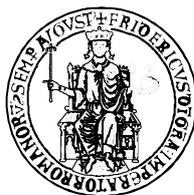


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI

"FEDERICO II"

FACOLTA' DI FARMACIA



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XX CICLO

**Sintesi, caratterizzazione ed attività di profarmaci
per incrementare l'attraversamento
delle membrane cellulari.**

Coordinatori:

Ch.mo Prof. Enrico Abignente

Ch.mo Prof. Maria Valeria D'Auria

Tutor:

Ch.mo Prof. Maria Grazia Rimoli

Candidata:

Dott.ssa Annalisa Curcio

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 La strategia del profarmaco.....	4
1.2 Meccanismi di trasporto cellulare.....	9
1.3 Meccanismi di trasporto del glucosio.....	12
1.4 La famiglia dei trasportatori per gli esosi: i Gluts.....	15
1.5 La Barriera Emato-Encefalica: aspetti morfo-funzionali.....	20
1.6 Trasportatori presenti sulla Barriera Emato-Encefalica.....	23
1.7 Ruolo della Barriera Emato-Encefalica nello sviluppo di farmaci capaci di raggiungere il Sistema Nervoso Centrale.....	27
2. SCOPO DEL LAVORO.....	30
3. GALDA.....	33
3.1 Introduzione: la dopamina.....	33
3.2 Disturbo da Deficit dell'Attenzione ed Iperattività.....	36
3.3 Metodo generale di sintesi del profarmaco galattosilato della dopamina.....	40
3.3 Stabilità chimica ed enzimatica.....	42
3.4 Dosaggio istochimico del galattosio nel cervello.....	43
3.5 Dosaggio del GALDA in omogenati cerebrali.....	45
3.6 Dosaggio della dopamina in omogenati cerebrali.....	47
3.7 Saggi comportamentali.....	49
3.7.1 Esperimenti su ratti NHE.....	49
3.7.2 Esperimenti su topi C57BL/6.....	53
3.8 Conclusioni sul GALDA.....	55
4 D-ASPARTATO.....	57
4.1 Introduzione: il D-aspartato.....	57
4.2 Sintesi dei profarmaci del D-aspartato.....	59
4.2.1 Sintesi del DEE.....	59
4.2.2 Sintesi del GALASPA.....	60
4.3 Saggi comportamentali sul profarmaco DEE.....	61
4.4 Conclusioni sui profarmaci del D-aspartato.....	64
5. NAGAL.....	66
5.1 Introduzione: Nitroarginina e monossido d'azoto (NO).....	66
5.2 Effetti dell' NO.....	69
5.3 Inibitori delle NOS.....	74
5.4 Sintesi chimica.....	78
5.5 Stabilità in vitro.....	79
5.6 Test di vitalità cellulare.....	81
5.7 Dosaggio della L-nitroarginina.....	84
5.8 Conclusioni sul NAGAL.....	86
6. CONCLUSIONI.....	87
7. PARTE SPERIMENTALE.....	88
7.1 Sintesi Chimica.....	88
<i>Sintesi dell'1,2,3,4-diisopropilidene-α-D-galattopiranoside-6-O-succinil estere (1)</i>	89
<i>Sintesi del Diacetone 6-O-[N-(3,4-diidrossifenilettil)-succinamil]-α,β-D- galattopiranoside (2)</i>	90
<i>Sintesi del 6-O-[N-(3,4-diidrossifenilettil)-succinamil]-α,β-Dgalattopiranosio (GALDA)</i> ... 91	91
<i>Sintesi del D-Aspartato Dietil Estere (DEE)</i>	92
<i>Sintesi del Diacetone 6'-O-(Boc-D-aspartato-4-benzil)-D-galattopiranoside (3)</i>	93
<i>Diacetone 6'-O-(Boc-D-aspartato)-D-galattopiranoside (4)</i>	94
<i>D-Aspartato-galattosio (GALASPA)</i>	95
<i>Diacetone 6'-O-[N-(Boc)-N^o-(NO₂)-Arginina]-α,β-D- galattopiranoside (5)</i>	96
<i>N^o-NO₂ -Arginina-D- Galatto-6'-il estere (NAGAL)</i>	97

7.2 Stabilità chimica ed enzimatica.....	98
7.3 Dosaggio istochimico del galattosio nel cervello.....	100
7.4 Dosaggio del GALDA in omogenati cerebrali.....	100
7.5 Dosaggio della dopamina in omogenati cerebrali.....	102
7.6 Saggi comportamentali su ratti NHE.....	103
7.7 Saggi comportamentali su topi C57BL/6.....	104
7.8 Saggi comportamentali sul DEE.....	105
7.9 Test di vitalità cellulare sul NAGAL.....	106
7.10 Dosaggio della L-nitroarginina.....	107
Bibliografia.....	109

1. INTRODUZIONE

1.1 La strategia del profarmaco

La definizione di profarmaco risale alla metà del Novecento, quando A. Albert usò il termine “prodrug” per designare composti farmacologicamente inattivi, utilizzabili per modificare le caratteristiche chimico-fisiche dei farmaci, in modo temporaneo, per aumentarne la maneggevolezza e ridurre la tossicità.

Ad oggi, il profarmaco, come definito dalla “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), è un composto che deve subire biotrasformazione per mostrare un effetto farmacologico, costituito dal farmaco o “parent drug” a cui è legato covalentemente uno specifico gruppo non tossico, definito vettore, usato per alterare o eliminare proprietà indesiderate nel “parent drug”.

Il vettore deve formare col farmaco un legame covalente reversibile, in quanto una delle condizioni necessarie per l'utilizzo della strategia del profarmaco è il ripristino del farmaco che andrà a svolgere l'azione terapeutica. Il vettore può essere un gruppo lipofilo, se si vuole aumentare la lipofilia della molecola per sfruttare il meccanismo della diffusione passiva attraverso le membrane biologiche, oppure una molecola che, riconosciuta da uno specifico trasportatore o “carrier” membranario, permette l'internalizzazione del profarmaco nella cellula (Fig. 1).

Altri requisiti che il profarmaco deve rispettare sono l'assenza di tossicità sia del profarmaco sia del vettore liberato e una cinetica di ripristino del farmaco attivo piuttosto rapida, in modo da assicurare un adeguato effetto terapeutico.

L'utilizzo di profarmaci è finalizzato all'eliminazione di determinate caratteristiche indesiderate del “parent drug”, che ne limitano l'uso a causa ad esempio di una scarsa biodisponibilità o di un'elevata tossicità.

Se un farmaco risulta essere troppo idrofilo verrà assorbito poco nel tratto gastrointestinale e più facilmente eliminato dal rene, avrà quindi una scarsa biodisponibilità orale. Questo ostacolo si può superare generalmente andando ad

aumentare la lipofilia del farmaco per facilitare il suo attraversamento delle membrane cellulari. Ciò avviene ad esempio nel caso di una via di somministrazione enterale, in cui il principio attivo deve prima arrivare al circolo sanguigno in seguito all'assorbimento gastrointestinale, e successivamente deve lasciare il circolo ematico per entrare nella cellula bersaglio.

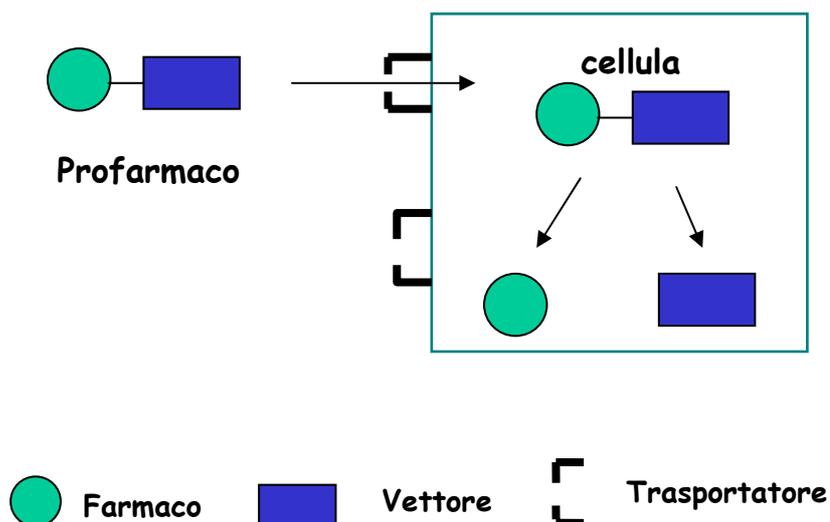


Fig. 1 *Schema di funzionamento del profarmaco*

Aumentare la lipofilia del composto serve a migliorare la sua permeabilità attraverso il bilayer fosfolipidico, ciò farà incrementare sia l'assorbimento del farmaco attraverso il tratto gastrointestinale, sia la durata di azione farmacologica, in quanto non essendo più molto polare non verrà facilmente eliminato con le urine, avendo la possibilità di subire prima la biotrasformazione nel farmaco attivo.

Si può aumentare il grado di lipofilia di un farmaco derivatizzando gruppi funzionali polari in esso presenti, ad esempio farmaci contenenti funzioni alcoliche o acidi carbossilici possono essere trasformati in esteri tramite opportuni vettori che contengano rispettivamente una funzione acida carbossilica o un gruppo alcolico (Fig 2). Essi saranno poi facilmente ripristinati in vivo grazie alla presenza ubiquitaria nel nostro organismo delle esterasi.

Un discorso simile si può fare per le funzioni amminiche di un farmaco, che possono essere derivatizzate in funzioni ammidiche tramite la coniugazione con acidi carbossilici, oppure possono essere trasformate in immine o basi di Schiff, rendendo il farmaco molto meno polare.

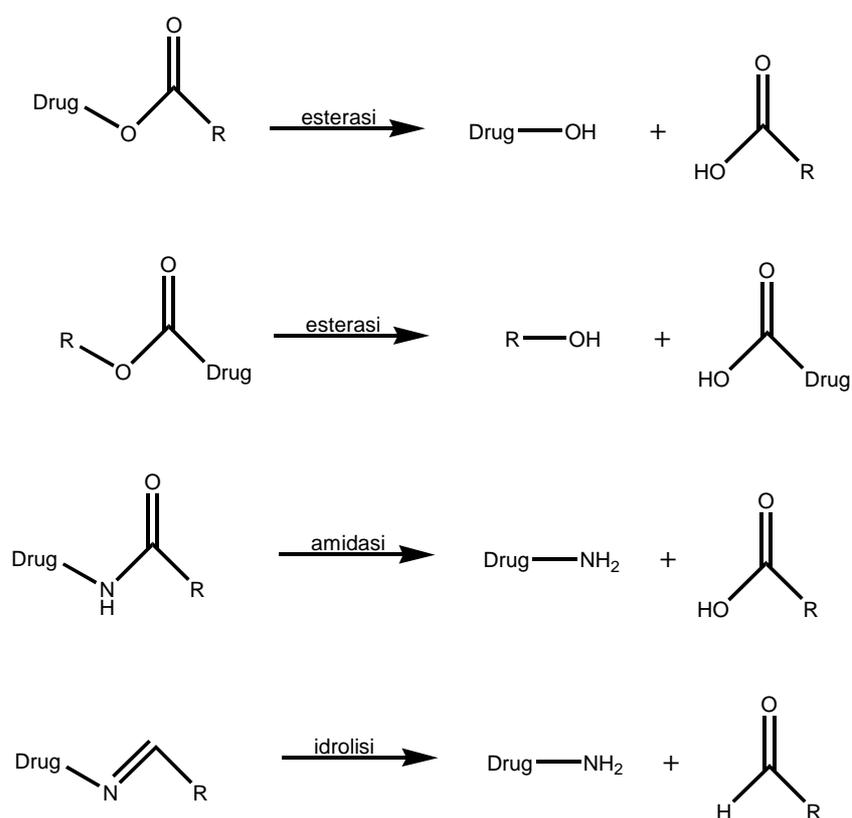


Fig. 2 Funzioni derivatizzabili per sintetizzare profarmaci.

Si può scegliere di derivatizzare con una funzione ammidica oltre che un'ammina anche un acido carbossilico perché le funzioni ammidiche sono meno suscettibili all'idrolisi rispetto a quelle esteree per una minore diffusione delle amidasi, se si escludono quelle specifiche per determinati peptidi. Ciò può far aumentare il tempo necessario per ripristinare il farmaco attivo e quindi favorire l'arrivo di una maggiore quantità di farmaco ad un sito lipofilo, anche se non sempre è applicabile questa via se si ottiene una cinetica di rilascio troppo lenta.

