunzionali. Dall'analisi dei dati ottenuti è emerso che la sostituzione del gruppo prossimale sull'atomo di azoto piperazinico con un gruppo non idrofobico come il metile (**21**) comporta una perdita di affinità σ_1 e σ_2 ($K_i\sigma_1 = 115 \pm 1$ nM; $K_i\sigma_2 = 21000 \pm 400$). Questo risultato risulta in accordo con gli studi SAR di Glennon e coll. confermando l'importanza del gruppo idrofobico prossimale. Ciò è confermato dai dati ottenuti per i composti a struttura ammidica (**24-27**) dove risulta fondamentale per l'interazione σ_1 recettoriale la presenza dell'anello aromatico. Tuttavia, quest'ultimo non deve essere legato direttamente all'*N* basico dell'anello piperazinico, infatti, nel composto **24** ho riscontrato una drastica perdita di affinità per entrambi i sottotipi ($K_i\sigma_1 = 10 \pm 2$ nM; $K_i\sigma_2 = 91.6 \pm 7$). L'introduzione di uno *spacer* -CH₂-, -CH₂-CH₂- e -CH₂-CH₂-CH₂- tra l'anello aromatico prossimale e l'atomo di azoto presente rispettivamente nei composti **25**, **26** e **27** induce invece un notevole incremento dell'affinità sigma-1 e parallelamente anche di quella sigma-2. Nello specifico, la catena metilenica sembra essere ottimale poiché si osserva un'elevata affinità σ_1 nel composto **25** ($K_i\sigma_1 = 1.8 \pm 0.2$ nM; $K_i\sigma_2 = 637 \pm 15$). La sostituzione dell'anello aromatico con un cicloesile (**22**) e metil-cicloesile (**23**) induce un significativo incremento dell'affinità sigma-1 ma anche sigma-2. Il composto **22** ha un'affinità subnanomolare verso i recettori σ_1 ($K_i\sigma_1 = 0.4 \pm 0.0$ nM). Questo stesso profilo di affinità si è osservato anche quando è presente all'azoto un gruppo metilcicloesilico (**24**) (Tab. 2). Pertanto la presenza di un sostituito cicloesilico non modifica l'affinità recettoriale σ_1 a differenza di quanto avviene con il

corrispondente composto con il sostituito aromatico (**24**). Il raffronto dati di affinità dei composti **23** e **25** suggeriscono l'importanza dell'anello aromatico per l'affinità σ_1/σ_2 . Mentre l'affinità per i siti σ_1 risulta sovrapponibile, quella per i siti σ_2 risulta notevolmente più bassa nel composto **25** ($K_{\sigma_2} = 637 \pm 15$ nM) rispetto al suo omologo saturo **23** ($K_{\sigma_1} = 35.5 \pm 25$ nM). Questo risultato indica l'importanza dell'anello aromatico ai fini della selettività σ_1/σ_2 . Un profilo di selettività simile è stato osservato per il composto **13** (Tab.2) Poiché in questo composto non è presente una funzione ammidica ma quella esterea è possibile concludere che in termini di affinità e di selettività il ruolo discriminante è giocato dal gruppo lipofilo prossimale e non dalla catena spaziatrice (regione B del modello di Gilligan). Tuttavia, dato che negli studi SAR fatti da Gilligan questa porzione strutturale conferiva ai ligandi testati una selettività sigma verso altri sistemi recettoriali sarebbe interessante screenare questi composti su altri *targets* recettoriali.

L'affinità σ_1 è mantenuta anche nei composti esterei **10** e **11** nei quali è presente una catena etilica e propilica rispettivamente tra le regioni A e C. Tuttavia, in termini di affinità σ_2 non si osservano dei cambiamenti significativi. Il profilo di affinità e di selettività dei composti racemici **13**, **25** e **26** è stato investigato. I ottenuti dei corrispondenti enantiomeri destrogiri **R-13**, **R-25** e **R-26** mostrano una leggera diminuzione dell'affinità sigma-1 e un miglioramento dell'affinità σ_2 per i composti **R-13** e **R-26**, mentre una perdita di affinità si registra per il composto, **R-25** (Tab.2) . Nel complesso, tuttavia, in termini di affinità e di selettività i racemi mostrano un profilo migliore.