I profarmaci che si ottengono in questo modo sono quasi sicuramente inattivi perché spesso le funzioni polari rappresentano la parte farmacoforica della molecola, ovvero la parte della molecola che va ad interagire con il target recettoriale e che non può essere alterata se si vuole mantenere l'attività della molecola.

Un altro problema cui si può ovviare con la strategia del profarmaco è la limitata solubilità in acqua che può rendere difficile la formulazione e la somministrazione di un farmaco per via parenterale, sia essa endovenosa o intramuscolare. In questo caso la strategia prevede la derivatizzazione di funzioni polari con gruppi o funzioni salificabili, acide o basiche, che vengono trasformate nei corrispondenti sali.

Spesso la mancanza di specificità di azione di un farmaco può rendere necessario l'impiego di un profarmaco che direzioni il "parent drug" tramite un rilascio sito-specifico. A questo proposito il profarmaco dovrebbe essere preferenzialmente trasportato al sito d'azione e selettivamente idrolizzato, per ridurre gli effetti collaterali derivanti al suo ripristino in altri siti. Per la realizzazione di questo tipo di profarmaci si deve identificare prima un enzima specifico che sia presente solo, o in prevalenza, a livello del sito in cui si vuole indirizzare il farmaco e successivamente creare il profarmaco che contenga, tra il "parent drug" ed il vettore, la funzione scindibile esclusivamente da quell'enzima.

Anche se non si identifica un determinato enzima ma c'è nel sito bersaglio una caratteristica peculiare, come un determinato pH o un ambiente ossidante o riducente, diverso rispetto al resto dell'organismo, si può progettare un profarmaco adatto, che, ad esempio, ripristini il farmaco attivo solo in quelle condizioni di pH o in ambiente ossidante o riducente.

Per eliminare la tossicità diretta del farmaco, costituita da reazioni allergiche e danno tissutale al momento della somministrazione, si possono sintetizzare profarmaci che non vengano riconosciuti come allergeni, oppure in cui si eliminano funzioni molto reattive che attaccano indistintamente tutti i tessuti.

Profarmaci si possono progettare per superare la mancanza di stabilità del farmaco, dovuta alla degradazione in vivo, spesso durante il metabolismo di primo passaggio, di gruppi funzionali farmacoforici, necessari per l'attività del farmaco. Questi gruppi vengono protetti con opportuni vettori.

La necessità di un rilascio prolungato al sito d'azione rende spesso necessario derivatizzare un farmaco, ad esempio tramite un estere a lunga catena alifatica, per ottenere un profarmaco in grado di accumularsi in siti lipofili come il tessuto adiposo e che permetta un lento rilascio di farmaco attivo nel circolo sanguigno. Così con somministrazioni singole si mantiene per molto tempo una costante concentrazione di farmaco, cosa utile soprattutto quando la compliance del paziente è bassa.

Infine, l'eliminazione di caratteristiche organolettiche sgradevoli per il paziente, come cattivo odore e sapore di farmaci somministrati per via orale, si può ottenere diminuendo la solubilità in acqua del composto, in modo che esso non interagisca con i recettori del gusto presenti sulla lingua. Anche in questo caso la derivatizzazione con esteri a lunga catena alifatica rappresenta una buona strategia.

Un diverso tipo di profarmaci è rappresentato dai "profarmaci bioprecursori" che sono sempre derivati inattivi di un farmaco di partenza, ma che invece di avere un vettore legato covalentemente, hanno dei gruppi funzionali modificati che vengono metabolizzati tramite le reazioni di fase I nel fegato e biotrasformati nel farmaco attivo. In questo caso si deve progettare il profarmaco pensando a come verrà poi enzimaticamente attaccato durante il metabolismo di primo passaggio, in cui possono essere coinvolte reazioni ossidative, riduttive, o con meccanismi di attivazione misti (Stańczak A. e Ferra A., 2006; Wermut C.G., 2000).

1.2 Meccanismi di trasporto cellulare

La membrana plasmatica oltre a delimitare la cellula rendendola un'entità discreta e creando una netta distinzione tra lo spazio extracellulare e l'ambiente citoplasmatico, svolge importanti funzioni meccaniche e di regolazione di molteplici processi.

Ad esempio essa media il trasporto selettivo all'interno della cellula di sostanze necessarie per il corretto funzionamento cellulare e la secrezione di mediatori endogeni per la comunicazione intercellulare o per una risposta ad uno stimolo intracellulare. Inoltre essa costituisce il supporto di proteine di membrana capaci di fungere da recettori per attivare una serie di risposte biologiche, da marcatori di superficie per il riconoscimento cellulare, da mediatori per l'adesione cellulare, la produzione di energia, soprattutto a livello di organuli interni come i mitocondri.

Fondamentale è la capacità della membrana plasmatica di permettere il passaggio di molecole di diversa natura e grandezza, dallo spazio extracellulare all'interno della cellula, in modo da assicurare la presenza di tutte le sostanze di segnale e nutritive necessarie e di mantenere entro valori corretti di concentrazione i vari ioni necessari all'attività cellulare.

I meccanismi principali di trasporto sono due: il trasporto passivo e il trasporto attivo.

Il trasporto passivo si basa sulla diffusione delle molecole attraverso la membrana, secondo un gradiente di concentrazione, ovvero sul passaggio di determinati composti da una zona a maggiore concentrazione ad una in cui la concentrazione è inferiore, senza nessun consumo di energia.

Il trasporto passivo può avvenire per diffusione semplice o per diffusione facilitata (Fig. 3).

Nel primo caso le molecole entrano nella cellula senza interagire con proteine di membrana, in modo aspecifico, attraversando il bilayer fosfolipidico semplicemente grazie alla loro lipofilia.

Gli ioni ed alcune molecole polari, come il glucosio e gli amminoacidi, penetrano nella cellula per diffusione facilitata, tramite una proteina integrale che, attraversando completamente la membrana, crea un canale, polare o carico, responsabile dell'attraversamento di queste sostanze.

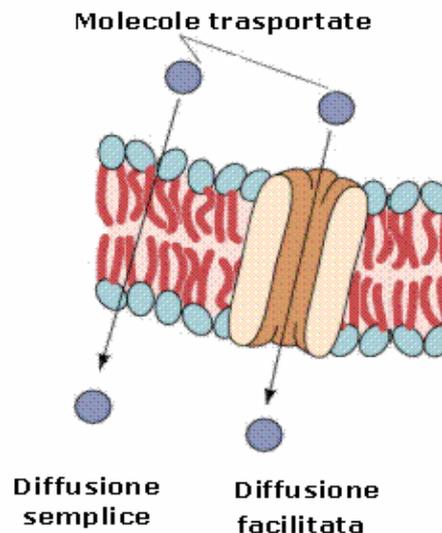


Fig. 3 *Meccanismi di trasporto passivo.*

Nel processo di diffusione facilitata non c'è consumo di energia sotto forma di ATP, ma l'energia necessaria viene fornita esclusivamente dal gradiente di concentrazione delle molecole trasportate. Se la differenza tra la concentrazione esterna e interna della sostanza si annulla, la diffusione facilitata si blocca, mentre se aumenta la diffusione diventa più veloce. Ad un certo punto non c'è più aumento della velocità di diffusione, in quanto si raggiunge la massima capacità di trasporto della proteina canale, ovvero si va incontro al fenomeno di saturazione della proteina. Ciò non avviene nella diffusione semplice, in cui aumentando il gradiente di concentrazione aumenta proporzionalmente anche la diffusione della molecola nella cellula.

Il processo di diffusione facilitata avviene per mezzo di una serie di trasportatori di membrana, come quelli per i cationi Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e per gli anioni Cl^- , e quelli per molecole polari, come il glucosio.

Essi subiscono un cambio conformazionale in seguito all'attacco della molecola specifica, che permette l'internalizzazione ed il rilascio della molecola stessa all'interno della cellula, con ripristino della conformazione iniziale della proteina. Possono essere regolati in diversi modi, ad esempio con un cambio di potenziale o tramite il legame di un ligando specifico, per favorire o inibire l'ingresso della molecola nella cellula.

Le molecole e gli ioni che vengono trasportati per diffusione facilitata possono essere sottoposti anche a trasporto attivo, se nella cellula è necessaria una loro maggiore concentrazione.

Anche nel trasporto attivo sono coinvolte proteine integrali di membrana, ma la differenza è che c'è un consumo di energia sottoforma di ATP, e può esserci anche un trasporto contro gradiente di concentrazione, ovvero nel senso opposto rispetto a quello della diffusione facilitata (Fig. 4).

I trasportatori attivi cambiano anch'essi conformazione per internalizzare la molecola, ma questo meccanismo avviene in seguito all'idrolisi dell'ATP. In questi casi si parla generalmente di pompe ATP-dipendenti, tra cui le più note sono le pompe di tipo P: la pompa H^+ -ATPasi, che pompa H^+ fuori dalla cellula, la pompa Ca^{2+} -ATPasi, che trasporta il Ca^{2+} fuori dalla cellula o nelle vescicole citoplasmatiche del reticolo endoplasmatico, la pompa Na^+/K^+ -ATPasi, che pompa l' Na^+ all'esterno e il K^+ all'interno della cellula.

Nelle vescicole interne degli organuli cellulari si trovano le pompe di tipo V che possono pompare ad esempio l' H^+ dal citoplasma nella vescicola per mantenere costante il pH intracellulare.

Alcune pompe possono essere anche a trasporto attivo indiretto, quando non provocano un'idrolisi diretta di ATP, ma sfruttano il gradiente di concentrazione, mantenuto tramite trasporto attivo diretto, di uno ione mentre pompano un'altra sostanza. In questo caso si verifica il fenomeno del cotrasporto, in cui il gradiente di concentrazione dello ione fornisce la forza trainante per far avvenire il trasporto attivo. In questo caso quindi l'ATP non è consumato direttamente dal trasportatore, ma è consumato per mantenere il gradiente di concentrazione dello ione,

nonostante sia pompato per cotrasporto dalla zona dove è più concentrato a quella in cui è a concentrazione minore.

Se la sostanza, o un altro ione, e lo ione trainante cotrasportato si muovono nella stessa direzione si parla di simporto, mentre quando vengono trasportati in direzioni opposte si parla di antiporto (Wolfe S.L., 2000).

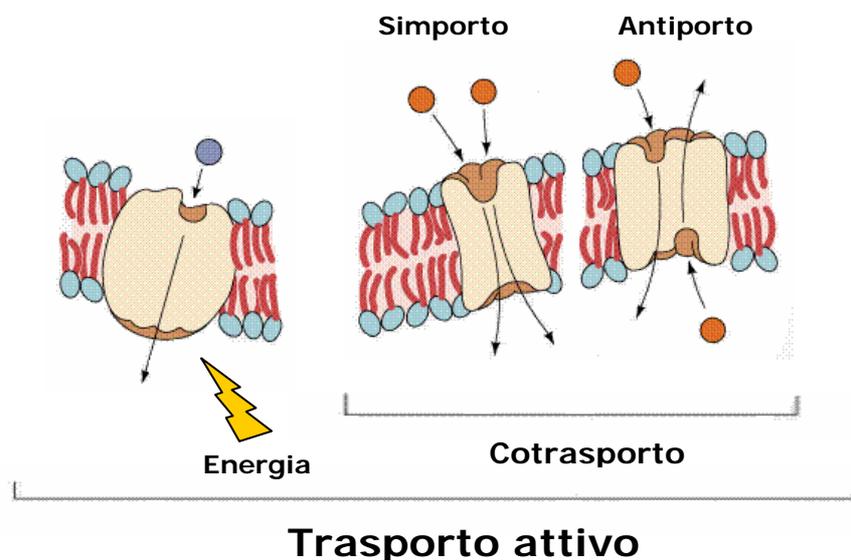


Fig. 4 *Meccanismi di trasporto attivo.*

1.3 Meccanismi di trasporto del glucosio

Il glucosio rappresenta una delle principali risorse energetiche delle cellule, nelle quali riesce ad entrare tramite un meccanismo di diffusione facilitata, mediato da carriers di membrana appartenenti alla famiglia dei trasportatori per gli esosi, denominata con l'acronimo GLUTs (Kluwer Academic, 1999).

In particolare il glucosio costituisce la fonte energetica fondamentale per i tessuti che svolgono funzioni vitali per l'organismo, come il Sistema Nervoso Centrale (SNC) e gli elementi figurati del sangue: globuli rossi, trasportatori di ossigeno, e leucociti, responsabili della risposta immunitaria. Il glucosio fornisce energia in tempi molto rapidi ed anche in condizioni di carenza di ossigeno,

seppure in quantità inferiore, quindi deve essere sempre presente nelle cellule, anche immagazzinato sotto forma di glicogeno.

La principale fonte di glucosio è rappresentata dalla dieta. Esso passa dal lume intestinale al torrente ematico tramite un trasporto transcellulare, attraverso le cellule epiteliali intestinali, dove sono presenti due sistemi di trasporto: un simporto Na^+ /glucosio e il sistema della “glucosio permeasi” (Fig. 5).

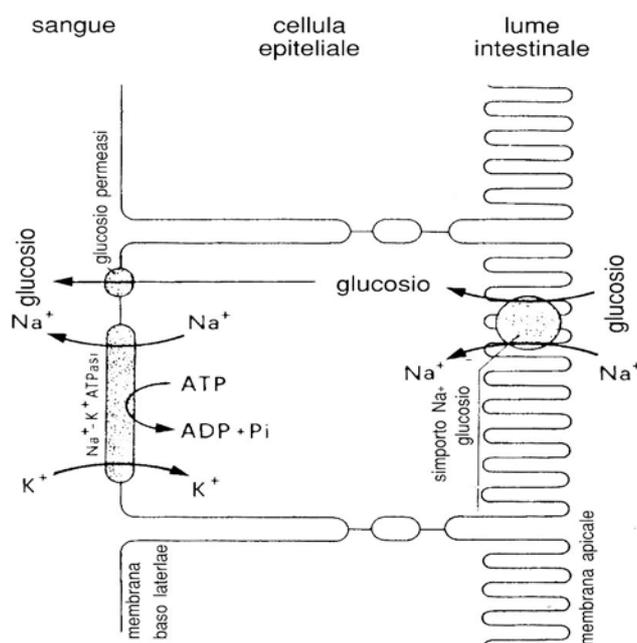


Fig. 5 *Trasporto intestinale del glucosio.*

Il simporto Na^+ /glucosio (SGLT1) è localizzato sulla membrana apicale della cellula epiteliale intestinale e permette il trasporto del glucosio contro il gradiente di concentrazione, grazie al cotrasporto dell' Na^+ .

Il cotrasportatore Na^+ /glucosio (SGLT) è membro di una vasta famiglia di trasportatori sodio-dipendenti che rappresentano un esempio di trasporto attivo di tipo indiretto. Essi sono costituiti da una proteina integrale di membrana avente 12 domini di transmembrana, la cui unità funzionale è un omotetramero. Il loro funzionamento si basa sull'utilizzo del gradiente di Na^+ come fonte di energia per il trasporto attivo del glucosio.

Il gradiente è generato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi, presente sulla membrana basolaterale della cellula, che espelle l' Na^+ con consumo di ATP, in modo da creare una maggiore concentrazione di Na^+ all'esterno della cellula. Una volta generato il gradiente al cotrasportatore si legano il glucosio e l' Na^+ , che rappresenta lo ione trainante, provocando un cambio conformazionale nella proteina che permetterà il rilascio all'interno della cellula dell' Na^+ , secondo il suo gradiente di concentrazione, e del glucosio, contro il suo gradiente di concentrazione.

Il cotrasportatore SGLT è presente anche a livello renale, in diverse isoforme: nel tubulo contorto prossimale l'isoforma SGLT2 serve a recuperare la maggior parte del glucosio presente nella preurina, in quanto possiede una alta capacità di trasporto, ma una bassa affinità per il glucosio che viene subito rilasciato all'interno della cellula; nelle porzioni terminali del neurone invece si trova l'isoforma SGLT1, la stessa presente a livello intestinale, avente alta affinità per il glucosio, necessaria per riassorbire anche le ultime tracce dello zucchero.

Il glucosio concentrato all'interno della cellula intestinale passa nel circolo sanguigno attraverso un sistema di trasporto facilitato presente sulla membrana basolaterale, chiamato "glucosio permeasi", secondo il suo gradiente di concentrazione. Questo carrier appartiene alla famiglia dei trasportatori per gli esosi **Gluts** ed in particolare è codificato dal gene GLUT2. Lo stesso trasportatore è presente a livello dell'epatocita, dove è necessario un fine controllo del livello di glucosio, e delle cellule beta del pancreas, dove il glucosio regola la secrezione di insulina (Clementi F. e Fumagalli G., 2004).

1.4 La famiglia dei trasportatori per gli esosi: i Gluts

La maggior parte delle cellule necessita di glucosio per scopi metabolici, come la produzione di ATP e la sintesi di macromolecole contenenti zuccheri.

Il glucosio entra nella cellula per diffusione facilitata, sfruttando carriers di membrana, adibiti al trasporto degli esosi. La molecola di glucosio internalizzata viene fosforilata dall'enzima esochinasi, con la formazione del glucosio-6-fosfato, che non è più affine per il trasportatore, quindi non può fuoriuscire tramite questa via e non potrà nemmeno attraversare la membrana passivamente a causa della sua elevata idrofilia. Il glucosio-6-fosfato può entrare nella via della glicolisi, per produrre ATP, nella via dei pentosi, necessaria alla cellula per la sintesi del ribosio-5-fosfato e del NADP, oppure, nel caso del fegato e dei muscoli può immettersi nella sintesi del glicogeno, come riserva di glucosio.

I trasportatori degli esosi, indicati con l'acronimo **Gluts**, sono dei carriers che funzionano senza consumo di energia, trasportando il glucosio secondo il suo gradiente di concentrazione.

Il flusso di glucosio tra sangue ed interno della cellula può essere bidirezionale: la cellula può captare lo zucchero dal sangue o rilasciarlo in circolo, a seconda del tipo di cellula e del suo stato metabolico. Ad esempio gli epatociti assumono glucosio quando la sua concentrazione plasmatica è elevata, quindi subito dopo il pasto, immagazzinandolo come glicogeno, ma nei periodi di digiuno espellono il glucosio derivante dalla glicogenolisi e gluconeogenesi, per mantenere livelli plasmatici adeguati al corretto funzionamento di tessuti glucosio-dipendenti, come il cervello e i muscoli.

Sono state individuate nei mammiferi sei isoforme di tali trasportatori, ed i loro relativi geni (Mueckler M., 1994), che vengono nominati da GLUT1 a GLUT7, il GLUT6 è uno pseudogene e non è espresso a livello proteico. Le proteine da essi derivanti vengono invece designate con le stesse sigle, ma con lettere in minuscolo, da Glut1 a Glut7.

La principale caratteristica di queste proteine è la presenza di 12 segmenti transmembranari ad α elica (Fig.6), con i domini ammino-terminale e carbossi-terminale citoplasmatici e una catena oligosaccaridica (o sito di glicosilazione) presente sul primo loop extracellulare, probabilmente con fini regolatori. Cinque domini transmembranari ad α elica (le eliche 3,5,7,8 e 11) sono costituiti da regioni idrofile che formano un poro nella membrana, permettendo il passaggio del D-glucosio attraverso il doppio strato fosfolipidico (Fig.7). Confrontando le varie isoforme si evince che le sequenze amminoacidiche delle eliche transmembranarie sono quelle più conservate rispetto ai loops extramembranari e che è presente una sequenza di 5 amminoacidi (RXGRR), ripetuta nel loop citoplasmatico che connette il secondo e il terzo segmento transmembranario e in quello che connette l'ottavo e nono segmento, e conservata nelle diverse isoforme. Ciò ha suggerito che questi trasportatori derivassero da un gene ancestrale che codificava per una proteina di sei segmenti transmembranari, che con l'evoluzione ha subito un evento di duplicazione.

Queste isoforme hanno diversi ruoli funzionali, come si evince dalla loro specifica distribuzione tessutale e dalle loro distinte proprietà cinetiche e regolatorie. Infatti presentano una diversa efficienza e velocità di trasporto di diversi esosi e la loro espressione è regolata da diversi fattori, sia endogeni che esogeni.

Il Glut1 è l'isoforma dei Gluts più ampiamente espressa nelle cellule, in quanto serve a mantenere i livelli basali di glucosio intracellulare. È maggiormente espresso a livello di barriere epiteliali ed endoteliali, come la Barriera Emato Encefalica (BEE) e la placenta, e negli eritrociti, ma si trova in bassi livelli in molti tessuti e tipi di cellule, fetali e adulte, spesso anche in presenza di altre isoforme. Ciò porta alla conclusione che il Glut1 sia presente costitutivamente sulla membrana plasmatica per mantenere il livello basale di glucosio necessario alla cellula. Quando nella cellula aumenta il fabbisogno energetico, ad esempio per scopi replicativi, si ha una maggiore espressione del Glut1, per incrementare l'ingresso del glucosio. Questo avviene sia in presenza di fattori di crescita, sia a

causa di oncogeni, come conferma la maggiore presenza di Glut1 nei tumori (Smith T.A., 1999; Medina R.A. e Owen G.I. 2002).

Inoltre il Glut1 è caratterizzato da un'ampia specificità di substrato in quanto è in grado di trasportare un grande numero di aldosi, sia pentosi che esosi.

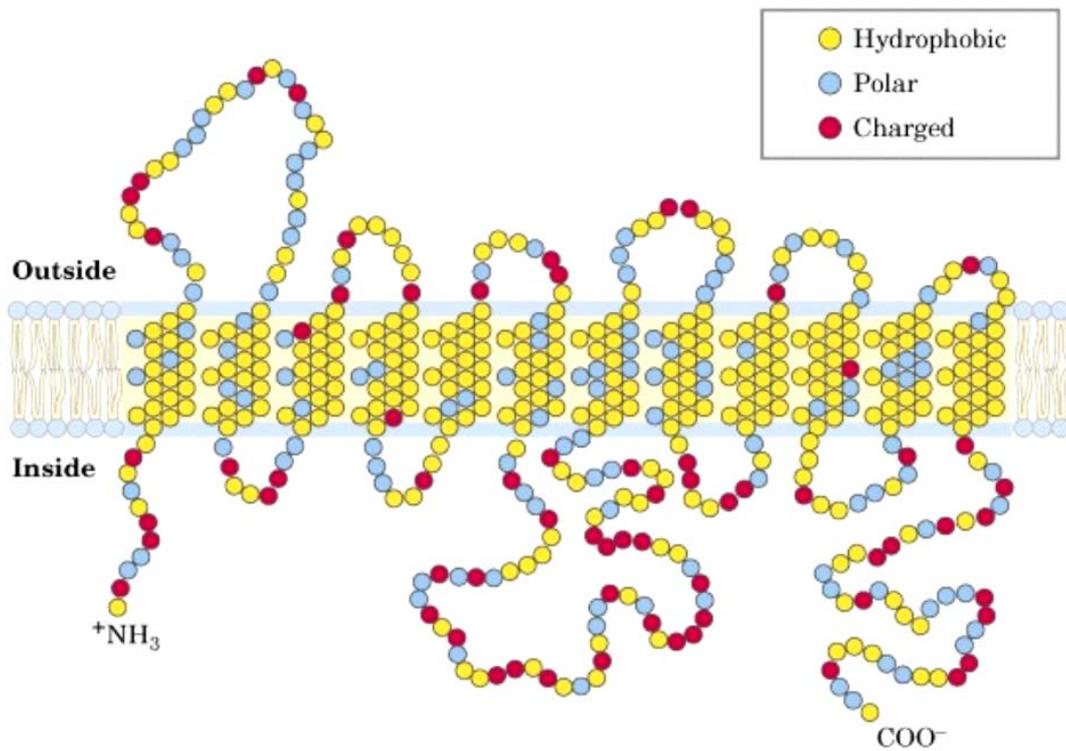


Fig. 6 *Struttura transmembranaria tipica dei Gluts.*

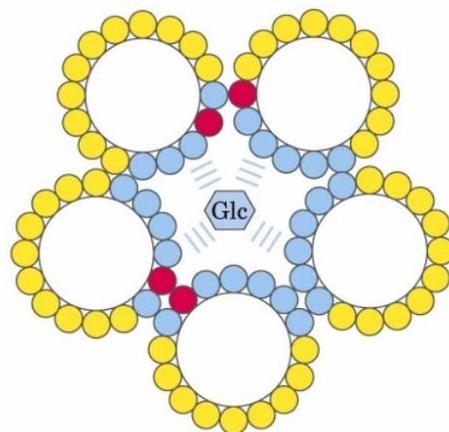


Fig. 7 *Poro idrofilo formato dai Gluts.*

La maggior parte degli studi di cinetica, di termodinamica e di binding sono stati eseguiti sul trasportatore Glut1, l'unica isoforma della famiglia dei trasportatori degli esosi ad essere stata purificata grazie alla sua abbondanza negli eritrociti umani. La purificazione del Glut1 ha permesso la conferma dell'ipotesi sulla struttura tridimensionale del trasportatore, in cui tramite l'interazione di 5 eliche anfipatiche si forma un poro idrofilo, circondato da amminoacidi idrofobici che si posizionano nel bilayer fosfolipidico.