I dati ottenuti confermano che requisiti strutturali presenti sono ottimali per una interazione selettiva σ_1 . In particolare la presenza dell'anello 1,2-ditiolanico, che dovrebbe conferire proprietà antiossidanti in analogia all'acido lipoico, sembra conferire i requisiti ottimali per l'interazione con la regione idrofobia distale D. I nostri risultati sottolineano come l'anello idrofobico prossimale e la sua distanza dal centro basico siano pivotali per l'affinità σ_1 e per discriminare il sito σ_2 . Questo dato è di particolare rilevanza se consideriamo che la maggior parte dei ligandi sigma non è in grado di discriminare tra i due

sottotipi σ_1/σ_2 . Rimane comunque da investigare sia l'attività esplicata sui recettori σ_1 , se agonista o antagonista, anche se esperimenti preliminari condotti *in vivo* sembrano evidenziare un'attività di tipo agonista. Infine, per verificare i presupposti progettuali si dovranno effettuare degli studi sull'attività antiossidante di questi composti in relazione ad agonisti σ_1 che siano privi, nella loro struttura, di frammenti strutturali con azione antiossidante.

Data l'overespressione dei recettori sigma nelle cellule tumorali e gli effetti neuroprotettivi dell'acido α -(\pm)-lipoico contro la neurotossicità indotta dalla chemioterapia antitumorale, i ligandi saggiati potrebbero rappresentare dei validi *tools* per contrastare gli effetti collaterali da essa indotti.⁽¹²⁹⁾

BIBLIOGRAFIA

- 1) Jellinger, K. A. General aspects of neurodegeneration. *J. Neural Transm Suppl.* **2003**, 101-144.
- 2) Jellinger, K. A. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update *J Cell Mol Med.* **2010**, 14, 3, 457-487.
- 3) Mi, K.; Johnson, G. V. The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* **2006**, 3, 5, 449-463.
- 4) Saito, Y.; Kawashima, A.; Ruberu, N. N.; Fujiwara, H.; Koyama, S.; Sawabe, M.; Arai, T.; Nagura, H.; Yamanouchi, H.; Hasegawa, M.; Iwatsubo, T.; Murayama, S. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* **2003**, 62, 6, 644-654.
- 5) Gaeta, A.; Hider, R. C. The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br J Pharmacol.* **2005**, 146, 8, 1041-1059.
- 6) Lin, M. T.; Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* **2006**, 443, 7113, 787-795.
- 7) Carvajal, F.J.; Inestrosa, N. C. Interactions of AChE with A β Aggregates in Alzheimer's Brain: Therapeutic Relevance of IDN 5706. *Front Mol Neurosci.* **2011**, 4:19.
- 8) LaFerla, F. M.; Green, K.K.; Oddo, S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* **2007**, 8, 7, 499-509.
- 9) Canevari, L.; Clark, J. B.; Bates, T. E. Beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett.* **1999**, 457, 1, 131-134.
- 10) Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* **2010**, 362, 4, 329-344.
- 11) Reddy, V. P.; Obrenovich, M. E.; Atwood, C. S.; Perry, G.; Smith, M. A. Involvement of Maillard reactions in Alzheimer disease. *Neurotox Res.* **2002**, 4, 3, 191-209.
- 12) Lovell, M. A.; Ehmann, W.D.; Butler, S.M.; Markesbery, W. R. Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology.* **1995**, 45, 8, 1594-1601.
- 13) Pappolla, M.A.; Omar, R. A.; Kim, K. S.; Robakis, N. K. Immunohistochemical evidence of oxidative [corrected] stress in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* **1992**, 140, 3, 621-628.