Molte proprietà misurate sul Glut1 sono applicabili a tutti gli altri membri della famiglia dei Gluts, viste le loro simili caratteristiche strutturali. Il trasporto dello zucchero segue la semplice cinetica iperbolica di Michaelis-Menten, in varie condizioni sperimentali (Baldwin S.A., 1993).

Le altre isoforme comprendono il Glut2 che ha un'elevata K_M e si comporta come un sistema ad alta capacità di trasporto, per permettere un sostenuto flusso di glucosio. Si trova negli epatociti, nelle cellule β pancreatiche e nella membrana basolaterale delle cellule epiteliali intestinali e renali.

Il Glut3 è l'isoforma responsabile dell'ingresso del glucosio nei neuroni, ha una bassa K_M ed alta affinità per il glucosio, in modo da operare efficacemente anche a basse concentrazioni dello zucchero, per assicurare sempre ai neuroni questa fonte di energia.

Il Glut4 è localizzato in tessuti insulino-sensibili, come quello adiposo e muscolare, in cui come risposta all'insulina si ha un aumento del trasporto del glucosio. In queste cellule c'è un equilibrio tra processi di endocitosi ed esocitosi delle membrane ad alta concentrazione di Glut4, presenti nell'apparato del Golgi. In condizioni basali questo equilibrio è spostato verso il fenomeno dell'endocitosi, permettendo l'accumulo del Glut4 su queste membrane. In seguito ad uno stimolo insulinico, invece, prevale la via esocitotica, con conseguente aumento del Glut4 sulla membrana plasmatica per la fusione con essa delle vescicole di esocitosi. Questa isoforma è coinvolta nell'omeostasi del glucosio nell'organismo, permettendo l'aumento dei livelli di glucosio nello stato postprandiale.

Il Glut5 è un trasportatore del fruttosio presente nella membrana apicale delle cellule epiteliali intestinali, per l'assorbimento di questo zucchero dalla dieta, e negli spermatozoi, che lo utilizzano nel fluido seminale.

Il Glut7 si trova sulla membrana del Reticolo Endoplasmatico (RE) e regola il flusso di glucosio libero che esce dal lume del RE in seguito all'azione della glucosio-6-fosfatasi, enzima che defosforila il glucosio-6-fosfato.

La tabella 1 riassume le varie isoforme, la loro distribuzione e le loro proprietà cinetiche nei confronti del D-Glucosio, del D-Galattosio e del D-Fruttosio (Kluwer Academic, 1999).

Trasportatore	Distribuzione	K_m (mM) (D-Glu)	K_m (mM) (D-Gal)	K_m (D-Frut)
Glut1	Eritrociti, BEE, placenta, tessuti fetali	17	17	> 5M
Glut2	Fegato, cellule β del pancreas, rene, intestino tenue	42	> 50	66 mM
Glut3	Neuroni cerebrali	11	8.5	N.D.
Glut4	Muscolo scheletrico, cuore, adipociti	2	> 50	N.D.
Glut5	Intestino tenue	N.D.	N.D.	6-14 mM
Glut7	Reticolo endoplasmatico degli epatociti	N.D.	N.D.	N.D.

Tabella1 *Isoforme dei Gluts*

Dalla tabella 1 si evince che il Glut1 è in grado di trasportare con alta affinità sia il D-glucosio che il D-galattosio, questa è una caratteristica molto utile nella progettazione di profarmaci sia glicosilati che galattosilati, anche se l'utilizzo del

D-galattosio come vettore ci permette di evitare un'eccessiva somministrazione di D-glucosio.

Inoltre grazie alla sua alta capacità di trasporto il Glut1 può essere sfruttato per superare il problema dell'elevata lipofilia della BEE che spesso impedisce l'ingresso di importanti farmaci nel SNC, ma anche per direzionare farmaci antitumorali selettivamente a livello delle cellule tumorali che esprimono un maggior numero di Glut1, riducendo gli effetti collaterali derivanti da una terapia antineoplastica.

1.5 La Barriera Emato-Encefalica: aspetti morfo-funzionali

Il concetto di Barriera Emato-Encefalica (BEE) nasce dalle vecchie osservazioni che alcune sostanze, quando vengono iniettate nel circolo sanguigno, non possono raggiungere il Sistema Nervoso Centrale (SNC). Questa barriera permette la formazione di un unico ambiente extracellulare intorno alle cellule del SNC (neuroni, astrociti, periciti), in cui la composizione è finemente controllata. Questo fluido extracellulare comprende il fluido cerebrospinale (CSF), o liquor cefalorachidiano, e il fluido interstiziale spinale, situati tra i ventricoli del cervello e gli spazi cerebrali e spinali subaracnoidei (Begley J.D., 2004).

La BEE è selettiva: acqua, anidride carbonica ed ossigeno la attraversano facilmente; il glucosio passa attraverso di essa per mezzo di un processo di diffusione facilitata, ma altre molecole di grandezza simile non possono passare. Attraverso tale barriera, alcune sostanze possono essere attivamente trasportate nelle due direzioni.

Questo complesso sistema, se generalmente rappresenta un vantaggio, bloccando la penetrazione di micro-organismi e di sostanze tossiche al cervello, in altre condizioni rappresenta uno svantaggio. Ad esempio la penetrazione di farmaci nel cervello viene in molti casi ridotta. La sintesi di farmaci attivi sulle lesioni

cerebrali ma che possano superare la BEE rappresenta un campo di ricerca importante per l'industria farmaceutica (Osculati F., 1995).

La BEE è costituita dalle cellule dell'endotelio cerebrale che hanno caratteristiche diverse rispetto alle cellule endoteliali che rivestono i capillari periferici. Questi ultimi possono essere fenestrati o discontinui: le cellule endoteliali di cui sono costituiti non sono molto associate tra loro, permettendo il passaggio dei nutrienti a livello tissutale dalla circolazione ematica. Le cellule endoteliali cerebrali invece sono continue, non fenestate e strettamente associate tra loro, attraverso le "tight junctions", ovvero giunzioni strette, che permettono all'endotelio di avere un'elevata resistenza e di limitare il flusso di soluti polari. Queste giunzioni strette si formano per l'interazione di diverse proteine transmembrinarie, come le occludine e le claudine, che, essendo fortemente legate tra loro, bloccano la libera diffusione dei soluti disciolti nel fluido interstiziale (Begley J.D., 2004) (Fig.8).

In questo modo si rende più difficile il passaggio di piccole molecole e di macromolecole dal circolo ematico a livello del Sistema Nervoso Centrale (SNC) e ciò avviene principalmente per proteggere il SNC, le cui cellule non sono rigenerabili, dall'ingresso di sostanze tossiche o agenti patogeni.

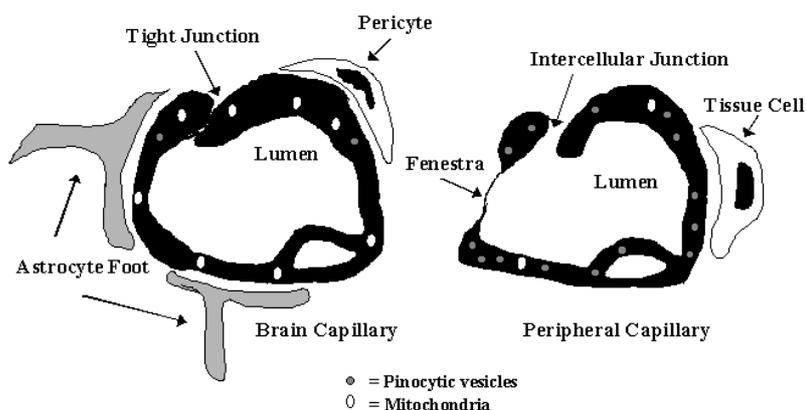


Fig. 8 *Differenza tra capillari cerebrali e periferici.*

Le cellule che circondano l'endotelio cerebrale, come i periciti e le estroflessioni finali degli astrociti, costituenti principali della glia, sembrano contribuire alla stabilità e alla stretta associazione delle cellule endoteliali cerebrali. Queste interazioni cellula-cellula sembrano avvenire tramite secrezione di fattori trofici piuttosto che per un contatto fisico diretto. Studi in vitro hanno dimostrato che la presenza di astrociti è necessaria per la formazione di tight junctions, in quanto essi rilasciano fattori chimici che permettono la stretta adesione tra le cellule dell'endotelio cerebrale (Wolburg H. et al., 1994).

Inoltre nelle cellule endoteliali cerebrali è stata riscontrata una bassa incidenza di fenomeni di endocitosi rispetto alle cellule endoteliali periferiche, tuttavia alcune macromolecole, come peptidi e proteine, sono trasportate all'interno del SNC tramite fenomeni di endocitosi sia recettore mediata sia aspecifica (Begley J.D., 2004).

E' importante ricordare che non tutto il sistema nervoso è protetto dalla BEE, essa viene a mancare in alcune zone, determinando la libertà di passaggio di molte sostanze. Tale assenza è dovuta alla presenza di capillari fenestrati, in cui sono presenti fenestrazioni che non sono delle interruzioni della parete del capillare, ma delle zone in cui la parete è molto sottile essendo chiusa da un diaframma spesso non visibile nemmeno al microscopio elettronico.

Esempi di queste zone sono gli organi circumventricolari e l'epifisi o ghiandola pineale. I primi sono costituiti da parenchima cerebrale disposto intorno ai ventricoli e hanno funzioni di controllo della composizione chimica del CSF e di rilascio di ormoni e neurotrasmettitori. Tra essi c'è il plesso coroide, che ha funzione di secrezione di nuovo CSF e di controllo e regolazione del movimento dei soluti in questo fluido. Un altro degli organi intracranici sprovvisti di BEE è l'ipotalamo, una parte del diencefalo che è deputata al controllo degli apparati viscerali. Per svolgere la sua funzione l'ipotalamo deve monitorare continuamente le sostanze contenute nel sangue e la presenza della BEE costituirebbe un grave ostacolo. Alcune di queste strutture, come la ghiandola pineale e la neuroipofisi,

sono specializzate nel rilascio di fattori neuroendocrini ed ormoni nel circolo ematico.

Nel complesso l'area dei capillari fenestrati presenti negli organi circumventricolari è largamente inferiore rispetto all'area totale della BEE, rendendo trascurabile l'alta permeabilità di queste zone in confronto alla capacità dell'endotelio cerebrale di fungere da barriera (Osculati F., 1995; Begley J.D., 1996).

La principale caratteristica della BEE è l'elevata lipofilia. Quasi tutte le sostanze esogene e tossiche sono idrofile, quindi non possono attraversarla, ma hanno caratteristiche idrofile anche i nutrienti necessari ad assicurare il corretto funzionamento del SNC, come amminoacidi, nucleotidi, peptici a basso peso molecolare, e soprattutto il D-glucosio, che rappresenta la principale fonte energetica del cervello. Essi come tali non attraversano l'endotelio, ma si servono di specifici trasportatori di membrana. Anche la maggior parte dei farmaci (98%) presenta caratteristiche idrofile che impediscono il loro attraversamento della BEE, rendendo necessario lo sviluppo di nuove strategie per indirizzare i farmaci nel SNC (Pardridge W.M., 2002).

1.6 Trasportatori presenti sulla Barriera Emato-Encefalica

Agenti lipofili sono in grado di attraversare la BEE per diffusione passiva, mentre una serie di meccanismi di trasporto specifici assicurano che il cervello riceva tutti i nutrienti ed i substrati di cui necessita (Fig.9) (Abbott J.N. e Romero I.A., 1996).

Il D-glucosio attraversa la BEE facilmente ed in maniera stereospecifica, grazie alla elevata densità del Glut1. Uno studio recente ha descritto per questo zucchero anche un tipo di trasporto attivo, sodio-dipendente (Sglut1), che sembra funzionare nella BEE parallelamente al Glut1 (Nishizaki T. et al., 1995).

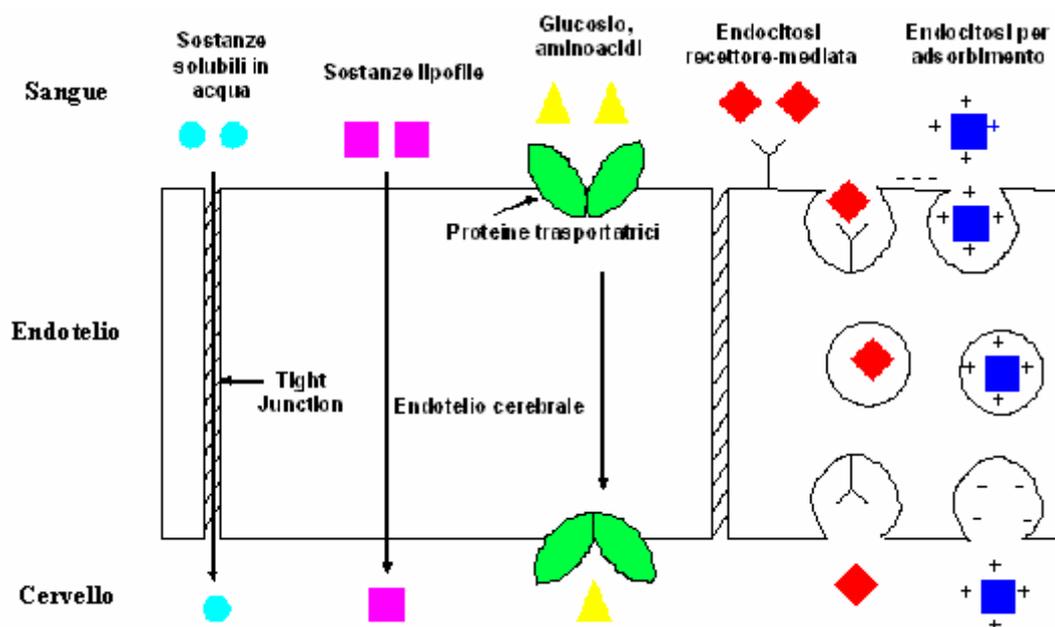


Fig.9 *Meccanismi di attraversamento della BEE*

Il trasportatore Glut1 è fortemente inibito dalla citocalasina B e l'espressione del suo gene può essere controllata dalla cerebrolisina. Avendo una elevata capacità di trasporto può essere utilizzato per veicolare un farmaco all'interno del SNC, in seguito ad esterificazione con un esoso.

Sono stati descritti carriers, saturabili e bidirezionali, per acidi monocarbossilici, in grado di trasportare attraverso la BEE L-lattato, L-acetato, L-piruvato, acido valproico, acido salicilico e acidi grassi saturi. Si tratta per lo più di un trasporto di tipo attivo.

I carriers per gli aminoacidi neutri sono in grado di trasportare leucina, cisteina, serina, alanina, fenilalanina, L-dopa, L-triptofano, ma anche farmaci di struttura simile come il Melfalan (agente alchilante), la Gabapentina (antiepilettico), il Baclofen (rilassante muscolare) e la neurotossina beta-N-metilamino-L-alanina (Begley J.D., 1996). Sono state descritte diverse forme di carriers per aminoacidi neutri, ad esempio il trasportatore per gli aminoacidi neutri ad alto peso molecolare (LNNA) è in grado di trasportare la fenilalanina e la L-dopa con una elevata affinità. Esso sembra essere soggetto a regolazione da parte di composti endogeni quali l'ossiprolina e la vasopressina. Altri trasportatori per

aminoacidi neutri (A, ASC e N) mostrano sodio dipendenza ed una selettività maggiore per aminoacidi neutri a basso peso molecolare (alanina, serina, cisteina, glicina e prolina).

Trasportatori per aminoacidi basici e per aminoacidi acidi hanno mostrato di trasportare asparagina, lisina, aspartato e glutammato attraverso la BEE.

Esistono anche trasportatori per le ammine, in grado di far passare la colina, per la tiamina e per gli ormoni tiroidei, in grado di far passare, rispettivamente, vitamine, come i folati e l'acido ascorbico, e l'ormone T3. E' stata dimostrata, inoltre, l'esistenza di trasportatori per i nucleosidi (adenosina, guanosina, inosina ed uridina).

Molti farmaci hanno mostrato di attraversare l'endotelio cerebrale con difficoltà, nonostante abbiano un coefficiente di ripartizione favorevole per diffondere attraverso il doppio strato fosfolipidico. Capita, infatti, che molti farmaci e peptidi vengano pompati all'esterno della cellula da un trasportatore attivo, che è presente in molti tipi di cellule. Queste pompe transmembrinarie nascono come importante meccanismo di protezione contro agenti xenobiotici potenzialmente tossici, ma contribuiscono alla resistenza ad agenti antitumorali e a farmaci psicotropi sia in tessuti tumorali che normali. Esse appartengono alla famiglia dei trasportatori "ATP-binding cassette" (ABC), proteine integrali di membrana che utilizzano l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP per espellere soluti attraverso la membrana cellulare (Löscher W. e Potschka H., 2005).

La glicoproteina-P (P-gp) è attualmente la pompa di efflusso più studiata ed è responsabile della "multidrug-resistance" di tipo 1 (MDR1). La P-gp della BEE ha mostrato di avere un ruolo dominante nell'efficacia di molti farmaci nel SNC. Substrati noti sono: la vinblastina, la reserpina, il verapamil, la trifluoperazina, l'amiodarone, la daunomicina, il progesterone, il propafenone e la chinidina. Diversi composti sono in grado di inibire, a volte anche in modo competitivo, l'attività della P-gp, tra cui la Ciclosporina A.

In tabella 2 sono elencati alcuni carriers, per piccoli peptidi, presenti nella BEE. Si tratta di sistemi di trasporto attivi o facilitati, unidirezionali o bidirezionali (Kluwer Academic, 1999).

PEPTIDI	TIPO DI TRASPORTO	DIREZIONE
CRH	Attivo	Cervello-Sangue
Deltorfina	Facilitato	Sangue-Cervello
Glutazione	Attivo	Bidirezionale
Citochine	-	Bidirezionale
LHRH	Facilitato	Bidirezionale
Neurotensina	Facilitato	-
Somatostatina	-	Cervello-Sangue
Peptidi Tirosinati	Attivo	Cervello-Sangue
Vasopressina	Facilitato	Cervello-Sangue

Tab.2 *Trasportatori per peptidi a basso peso molecolare*

Sembra però che non esistano carriers per peptidi più grandi di 10 aminoacidi nella BEE e che questi debbano, quindi, subire un processo di transcitosi per poter raggiungere il SNC. Tale fenomeno si distingue in (Abbott J.N. e Romero I.A., 1996):

- transcitosi per adsorbimento
- transcitosi mediata da recettori.

Nel primo caso si tratta di un processo lento e non selettivo in cui le cellule endoteliali inglobano per endocitosi quelle macromolecole legate in modo aspecifico alla superficie della membrana; un esempio è rappresentato da quelle proteine cariche positivamente che si accumulano sulla superficie tramite interazioni elettrostatiche con le cariche negative presenti sulla membrana dell'endotelio.

La transitosi mediata da recettori, invece, è un processo lento ma selettivo in cui le cellule endoteliali inglobano per endocitosi quelle macromolecole che interagiscono in modo specifico con un recettore presente sulla superficie della membrana; in seguito tale sostanza diffonde attraverso l'endotelio e fuoriesce per esocitosi dalla parte opposta.

In tabella 3 sono elencati una serie di esempi di peptidi che sfruttano questo tipo di trasporto (Kluwer Academic, 1999).

PEPTIDI	TIPO DI TRANSCITOSI
Proteina β -amiloide	Recettore
Peptidi basici	Adsorbimento
Istone	Adsorbimento
Insulina	Recettore
Lipoproteina a bassa densità	Recettore
Lectine	Adsorbimento
Leptina	Recettore
Albumina modificata	Adsorbimento
Transferrina	Recettore

Tab.3 *Peptidi che sfruttano i meccanismi di transitosi*

1.7 Ruolo della Barriera Emato-Encefalica nello sviluppo di farmaci capaci di raggiungere il Sistema Nervoso Centrale

Se da un lato la BEE costituisce una forma di protezione per il SNC, dal punto di vista farmacologico essa diventa un ostacolo da sormontare, infatti non permette alla maggior parte dei farmaci di penetrare nel SNC, in quanto spesso essi sono idrofili a causa di determinati gruppi funzionali, che non possono essere eliminati,

poiché rappresentano la parte farmacoforica della molecola che, interagendo con uno specifico bersaglio biologico, causa una risposta farmacologica.

Per ovviare a questo problema, la prima strategia attuabile è la sintesi di profarmaci con lo scopo di aumentare la lipofilia del farmaco, in modo che riesca ad attraversare la BEE per diffusione passiva. In questo caso si deve progettare un profarmaco che comunque presenti una buona biodisponibilità, in particolare deve essere solubile in soluzione acquosa, per essere distribuito attraverso il circolo ematico. Inoltre un aumento di lipofilia spesso comporta un maggiore legame alle proteine plasmatiche e una ricaptazione a livello del circolo entero-epatico che vanno anch'essi a ridurre la biodisponibilità del farmaco attraverso una riduzione della concentrazione di farmaco libero nel sangue capace di essere assorbito e quindi di attraversare la BEE. Quindi c'è bisogno di arrivare ad un compromesso tra la capacità del profarmaco di essere distribuito e la sua lipofilia che gli permette di aumentare l'attraversamento della BEE.

Un altro tipo di modifica del farmaco per veicolarlo nel SNC è la sintesi di profarmaci in cui il vettore è costituito da un gruppo in grado di essere riconosciuto da uno specifico trasportatore e che permette l'internalizzazione del profarmaco.

Tra tutti i carriers presenti nell'endotelio cerebrale, quelli per gli esosi (Glut1) e per gli aminoacidi neutri ad alto peso molecolare (LNNA) hanno sufficiente capacità di trasporto da permettere il passaggio di un profarmaco attraverso la BEE.

Sono stati sintetizzati diversi derivati glicosilati e/o galattosilati di farmaci che normalmente non sono in grado di attraversare la BEE: la dopamina (Fernandez C. et al., 2000; Bonina F.P. et al., 2003), l'acido 7-clorokinurenico (Battaglia G. et al., 2000; Bonina F.P. et al., 2000), l'acido nipecotico (Bonina F.P. et al., 1999) e diversi antinfiammatori e agenti antiossidanti (Uhrig R.K. et al., 2000). L'obiettivo è quello di poter aumentare la concentrazione del profarmaco a livello del SNC sfruttando il Glut1 presente sulla BEE. Spesso i risultati migliori vengono ottenuti in seguito alla somministrazione del profarmaco galattosilato (Bonina F.P. et al., 2003).

Un recente studio ha dimostrato che il meccanismo molecolare con cui un profarmaco glicosilato della dopamina attraversa la BEE può prevedere lo sfruttamento del Glut1. Infatti, utilizzando un derivato marcato del glucosio si è studiato l'uptake del profarmaco e della dopamina in cellule HRPE (Human Retinal Pigment Epithelium), che hanno caratteristiche simili alle cellule endoteliali costituenti la BEE, in quanto fungono da barriera tra il sangue e la retina. La dopamina è risultata essere incapace di interagire con il Glut1, mentre il suo derivato glicosilato penetra nella cellula tramite questo trasportatore. La presenza di glucosio, che va a saturare il carrier, inibisce l'uptake del profarmaco ma non quello della dopamina, confermando che l'ingresso nella cellula è mediato dal Glut1 (Dalpiaz A. et al., 2007).

Lo sfruttamento del trasportatore LNNA, invece, può avvenire utilizzando come vettore la L-tirosina. Fra tutti gli aminoacidi in grado di sfruttare questo carrier, la tirosina ha il vantaggio di possedere, nella sua struttura, un gruppo fenolico, facilmente derivatizzabile, che rende, quindi, possibile la sintesi di profarmaci. In particolare, nel caso dei profarmaci dell'Acido nipecotico, il derivato con la tirosina è quello che ha dato maggiori risultati (Bonina et al., 1999). L'unico svantaggio dei profarmaci tirosinati è rappresentato dalla loro scarsa solubilità, per cui è in genere necessaria la loro trasformazione in derivati salini, generalmente cloridrati.

Recentemente è stata individuata una famiglia di trasportatori, Na^+ -dipendente, per l'acido ascorbico (SVCT1 e SVCT2) (Tsukaguchi H. et al., 1999). In particolare l'SVCT2 è presente nel plesso coroideo e può essere utilizzato come carrier per diversi profarmaci. Sono stati così coniugati all'acido ascorbico i seguenti farmaci: l'Acido nipecotico, l'Acido kinurenico e il Diclofenac (Manfredini S. et al., 2002). Anche in questo caso l'utilizzo dei profarmaci ha dato risultati positivi.