- 14) Mattson, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*. **2004**, 430, 7000, 631-639.
- 15) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford, Clarendon Press, **1989**.
- 16) Pryor, W. A. Free radicals in biology. Vol. 1, 3. Academic press, New York, **1976**.
- 17) Simonian, N. A.; Coyle, J. T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **1996**, 36, 83-106.
- 18) Goldstein, S.; Meyerstein, D.; Czapski, G. The Fenton reagents. *Free Radic Biol Med*. **1993**, 15, 4, 435-445.
- 19) Turrens, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. **2003**, 552, (Pt 2), 335-344.
- 20) Mattson, M. P.; Gleichmann, M.; Cheng, A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*. **2008**, 60, 5, 748-766.
- 21) Halliwell, B. Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol*. **1997**, 38, 3-20.
- 22) Knight, J. A. Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci*. **1998**, 28, 6, 331-346.
- 23) Reed, L. J.; Debusk, B. G.; Gunsalus, I. C.; Hornberger, C. S. Jr. Crystalline alpha-lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*. **1951**, 114, 2952, 93-94.
- 24) Singh, U., Jialal, I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr Rev*. **2008**, 66, 11, 646-657.
- 25) Goraca, A.; Huk-Kolega, H.; Piechota, A.; Kleniewska, P.; Ciejka, E.; Skibska, B. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep*. **2011**, 63, 4, 849-858.
- 26) Carlson, D. A.; Smith, A. R.; Fischer, S. J.; Young, K. L.; Packer, L. The plasma pharmacokinetics of R-(+)-lipoic acid administered as sodium R-(+)-lipoate to healthy human subjects. *Altern Med Rev*. **2007**, 12, 4, 343-351.
- 27) Packer, L.; Witt, E. H.; Tritschler, H. J. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*. **1995**, 19, 2, 227-250.

- 28) Bast, A.; Haenen, G. R. Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors*. **2003**, 17, (1-4), 207-213.
- 29) Liu, J. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha-lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. *Neurochem Res*. **2008**, 33, 1, 194-203.
- 30) Zhang, L.; Xing, G. Q.; Barker, J. L.; Chang, Y.; Maric, D.; Ma, W.; Li, B. S.; Rubinow, D. R. Alpha-lipoic acid protects rat cortical neurons against cell death induced by amyloid and hydrogen peroxide through the Akt signalling pathway. *Neurosci Lett*. **2001**, 312, 3, 125-8.
- 31) Haugaard, N.; Levin, R. M. Activation of choline acetyl transferase by dihydrolipoic acid. *Mol Cell Biochem*. **2002**, 229, (1-2), 103-106.
- 32) Ono, K.; Hirohata, M.; Yamada, M. Alpha-lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. **2006**, 341, 4, 1046-1052.
- 33) Virmani A.; Gaetani, F.; Binienda, Z. Effects of metabolic modifiers such as carnitines, coenzyme Q10, and PUFAs against different forms of neurotoxic insults: metabolic inhibitors, MPTP, and methamphetamine. *Ann N Y Acad Sci*. **2005**, 1053, 183-191.
- 34) Bowen, W. D., Hellewell, S. B. Characterization of sigma receptors on PC12 cells: pharmacological differences from rat and guinea pig brain indicate sigma receptor heterogeneity. *Soc. Neurosci. Abst*. **1988**, 14, 703.
- 35) Martin, W. R.; Eades, C. E.; Thompson, J.A.; Huppler, R. E. The effects of morphine and nalorphine-like in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther*. **1976**, 197, 517-532.
- 36) Khazan, N.; Young, G. A.; El-Fakany, E. E.; Hong. O.; Calligaro, D. Sigma receptors mediated the psychotomimetic effects of N-allylnormetazocine (SKF-10,047), but not its opioid agonistic-antagonistic properties. *Neuropharmacology*, **1984**, 23, 8, 983-987.
- 37) Mendelsohn, L. G.; Kalra, V.; Johnson, B. G.; Kerchener, G. A. Sigma opioid receptor: characterization and co-identity with the phencyclidine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. **1985**, 233, 3, 597-602.
- 38) Su, T-P. Psychotomimetic opioid binding: Specific binding of [³H]-SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *Eur J Pharmacol*. **1981**, 75, 1, 81-82.