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del mio lavoro consiste nel dimostrare che la strategia del profarmaco può incrementare l'ingresso di farmaci nelle cellule e l'attraversamento di membrane biologiche, come la BEE, sia attraverso lo sfruttamento del trasportatore Glut1, sia aumentando la lipofilia della molecola. A tale scopo mi sono occupata della progettazione e della sintesi di nuovi profarmaci.

Grazie all'alta affinità del galattosio per il Glut1 è stato scelto questo zucchero come vettore per la coniugazione con diversi farmaci, in modo da evitare complicazioni derivanti da un'eccessiva somministrazione di glucosio.

Di ogni profarmaco è stata calcolata la stabilità chimica in tampone fosfato a pH 7.4, e quella enzimatica, in plasma di ratto, per stabilire se il derivato fosse abbastanza stabile da arrivare al sito d'azione, ma anche non eccessivamente stabile affinché una volta giunto in questo sito potesse essere rilasciato il farmaco attivo. Tali esperimenti sono stati effettuati in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Gianpiero Boatto, presso il Dipartimento Farmaco Chimico Tossicologico dell'Università di Sassari.

Il primo obiettivo è stato la sintesi di un derivato galattosilato della dopamina, chiamato GALDA, in cui il neurotrasmettitore è legato al galattosio tramite uno spacer succinico, per aumentarne la concentrazione nel SNC ed intervenire terapeuticamente su malattie come morbo di Parkinson e Disturbo da Deficit dell'Attenzione ed Iperattività (ADHD).

Con lo scopo di confermare l'attraversamento della BEE da parte del GALDA sono stati effettuati dosaggi istochimici del galattosio nel cervello e dosaggi in diverse zone cerebrali del GALDA e del suo derivato dopamina-succinato e della dopamina, in seguito ad iniezione intraperitoneale del profarmaco su modelli di iperattività, costituiti da ratti Naples High Excitability (NHE), e ratti di controllo Naples Random-Bred (NRB). Tali esperimenti hanno mostrato l'effettivo attraversamento della BEE da parte del profarmaco ed il rilascio di dopamina nel cervello.

Il successivo obiettivo riguardante il GALDA è stato la valutazione dell'attività in vivo, studiando gli effetti comportamentali sui ratti NHE e su un altro modello di iperattività, i topi C57BL/6. I risultati hanno portato alla conclusione che il GALDA rappresenta un buon candidato per normalizzare il tono dopaminergico, che risulta alterato in malattie come l'ADHD e il morbo di Parkinson.

Successivamente mi sono occupata della sintesi di profarmaci dell'acido D-Aspartico per aumentare i livelli di questo amminoacido nel SNC. Studi recenti hanno dimostrato un coinvolgimento del D-aspartato nell'ADHD, in quanto nello striato dei ratti NHE vi è una maggiore espressione dei recettori NMDA, probabilmente per un ridotto rilascio del trasmettitore endogeno, sia esso L-glutammato, N-metil-D-aspartato o D-aspartato. A causa della scarsa permeabilità del D-Aspartato nella BEE sono stati sintetizzati suoi profarmaci.

Con lo scopo di aumentare la lipofilia della molecola di partenza sono state esterificate le sue due funzioni acide, ottenendo l'estere dietilico del D-aspartato, chiamato DEE. Esso è stato testato sui ratti NHE ed ha manifestato una riduzione dell'attività locomotoria verticale e un aumento dell'attenzione, derivante probabilmente da una stabilizzazione dei recettori NMDA, confermando l'attraversamento della BEE da parte del profarmaco ed il lento rilascio del farmaco attivo.

Inoltre è stato sintetizzato il derivato galattosilato del D-aspartato, chiamato GALASPA, con lo scopo di sfruttare il Glut1 per aumentare l'attraversamento della BEE. Per tale composto sono in corso gli stessi test comportamentali effettuati per il DEE.

Gli esperimenti farmacologici effettuati sia sul GALDA sia sui profarmaci del D-aspartato sono stati svolti in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Adolfo Sadile, presso il Dipartimento di Medicina Sperimentale della Seconda Università degli Studi di Napoli.

Il mio ultimo obiettivo è stato la sintesi del profarmaco galattosilato della N-nitro-L-Arginina, un inibitore dell'enzima NO sintasi (NOS), chiamato NAGAL.

Nelle cellule tumorali si verifica un aumento sia dell'espressione delle NOS per favorire l'angiogenesi, la vascolarizzazione e la metastasi del tumore, sia della quantità di Glut1, per soddisfare la maggiore richiesta energetica delle cellule tumorali in continua replicazione.

Il profarmaco inibitore delle NOS N-nitro-L-Arginina metil estere (L-NAME) esercita effetti antitumorali, ma la sua somministrazione periferica causa elevati effetti collaterali cardiovascolari, dovuti alla mancanza di selettività di inibizione delle isoforme delle NOS. Il NAGAL può evitare questi problemi, direzionando maggiormente l'inibitore all'interno cellule tumorali, tramite lo sfruttamento del Glut1.

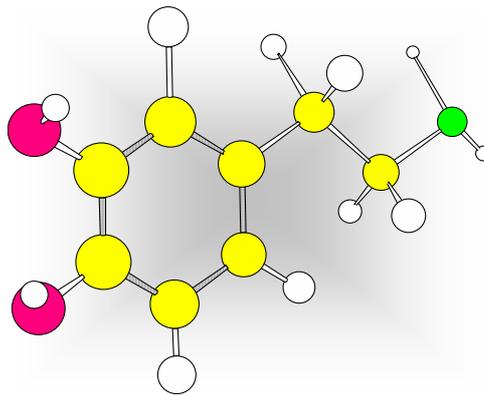
Il test di vitalità su cellule tumorali tiroidee RO82 ha mostrato una maggiore attività antiproliferativa del NAGAL, rispetto all'L-NAME usato come riferimento, inoltre il dosaggio del profarmaco come tale e della nitroarginina liberata nei lisati di tali cellule ha confermato l'ipotesi che il NAGAL è capace di entrare nelle cellule e rilasciare il farmaco attivo.

Gli esperimenti sulle cellule sono stati effettuati in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Alfonso Barbarisi, presso il Dipartimento di Scienze Anestesiologiche Chirurgiche e dell'Emergenza della Seconda Università degli Studi di Napoli.

3. GALDA

3.1 Introduzione: la dopamina

La dopamina (3,4-diidrossifenilettilammina) è uno dei maggiori neurotrasmettitori nel SNC, particolarmente importante nella regolazione dei movimenti.



Viene sintetizzata nelle terminazioni dei neuroni dopaminergici a partire dalla tirosina, la quale viene trasportata attraverso la BEE mediante un sistema di trasporto attivo (Fig.10). Il passaggio limitante della sintesi della dopamina è la conversione di L-tirosina a L-diidrossifenilalanina (L-DOPA), catalizzata dall'enzima tirosina idrossilasi, presente nei neuroni catecolaminergici. La L-DOPA viene convertita rapidamente a dopamina dalla decarbossilasi degli aminoacidi L-aromatici. A livello della terminazione, la dopamina viene trasportata in vescicole di deposito a opera di una proteina trasporto (T) associata alla membrana vescicolare. Il rilascio, indotto dalla depolarizzazione e dall'ingresso di Ca^{++} , consente alla dopamina di agire a livello dei recettori dopaminergici postsinaptici (DAR). La sua azione viene conclusa dalla ricaptazione attraverso un trasportatore specifico di membrana; in alternativa, la dopamina può essere degradata dall'azione sequenziale delle monoammino-ossidasi (MAO) e delle catecol-O-metil transferasi (COMT). Le MAO catalizzano l'ossidazione della dopamina ad acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC), a sua volta substrato delle

COMT, che lo trasformano in acido 3-metossi-4-idrossifenilacetico, ovvero acido omovanillico (HVA). Alternativamente la dopamina può essere metabolizzata prima dalle COMT, con produzione di 3-metossitiramina (3MT), che per ossidazione da parte delle MAO viene trasformata anch'essa in HVA (Katzung B.G., 2000).

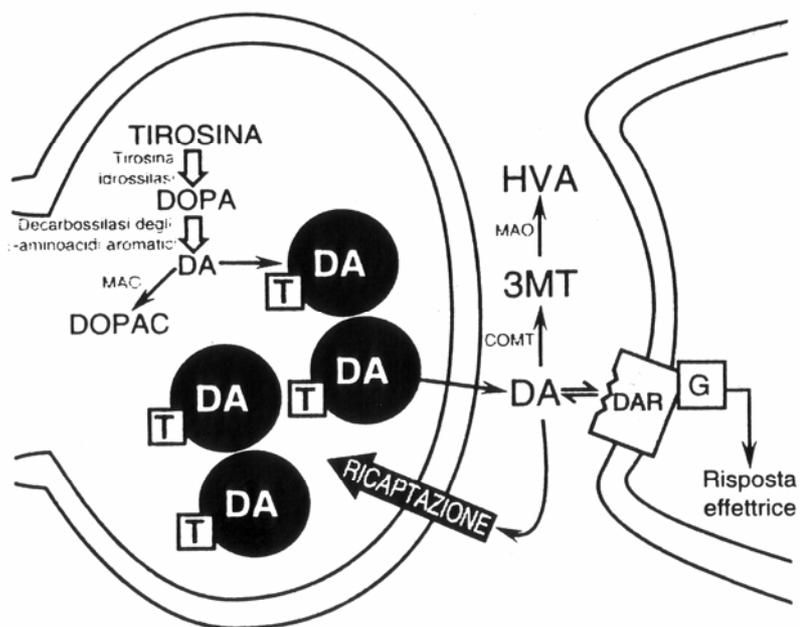


Fig.10 Sintesi, immagazzinamento e ricaptazione della dopamina.

Le attività della dopamina nel cervello sono mediate da cinque distinti recettori classificati in due grandi classi: la famiglia recettoriale D1, che stimola la sintesi di AMP ciclico, e la famiglia recettoriale D2, che invece inibisce la sintesi di AMP ciclico. I recettori di entrambe sono caratterizzati da sette domini transmembranari a struttura ad α elica ed agiscono attraverso il legame con una proteina G. I recettori D1 e D5 hanno una lunga coda C-terminale intracellulare e sono membri della classe definita farmacologicamente come D1; i recettori D2, D3 e D4 hanno in comune la terza ansa intracellulare molto ampia e appartengono alla classe farmacologica D2 (Fig.11).

I recettori D1 e D2 sono abbondantemente espressi nello striato e sono i recettori più importanti per quanto riguarda le cause e il trattamento del morbo di Parkinson. Le proteine D4 e D5 sono in gran parte al di fuori dello striato, mentre

l'espressione del recettore D3 è bassa nel caudato e nel putamen ed è più abbondante nel nucleo accumbens e nel tubercolo olfattorio (Goodman & Gilman, 1997).

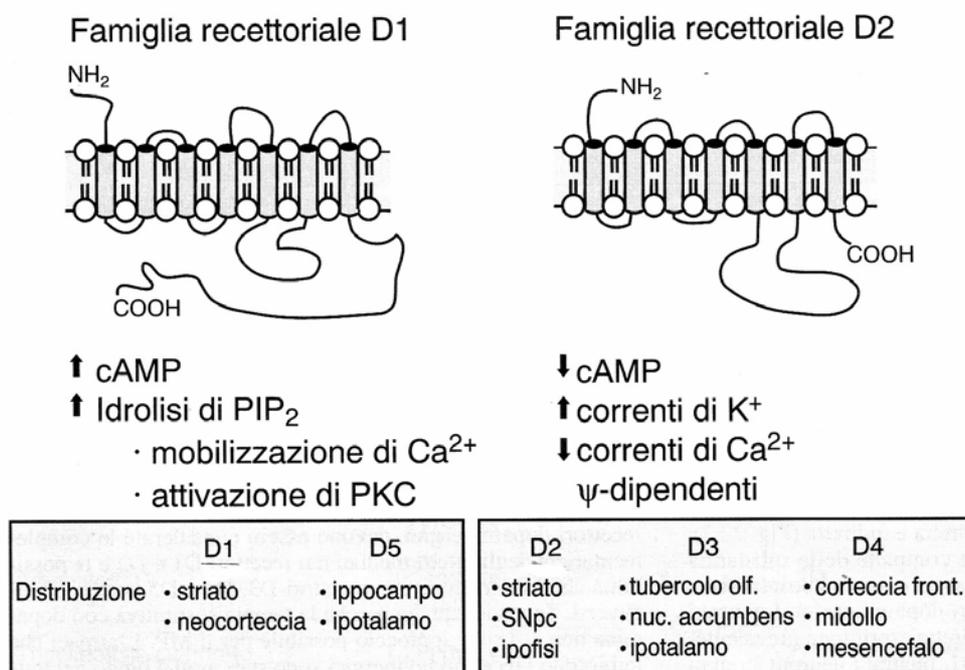


Fig.11 Recettori dopaminergici, meccanismo d'azione e distribuzione

Una disfunzione del sistema dopaminergico può causare diverse patologie a seconda della zona cerebrale compromessa.