- 39) Su, T-P. Evidence for sigma opioid receptor: Binding of [³H]-SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain. *Eur J Pharmacol.* **1982**, 233, 2, 284-290.
- 40) Tam, S. W.; Cook L. σ Opiates and certain antipsychotic drugs mutually inhibit (+)-[³H]-SKF-10047 and [³H]haloperidol binding in guinea pig brain membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1984**, 81, 17, 5681-5621.
- 41) Hjorth, S A.; Carlsson, A.; Wikstrom, H.; Lindberg, P.; Sanchez, D.; Hacksell, U.; Arvidsson, L. E.; Svensson, U.; Nilsson, J. L. G. 3-PPP, a new centrally acting dopamine receptor agonist with selectivity for autoreceptors. *Life Sci.* **1981**, 28, 11, 1225-1238.
- 42) Weber, E.; Sonders, M.; Quarum, M.; McLean, S., Pou, S.; Keana, J. F. W. 1,3-Di(2-[5-[³H]tolyl]guanidine: A selective ligand that labels σ -type receptors for psychotomimetic opiates and antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1986**, 83, 22, 8784-8788.
- 43) Rothman, R.B., Bykov, V., Newman, A.H., Jacobson, A. E., Rice, K.C. Interaction of enantiomeric pairs of opiates with phencyclidine binding sites in the rat brain: identification of (+)-pentazocine as a ligand potentially suitable for imaging sigma binding sites using positron emission tomography. *Neuropeptides.* **1998**, 12, 1, 1-5.
- 44) Hanner, M.; Moebius, F. F.; Flandorfer, A.; Knaus, H-G, Striessing, J.; Glossmann, H. Purification, molecular cloning, and expression of the mammalian σ_1 binding site. *Natl Acad Sci USA.* **1996**, 93, 15, 8072-8077.
- 45) Prasad, P. D.; Li, H. W.; Fei, Y. J.; Ganapathy, M. E.; Fujita, T.; Plumley, L. H., Yang-Fenhuman, T. L.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V. Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the type 1 σ receptor gene. *J Neurochem.* **1998**, 70, 2, 443-451.
- 46) Mobius, F. F.; Streissnig, J.; Glossman, H. The mysteries of σ receptors: new family members reveal a role in cholesterol synthesis. *Trends Pharmacol Sci.* **1997**, 18, 3, 67-70.
- 47) Seth, P.; Fei, Y. J.; Li, H. W.; Huang, W.; Leibach, F. H.; Ganapathy, V. Cloning and functional characterization of a σ receptor from rat brain. *J Neurochem.* **1998**, 70, 3, 992-931.
- 48) Pan, Y-X, Mei, J.; Xu, J.; Wan, B-L.; Zuckerman; A.; Pasternak, GW. Cloning and characterization of a σ receptor from rat brain. *J Neurochem.* **1998**, 70, 6, 2279-2285.
- 49) Mei, J.; Pasternack, G. W. Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma 1 receptor. *Biochem Pharmacol.* **2001**, 62, 3, 349-355.

- 50) Aydar, E.; Palmer, C. P.; Klyachko, V. A.; Jackson, M. B. The sigma receptor as a ligand-regulated auxiliary potassium channel subunit. *Neuron*. **2002**, 34, 3, 399-410.
- 51) Yamamoto, H.; Miura, R.; Yamamoto, T.; Shinohara, K.; Watanabe, M.; Okuyama, S.; Nakazato, A., Nukada, T. Amino acid residues in the transmembrane domain of the type 1 sigma receptor critical for ligand binding. *FEBS Lett*. **1999**, 445, 1, 19-22.
- 52) Pal, A., Hajipour, A. R.; Fontanilla, D.; Ramachandran, S.; Chu, U. B.; Mavlyutov, T.; Ruoho, A. E. Identification of regions of the **sigma**-1 receptor ligand binding site using a novel photoprobe. *Mol Pharmacol*. **2007**, 72, 4, 921-933.
- 53) Vilner, B. J.; Bowen, W. D. Modulation of cellular calcium by sigma-2 receptors: Release from intracellular stores in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. **2000**, 292, 3, 900-911.
- 54) Bowen, W. D.; Crawford, K.W.; Huang, S., Walker, J. W. Activation of sigma-2 receptors causes changes in ceramide levels in neuronal and non-neuronal cell lines. *Soc Neurosci. Abst*. **2000**, 26, 601.
- 55) Mach, R. H.; Smith, C. R.; al-Nabulsi I, Whirrett, B. R.; Childers, S.R.; Wheeler, K.T. Sigma-2 receptors as potential biomarkers of proliferation in breast cancer. *Cancer Res*. **1997**, 57:156-161.
- 56) Vilner BJ, Bowen B. D. Sigma-1 and sigma-2 are expressed in a wide variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*. **1995**, 57, 12, 408-413.
- 57) Crawford, K. W.; Bowen, W. D. Sigma-2 receptor agonists activate a novel apoptotic pathway and potentiate antineoplastic drugs in breast tumor cell lines. *Cancer Res*. **2002**, 62, 1, 313-322.
- 58) Teitz, T.; Lahti, J. M., Kidd, V. J. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med*. **2001**, 79, 428-436.
- 59) Gasco, M.; Crook, T. p53 members and chemoresistance in cancer: what we know and what we need to know. *Drug Resist Update*. **2003**, 6, 6, 323-328.
- 60) Ryan, K. M.; Vousden, K. H. Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*. **1998**, 18, 7, 3692-3698.
- 61) Stein, W. D, Bates, S. E.; Fojo, T. Intractable cancers: the many faces of multidrug resistance and the many targets it presents for therapeutic attack. *Curr Drug Targets*, **2004**, 5, 4, 333-346.

- 62) Longley, D. B.; Johnston, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* **2005**, 205, 2, 275-292.
- 63) Couture, S.; Debonnel, G. Modulation of the neuronal response to N-methyl-D-aspartate by selective σ_1 ligands. *Sinapse.* **1998**, 29, 1, 62-71.
- 64) Derbez, A. E.; Werling, L. L. Sigma-2 receptor regulation of dopamine transporter activity via protein kinase C. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002**, 301, 1, 306-314.
- 65) Liu, X.; Nuwayhid, S., Christie, M., Kassiou, M., Werling, L. L. Trishomocubanes: novel σ ligands modulating amphetamine-stimulated [3 H]dopamine release in vitro. *Eur J Pharmacol.* **2001**, 422, (1-3), 39-45.
- 66) Wolfe, S. A. Jr.; Ha, B. K., Whitlock, B. B.; Saini, P. Differential localization of three distinct binding sites for sigma receptor ligands in rat spleen. *J Neuroimmunol.* **1997**, 72, 1, 45-58.
- 67) Novakova, M.; Ela, C.; Barg, J.; Vogel, E.; Hasin, Y., Eilam, Y. Ionotropic action of sigma receptor ligands in isolated cardiac myocytes from adult rats. *Eur J Pharmacol.* **1995**, 286, 1, 19-30.
- 68) Su, T. P.; London, E. D.; Jaffe, J. H. Steroid binding at sigma receptors suggests a link between endocrine, nervous, and immune system. *Science.* **1988**, 240, 4849, 219-222.
- 69) Bouchard, P.; Quirion, R. [3 H]1,3-di(2-tolyl)guanidine and [3 H](+)pentazocine binding sites in the rat brain: autoradiographic visualization of the putative sigma 1 and sigma 2 receptor subtypes. *Neuroscience.* **1997**, 76, 2, 467-477.
- 70) Leitner, M. L.; Hohmann, A. G.; Patrick, S. L.; Walker, J. M. Regional variation in the ratio of sigma 1 to sigma 2 binding in rat brain. *Eur J Pharmacol.* **1994**, 259, 1, 65-69.
- 71) Hayashi, T.; Su, T. P. The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: implication for drug abuse. *Life Sci.* **2005**, 77, 14, 1612-24.
- 72) Palmer, C. P.; Mahen, R., Schnell, E.; Djamgoz, M.B.; Aydar, E. Sigma-1 receptors bind cholesterol and remodel lipid rafts in breast **cancer** cell lines. *Cancer Res.* **2007**, 67, 23, 11166-11175.
- 73) Hayashi, T.; Su, T.P. Sigma-1 receptors at galactosylceramide-enriched lipid microdomains regulate oligodendrocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**, 101, 41, 14949-14954.