Diverse malattie sono state correlate con l'alterazione di specifiche vie dopaminergiche. Per esempio il morbo di Parkinson è caratterizzato da una ridotta concentrazione di dopamina nei gangli della base, causata da una degenerazione dei neuroni dopaminergici della "substantia nigra" (Katzung B.G. 2000).

Similmente alterazioni nel sistema dopaminergico sono state suggerite nel Disturbo da Deficit dell'Attenzione ed Iperattività (ADHD), caratterizzato da inattenzione, iperattività e impulsività nei bambini.

L'approccio terapeutico consiste nell'aumento del livello di DA, come nel morbo di Parkinson, o nella sua modulazione, come nell'ADHD. Tuttavia, poiché la dopamina esogena non attraversa la BEE, le attuali strategie terapeutiche implicano un aumento indiretto del neurotrasmettitore. Per esempio nel morbo di Parkinson il principale trattamento è basato sulla L-DOPA, un precursore della

dopamina, che entra nel SNC attraverso il trasportatore per gli amminoacidi ed è enzimaticamente trasformato in dopamina. Al contrario l'ADHD è trattata con D-amfetamina, che aumenta il rilascio di neurotrasmettitori catecolaminergici, o con metilfenidato, che blocca la ricaptazione delle ammine biogene, così temporaneamente aumenta il livello di dopamina nel sito bersaglio (Solanto M.V. 1998).

In entrambi i casi il trattamento è associato ad effetti collaterali, dovuti sia agli effetti periferici della dopamina, sia all'alterazione di complessi equilibri tra neurotrasmettitori. Infatti il trattamento cronico con L-DOPA causa fluttuazioni del livello plasmatico di dopamina, inoltre molti pazienti con ADHD non rispondono al trattamento con metilfenidato. Quindi, sono necessarie nuove strategie terapeutiche che aumentino o modulino il livello di dopamina nel SNC.

Una di queste è rappresentata dalla sintesi del profarmaco galattosilato della DA, chiamato GALDA.

3.2 Disturbo da Deficit dell'Attenzione ed Iperattività

Il Disturbo da Deficit dell'Attenzione ed Iperattività (ADHD: "Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder") è una delle patologie psichiatriche ad esordio in età evolutiva più importanti e frequenti. Riconosciuta fin dall'inizio del '900 come "Sindrome Ipercinetica", veniva attribuita ai bambini impulsivi, disinibiti e iperattivi.

Si manifesta in età prescolare e condiziona il comportamento dei bambini nel contesto sociale e nell'elaborazione degli stimoli ambientali.

Si tratta di un disturbo neurobiologico della corteccia frontale e dei nuclei della base che si manifesta come alterazione nell'elaborazione delle risposte agli stimoli ambientali (Swanson J.M. et al., 1998).

La **corteccia frontale** svolge un ruolo importante in molteplici funzioni:

- Controlla l'organizzazione e la pianificazione del lavoro

- Permette la focalizzazione sull'obiettivo da raggiungere, la concentrazione, il cambio dell'obiettivo e il mantenimento dell'attenzione
- Sostiene lo sforzo durante un'attività mentale
- Controlla le emozioni attraverso una loro modulazione e la gestione delle frustrazioni
- È implicata nella memoria con il controllo degli impulsi e dei ricordi
- Ha effetto sulle azioni in quanto permette l'autocontrollo, la verifica dei risultati e l'eventuale riformulazione dell'azione.

Il **controllo dell'attenzione** è una funzione complessa che deriva dalla risultante dell'azione coordinata del talamo, del sistema pallido-striatale, della corteccia frontale e di quella parieto-occipitale, coinvolti in un meccanismo di attivazione e inibizione reciproche che permette al SNC di ricevere gli impulsi sensoriali con un adeguato livello di attenzione e di elaborare appropriate reazioni. Questo sistema è strutturato in modo da effettuare una selezione dei segnali in arrivo per sopprimere stimoli irrilevanti e favorire l'elaborazione degli stimoli rilevanti e un'adeguata risposta ad essi. Esso ha una capacità limitata (*Limited Capacity Control System, LCCS*) in modo tale che fisiologicamente non possa essere occupato da tanti segnali contemporaneamente, rendendo obbligatoria una selezione di essi ai fini dell'azione.

Quando si manifesta l'ADHD viene a mancare questo complesso equilibrio nel controllo di segnali rilevanti e non, e per questo si possono manifestare due tipi di sintomi:

- **Inattenzione**, quando il bambino si distrae facilmente e non ha cura per i dettagli, non porta a termine le azioni intraprese, evita le attività che richiedono attenzione e capacità organizzative e dimentica attività importanti.
- **Impulsività**, in questo caso il bambino tende a cambiare attività rapidamente e a non rispettare il proprio turno durante un gioco in gruppo. È associata all'**iperattività**, in cui il bambino non rispetta le regole e gli spazi e i tempi dei coetanei, trova difficoltà anche a rimanere seduto in classe.

Questi sintomi non sono causati da deficit cognitivo o ritardo mentale, ma da difficoltà oggettive nell'autocontrollo e nella capacità di pianificazione. Questi bambini mostrano soprattutto un rapido raggiungimento del livello di stanchezza e di noia che si manifesta con frequenti spostamenti da un'attività non completata ad un'altra, con perdita di concentrazione ed incapacità di portare a termine qualsiasi attività protratta nel tempo. Anche se questi comportamenti sono presenti talvolta anche nei bambini sani, nel caso dei bambini malati di ADHD diventano persistenti nei vari contesti, come casa, scuola, ambiente di gioco, e nelle diverse situazioni, come lezioni, gioco, a tavola, davanti al televisore, ecc.

Ancora oggi non sono state determinate le cause precise dell'ADHD, anche se una vasta serie di ricerche mediche ritiene che sia determinata da un insieme di fattori biologici ed influenze genetiche. Si verifica un insufficiente rilascio e un alto reuptake di dopamina a livello sinaptico, causati probabilmente da un'alterazione nell'espressione dei geni codificanti per il recettore D4 e per i carriers responsabili del reuptake della dopamina, nella zona della corteccia frontale (Fig.12).

Ciò provoca nel bambino malato di ADHD una riduzione della concentrazione di dopamina, che non permette l'adeguato funzionamento del sistema di controllo dell'attenzione.

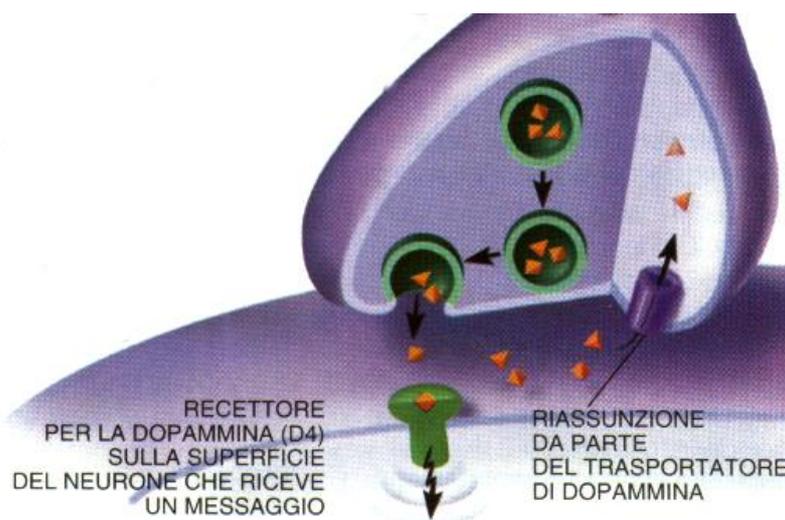


Fig.12 *Reuptake della dopamina*

Con lo scopo di scoprire i substrati neuronali responsabili dei principali coinvolti nell'ADHD, sono stati usati diversi modelli di ratto: SHR ("Spontaneously Hypertensive"), WKHA ("Wistar-Kyoto Hyperactive rat"), NHE ("Naples High-Excitability"), e di topo: C57BL/6. Sono tutti modelli iperattivi, benché a diversi gradi e in contesti differenti. A causa della varietà sintomatologica dell'ADHD, diversi modelli animali sono utili sia per caratterizzare i differenti aspetti di questa patologia, sia per comprovare la pertinenza dei possibili substrati neuronali all'interno di backgrounds genetici diversi.

Mentre l'attenzione selettiva verso un determinato stimolo è stata ampiamente studiata e misurata in laboratorio, l'attenzione non-selettiva (NSA) e la sua importanza nei confronti della precedente non è stata ancora accertata.

Il modello NHE, costituito da ratti selezionati geneticamente, è caratterizzato da un'attività normale, all'interno della sua gabbia, ma ha un comportamento iperattivo in una situazione nuova e complessa, con un profilo disattento. All'interno di un labirinto (Låt-maze) i ratti NHE manifestano un'attività locomotoria anomala, sia orizzontale che verticale. La prima è rappresentata dalla distanza percorsa dal ratto, quantizzata come numero di "corner crossing", ovvero di attraversamenti degli angoli, mentre la seconda è misurata tramite il numero e la durata dei "rearings": gli innalzamenti del ratto sulle zampe posteriori. Il ratto iperattivo è caratterizzato da un elevato numero di rearings, che manifestano la scarsa attenzione dell'animale. La misura di questi valori è di estremo interesse per il monitoraggio di farmaci che agiscono sui processi dell'attenzione.

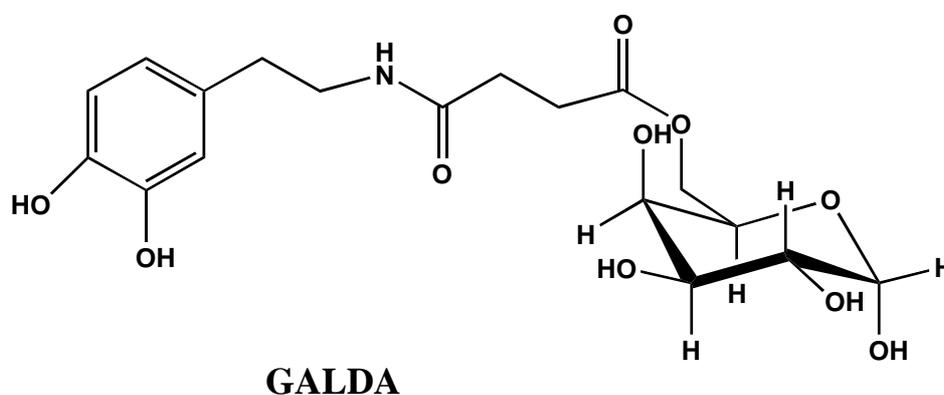
Il farmaco maggiormente utilizzato per questi studi è il *metilfenidato*, che interferisce con la trasmissione sinaptica, bloccando il reuptake delle ammine biogene, permettendo alla dopamina di rimanere per un tempo maggiore a livello sinaptico e, quindi, aumentando la sua concentrazione post-sinaptica., ed è oggi il farmaco di prima scelta per la cura dell'ADHD nei bambini. Di recente impiego terapeutico è la *atomoxetina*, anch'essa inibitore del reuptake delle ammine biogene, con maggiore selettività nei confronti della noradrenalina.

L'alternativa terapeutica sarebbe quella di fare arrivare *dopamina* direttamente nello spazio sinaptico; dato che essa non è in grado di attraversare la BEE, in seguito a somministrazione periferica, la sintesi di suoi profarmaci ha lo scopo di permettere al neurotrasmettitore di raggiungere il SNC, dove può espletare le sue funzioni ripristinando i processi dell'attenzione.

Un esempio di profarmaco sintetizzato per aumentare la concentrazione della dopamina nel SNC è costituito dal **GALDA**, un derivato galattosilato della dopamina.

3.3 Metodo generale di sintesi del profarmaco galattosilato della dopamina

Il derivato galattosilato della dopamina (**GALDA**) è stato ottenuto coniugando la dopamina al D-galattosio mediante uno spacer succinico.