- 74) Hayashi, T.; Fujimoto, M. Detergent-resistant microdomains determine the localization of sigma-1 receptors to the endoplasmic reticulum-mitochondria junction. *Mol Pharmacol.* **2010**, *77*, 4, 517-28.
- 75) Hayashi, T.; Rizzuto, R.; Hajnoczky, G.; Su, T. P. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 2, 81-8.
- 76) Candura, S. M.; Coccini, T., Manzo, L.; Costa, L.G. Interaction of σ -compounds with receptor-stimulated phosphoinositide metabolism in the rat brain. *J Neurochem.* **1990**, *55*, 5, 1742-1748.
- 77) Izquiereo I. Role of NMDA receptors in memory. *Trends Pharmacol Sci.* **1991**, *12*, 128-129.
- 78) McEntee, W. J.; Crook, T. H. Glutamate: Its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology.* **1993**, *111*:391-401.
- 79) Bliss, T. V.; Collingridge, G.L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* **1993**, *361*, 31-39.
- 80) Monnet, F.P., Debonnel, G.; Junien, J. L.; DeMontigny, C. N-Methyl-D-aspartate-induced neuronal activation is selectively modulated by σ receptors. *Eur J Pharmacol.* **1990**, *79*, 441-445.
- 81) Hayashi, T.; Kagaya, A.; Takebayashi, M.; Shimizu, M.; Uchitomi, Y., Motohashi, N., Yamawaki, S. Modulation by sigma ligands of intracellular free Ca^{2+} mobilization by N-methyl-D-aspartate in primary culture of rat frontal cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* **1995**, *275*, 207-214.
- 82) Klette, K. L.; DeCoster, M.A.; Moreton, J. E.; Tortella, F. C. Role of calcium in sigma-mediated neuroprotection in rat primary cortical neurons. *Brain Res.* **1995**, *704*, 31-41.
- 83) Ellis, Y., Davies, J. A. The effects of σ ligands on the release of glutamate from rat striatal slices. *Naunyn-Schmeidebergs Arch Pharmacol* **1994**, *350*, 143-148.
- 84) Matsuno, K.; Matsunga, K.; Mita, S. Increase of intracellular acetylcholine level in rat frontal cortex induced by (+)N-allylnormetazocine as measured by brain microdialysis. *Brain Res.* **1992**, *575*, 315-319.
- 85) Matsuno, K.; Matsunga, K.; Senda, T.; Mita, S. Increase in extracellular acetylcholine level by σ ligands in rat frontal cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* **1993**, *265*, 851-859.

- 86) Horan B, Gifford AN, Matsuno K, Mita S. Ameliorating effects of σ receptor ligands on the impairment of passive avoidance tasks in mice: involvement in the central acetylcholinergic system. *Eur J Pharmacol.* **1994**, 11, 43-51.
- 87) Senda T, Matsuno K, Okamoto K, Kobayashi T, Nakata K, Mita S. Ameliorating effect of SA4503, a novel σ_1 receptor agonist, on memory impairments induced by cholinergic dysfunction in rats. *Eur J Pharmacol*, **1996**, 351, 1-10.
- 88) Gudelsky GA. Effects of σ receptor ligands on the extracellular concentration of dopamine in the striatum and prefrontal cortex of the rat. *Eur J Pharmacol.* **1995**, 286, 223-228.
- 89) Booth RG, Baldessarini RJ. (+)-6,7-benzomorphan σ ligands stimulate dopamine synthesis in rat corpus striatum tissue. *Brain Res*, **1991**, 557:349-352.
- 90) Gonzalez-Alvear GM, Werling LL. Sigma-1 receptors in rat striatum regulate NMDA-stimulated [3 H]dopamine release via a presynaptic mechanism. *Eur J Pharmacol*, **1995**, 294, 713-719.
- 91) Gonzalez-Alvear GM, Werling LL. Release of [3 H]dopamine from guinea pig striatal slices is modulated by σ_1 receptors. *Naunyn-Schmeideberg Arch Pharmacol.* **1997**; 356, 455-461.
- 92) Nuwayhid SJ, Werling LL. Sigma-1 receptor agonist-mediated regulation of N-methyl-D-aspartate-stimulated [3 H]dopamine release is dependent upon PKC. *J Pharm Exp Ther.* **2002**, 364-369.
- 93) Matsumoto R., Bowen D. Su TP. Sigma receptor. Chemistry, Cell Biology and Clinical Implications: 2007, (10) p.195-235.
- 94) Gudelsky GA. Biphasic effect of σ receptor ligands on the extracellular concentration of dopamine in the striatum of rat. *J Neural Transm.* **1999**, 286, 382-391.
- 95) Soriani O, Le Foll F, Galas L, Roman F, Vaudry H, Cazin L. The sigma-ligand (+)-pentazocine depresses M current and enhances calcium conductances in frog melanotrophs. *Am J Physiol.* **1999**, 277(1 Pt 1), E73-80.
- 96) Martina, M.; Turcotte ME, Halman S, Bergeron R. The sigma-1 receptor modulates NMDA receptor synaptic transmission and plasticity via SK channels in rat hippocampus. *J Physiol.* **2007**, 578(Pt 1), 143-157.
- 97) Monnet FP. Sigma-1 receptor as regulator of neuronal intracellular Ca $^{2+}$: clinical and therapeutic relevance. *Biol Cell.* **2005**, 97, 12,873-878.

- 98) Hayashi T, Maurice T, Su TP. Ca(2+) signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular Ca(2+) concentration. *J Pharmacol Exp Ther*. **2000**, 293, 3, 788-798.
- 99) Tsai SY, Hayashi T, Harvey BK, Wang Y, Wu WW, Shen RF, Zhang Y, Becker KG, Hoffer BJ, Su TP. Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1xGTP pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009**, 106, 52, 22468-22473.
- 100) Meunier J, Hayashi T. Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB. *J Pharmacol Exp Ther*. **2010**, 332, 2, 388-397.
- 101) Hayashi T, Su TP. Regulating **ankyrin** dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**, 98, 2, 491-496.
- 102) Morin-Surun MP, Collin T, Denavit-Saubié M, Baulieu EE, Monnet FP. Intracellular sigma-1 receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999**, 96, 14, 8196-8199.
- 103) Smith SB, Duplantier J, Dun Y, Mysona B, Roon P, Martin PM, Ganapathy V. In vivo protection against retinal neurodegeneration by sigma receptor 1 ligand (+)-pentazocine. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2008**, 49, 9, 4154-4161.
- 104) DeCoster MA, Klette KL, Knight ES, Tortella FC. Sigma receptor-mediated neuroprotection against glutamate toxicity in primary rat neuronal cultures. *Brain Res*. **1995**, 671, 1, 45-53.
- 105) Kato K, Hayako H, Ishihara Y, Marui S, Iwane M, Miyamoto M. TAK-147, an acetylcholinesterase inhibitor, increases choline acetyltransferase activity in cultured rat septal cholinergic neurons. *Neurosci Lett*. **1999**, 260, 1, 5-8
- 106) Ishima T, Nishimura T, Iyo M, Hashimoto K. Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells by donepezil: role of sigma-1 receptors and IP3 receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **2008**, 32, 7, 1656-1659.
- 107) Prezzavento O, Campisi A, Parenti C, Ronsisvalle S, Aricò G, Arena E, Pistolozzi M, Scoto GM, Bertucci C, Vanella A, Ronsisvalle G. Synthesis and resolution of cis-(+/-)-methyl (1R,2S/1S,2R)-2-[(4-hydroxy-4-phenylpiperidin-1-yl)methyl]-1-(4-methylphenyl)cyclopropanecarboxylate [(+/-)-PPCC]: new sigma receptor ligands with neuroprotective effect. *J Med Chem*. **2010**, 53, 15, 5881-5585.
- 108) Tsai SY, Rothman RK, Su TP. Insights into the Sigma-1 receptor Chaperone's cellular functions: A microarray report. *Synapse*. **2011**, 66, 1, 42-51.

- 109) Marrazzo A, Caraci F, Salinaro ET, Su TP, **Copani A**, Ronsisvalle G. Neuroprotective effects of sigma-1 receptor agonists against beta-amyloid-induced toxicity. *Neuroreport*. **2005**, 16, 11,1223-1226.
- 110) Meunier J, **Hayashi T**. Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB. *J Pharmacol Exp Ther*. **2010**, 332, 2, 388-397.
- 111) De Haven-Hudkins DL, Fleissner LC. Competitive interactions at [³H]-1,3-(2-tolyl)guanidine (DTG)-defined sigma recognition sites in guinea pig brain. *Life Sci* . **1992**, 50:PL65-PL70.
- 112) Maurice T, Roman FJ, Privat A. Modulation by neurosteroids of the in vivo (+)-[³H]SKF-10,047 binding to sigma₁ receptors in the mouse forebrain. *J Neurosci Res*. **1996**, 46, 734-743.
- 113) Yamada M, Nishigami T, Nakasho K, Nishimoto Y, Miyaji H. Relationship between sigma-like site and progesterone-binding site of adult male liver microsomes. *Hepatology*. **1994**, 20, 1271-1280
- 114) Adult DT, Werling LL. Neuropeptide Y-mediated enhancement of NMDA-stimulated [³H]dopamine release from rat prefrontal cortex is reversed by sigma 1 receptor antagonists. *Schizophr Res*. **1998**, 31, 27-36.
- 115) Roman F, Pascaud X, Duffy O, Vauche D, Martin B, Junien JL. Neuropeptide Y and peptide YY interact with rat brain sigma and PCP binding sites. *Eur J Pharmacol*. **1989**, 174, 301-302.
- 116) Tam SW, Mitchell KN. Neuropeptide Y and peptide YY do not bind to brain sigma and phencyclidine binding sites. *Eur J Pharmacol*. **1991**, 193, 1,121-122.
- 117) Morphy R, Kay C, Rankovic Z. From magic bullets to designed multiple ligands. *Drug Discov Today*. **2004**, 9, 15, 641-651.
- 118) Morphy R, Rankovic Z. Designing multiple ligands - medicinal chemistry strategies and challenges. *Curr Pharm Des*. **2009**, 15, 6, 587-600.
- 119) Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*. **2007**, 131, 3, 596-610.
- 120) Gilligan PJ, Cain GA, Christos TE, Cook L, Drummond S, Johnson AL, Kergaye AA, McElroy JF, Rohrbach KW, Schmidt WK, et al. Novel piperidine sigma receptor ligands as potential antipsychotic drugs. *J Med Chem*. **1992**, 35, 23, 4344-4361.

- 121) Ganapathy ME, Prasad PD, Huang W, Seth P, Leibach FH, Ganapathy V. Molecular and ligand-binding characterization of the sigma-receptor in the Jurkat human T lymphocyte cell line. *J Pharmacol Exp Ther.* **1999**, 289, 1, 251-260.
- 122) Bowen W.D., de Costa B.R., Hellewell S.B., Walker J.M., Rice K.C. [3H](+)-Pentazocine: a potent and highly selective benzomorphan-based probe for Sigma-1 receptors. *Molecular Neuropharmacology.* **1993**, 3, 117-126.
- 123) Weis R, Schweiger K, Faist J, Rajkovic E, Kungl AJ, Fabian WM, Schunack W, Seebacher W. Antimycobacterial and H1-antihistaminic activity of 2-substituted piperidine derivatives. *Bioorg Med Chem.* **2008**, 16, 24,10326-10331.
- 124) Neise B., Steglich W., *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 17 (1978) N°7, 522-524.
- 125) Zhang Williams W, Torrence-Campbell C, Bowen WD, Rice KC. Characterization of novel N,N'-disubstituted piperazines as sigma receptor ligands. *J Med Chem.* **1998**, 41, 25,4950-4957.
- 126) Paoletti R, Nicosia S., Clementi F., Fumagalli G. Interazioni farmaco-recettore e risposta quantitativa ai farmaci. *Farmacologia generale e molecolare*, **1999**.
- 127) Matsumoto, R. R.; Bowen, W. D.; Tom, M. A.; Vo, V. N.; Truong, D. D.; De Costa, B. R. Characterization of two novel sigma receptor ligands: antidystonic effects in rats suggest sigma receptor antagonism. *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 280, 301-310.
- 128) Mach, R. H.; Smith, C. R.; Childers, S. R. Ibogaine possesses a selective affinity for sigma 2 receptors. *Life Sci.* **1995**, 57, L57- L62.
- 129) Melli G, Taiana M, Camozzi F, Triolo D, Podini P, Quattrini A, Taroni F, Lauria G. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. *Exp Neurol.* **2008**, 214, 2, 276-84.