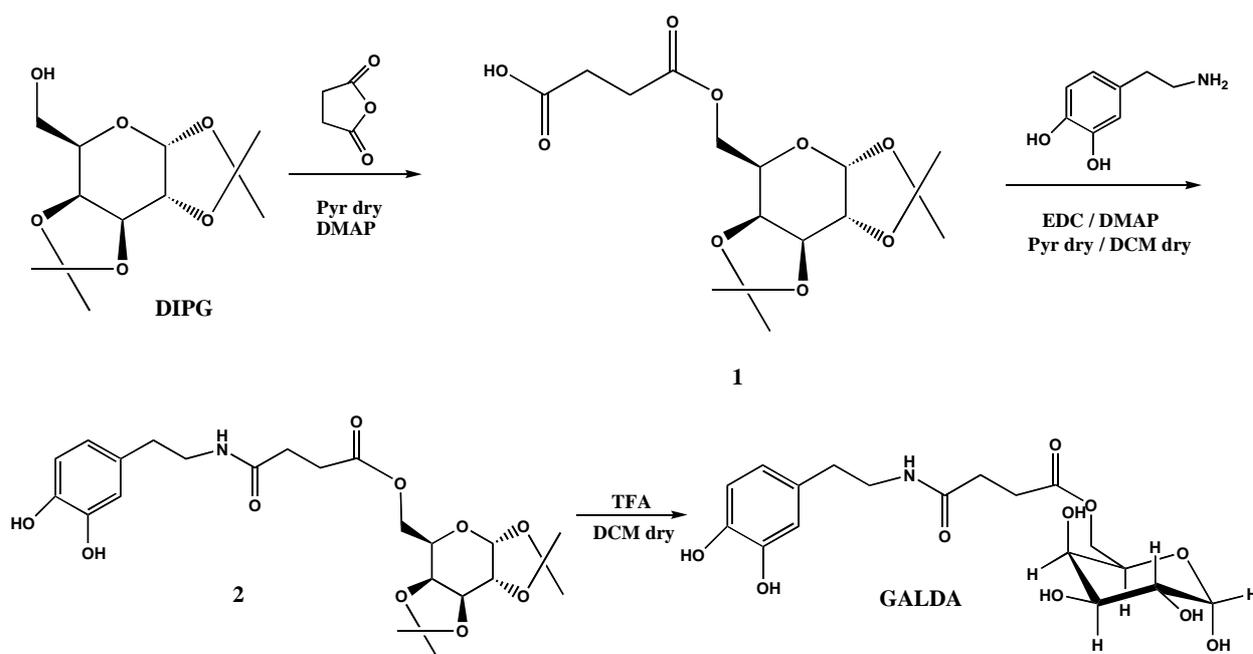


Il primo step consiste nella succinazione dello zucchero. Per poter derivatizzare in modo specifico l'ossidrile in posizione 6', abbiamo utilizzato come prodotto di partenza l'1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D-galattosio (DIPG). Esso viene trattato con anidride succinica, in piridina anidra (Pyr), in presenza di 4-dimetilaminopiridina (DMAP) come catalizzatore. L'1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D-galattopiranosio-6-succinil estere ottenuto (**1**) viene coniugato con la dopamina,

in presenza di N-(3-(dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimide cloridrato (EDC), quale agente condensante, e DMAP, ottenendo la corrispondente amide (**2**). Quest'ultima viene poi soggetta a deprotezione con acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro per ottenere il prodotto finale **GALDA** (Schema 1).

Rispetto al precedente studio (Bonina F.P., 2003), in cui si utilizzava la dicicloesilcarbodiimide (DCC) come agente condensante, è stato introdotto l'uso della EDC solubile in acqua, per aumentare la resa di reazione. Infatti dovendo sintetizzare quantità elevate di prodotto per effettuare i test farmacologici in vivo, la EDC ha migliorato lo step di lavorazione delle miscela di reazione del prodotto **2**.

La struttura del prodotto finale e di tutti gli intermedi di reazione è stata confermata da spettri NMR ^1H , ^{13}C e di massa.



Schema 1 Sintesi del *GALDA*.

3.3 Stabilità chimica ed enzimatica

Quando si utilizza la strategia del profarmaco è di fondamentale importanza effettuare una preliminare indagine riguardante la stabilità del derivato neosintetizzato, sia per verificare che il profarmaco non si degradi prima di arrivare al sito di azione semplicemente a causa delle condizioni di pH e temperatura dell'organismo, sia per assicurarsi che esso sia sottoposto all'azione di enzimi che in vivo possano ripristinare il farmaco attivo. A questo scopo si utilizzano due parametri: la stabilità chimica e quella enzimatica, rispettivamente. Dalla misurazione di questi parametri si ricavano le emivite dei profarmaci, ovvero il tempo necessario affinché la concentrazione iniziale di profarmaco venga dimezzata con corrispondente rilascio di farmaco attivo.

La stabilità chimica può avere un valore medio-lungo, è importante che non sia troppo bassa perché in quel caso il profarmaco sarebbe troppo instabile ed incapace di arrivare al sito d'azione intatto, inoltre potrebbe cominciare a manifestare attività in siti diversi da quello scelto come bersaglio. Questo parametro serve anche per ricavare le procedure da utilizzare durante i saggi farmacologici, in quanto permette di stabilire la via di somministrazione e se bisogna sciogliere il composto in modo estemporaneo o se si può conservare in soluzione.

La stabilità enzimatica, invece, ha lo scopo di valutare la reattività del profarmaco in un ambiente il più vicino possibile a quello biologico. Essa non deve essere troppo alta in quanto manifesterebbe una scarsa suscettibilità del derivato all'idrolisi in vivo e, di conseguenza, uno scarso rilascio di farmaco attivo.

La presenza dello spacer succinico nella molecola del GALDA permette di avere due punti di idrolisi: il primo nei confronti dell'estere, che porta alla liberazione di galattosio e dopamina succinata, e il secondo nei confronti dell'ammide, coinvolta in un'idrolisi più lenta, che permette la liberazione finale della dopamina. Le esterasi ubiquitarie nell'organismo si occupano della prima idrolisi e la presenza delle ammidasi a livello cerebrale assicura la liberazione del farmaco attivo all'interno del cervello.

La stabilità chimica è stata misurata sciogliendo il profarmaco in un tampone fosfato a pH 7.4. La soluzione è stata mantenuta al buio, alla temperatura di 37°C, per 24 ore. Ogni ora è stata prelevata un'aliquota ed analizzata mediante elettroforesi capillare. L'emivita chimica del profarmaco è stata calcolata misurando la sua scomparsa dalla soluzione in esame ed è di circa 20 ore. La stabilità enzimatica è stata misurata incubando il GALDA in plasma di ratto. Come per la stabilità chimica, ogni ora è stata prelevata un'aliquota ed analizzata mediante elettroforesi capillare. L'emivita enzimatica del profarmaco è di circa 4 ore (Bonina F.P. et al., 2003).

Dai risultati ottenuti si può prevedere per il GALDA una buona stabilità, in quanto non sarà liberato velocemente a livello periferico causando effetti collaterali e sarà suscettibile all'idrolisi enzimatica, assicurando un'azione farmacologica. Questi dati vengono confermati dai successivi dosaggi nel cervello del profarmaco come tale e dei suoi derivati: dopamina-succinato, galattosio e dopamina.

3.4 Dosaggio istochimico del galattosio nel cervello

I residui di galattosio sono stati dosati nei ratti Naples High-Excitability (NHE) e nei Naples Random-Bred (NRB) come controllo, in seguito a somministrazione del GALDA o solo del veicolo, usato come controllo.

Sono state utilizzate delle lectine biotinilate, specifiche per il galattosio, in cui la lectina che ha elevata affinità per il galattosio è legata ad una molecola di biotina, una vitamina a basso peso molecolare (vitamina H). La biotina è molto usata in biologia molecolare, in quanto si lega fortemente a proteine come l'avidina, presente nell'albume dell'uovo, e la streptavidina, derivante dal batterio *Streptomyces avidinii*. Queste proteine vengono a loro volta legate a gruppi cromogeni o fluorescenti e quando interagiscono con la biotina la rendono colorata

o fluorescente. Quindi si va a misurare l'aumento di densità ottica o di fluorescenza per stabilire quanto derivato biotinilato è presente.

In questi esperimenti è stata valutata la densità ottica relativa dei cervelli in seguito al trattamento con la lectina specifica, che causa un aumento di tale parametro solo nel momento in cui si è legata al galattosio. Lo zucchero è presente in quanto prodotto di idrolisi del profarmaco utilizzato, quindi il risultato positivo fornisce una prova dell'attraversamento della BEE e dell'idrolisi del profarmaco.

Visto che i ratti NHE e NRB non mostrano differenze significative nei valori di densità ottica relativa, i dati sono stati combinati. Nelle figure 13 e 14 è mostrato l'aumento dei siti di legame del galattosio con la lectina specifica nello striato, in seguito all'iniezione del profarmaco, sia tramite immagini al microscopio ottico (13) sia tramite il grafico della percentuale di densità ottica relativa (ROD) in funzione del tempo (14).

Si evince che tra 0.5 e 3 ore dall'iniezione del GALDA si ha un aumento del 10% dell'intensità del segnale relativo ai siti di legame specifici per il galattosio nello striato. Questo saggio istochimico dimostra che il numero dei residui di galattosio aumenta dopo il trattamento con il GALDA e che tale aumento avviene, inizialmente, nei vasi sanguigni e successivamente nel corpo neuronale. Si può assumere, quindi, che questo aumento sia dovuto all'entrata del profarmaco a livello neuronale (Ruocco L.A., 2007, A).

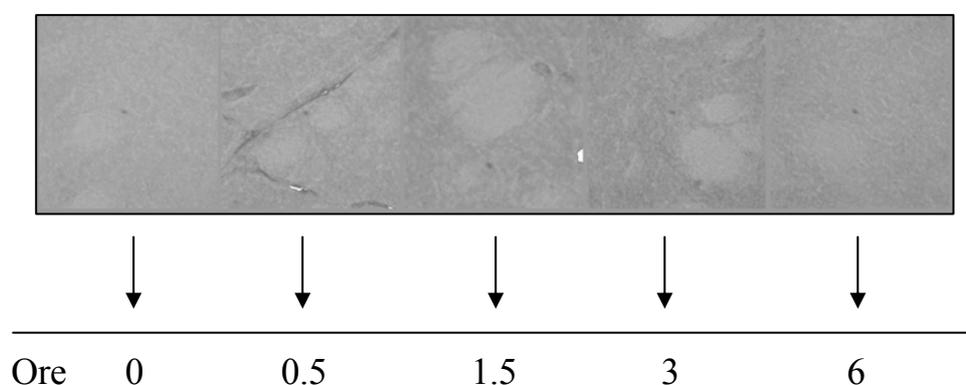


Fig 13 Immagini al microscopio ottico delle sezioni di cervello analizzate. È visibile l'aumento di densità ottica nelle sezioni a 0.5, 1.5 e 3 ore.

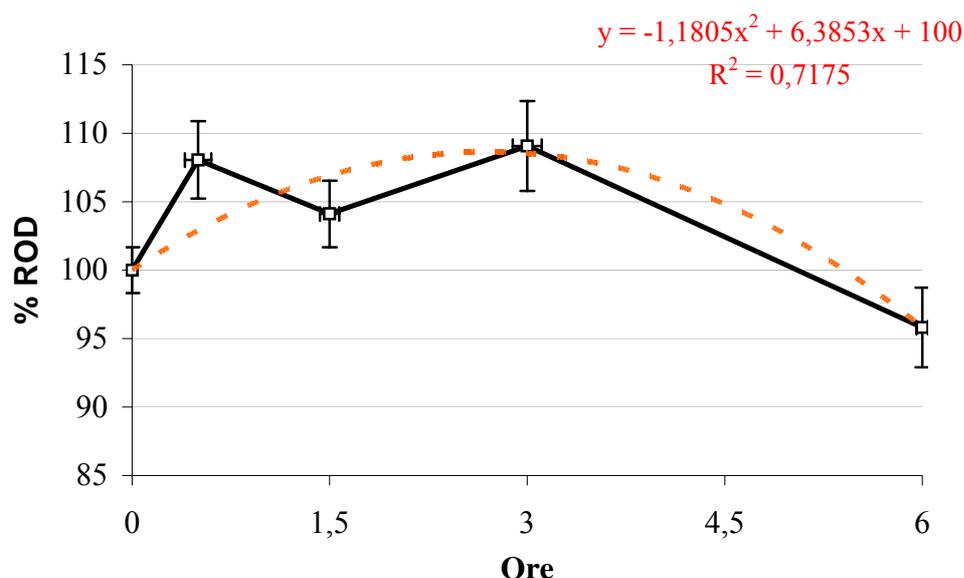


Fig. 14 Grafico dei valori di densità ottica relativa nel tempo. La linea di tendenza mostra un massimo relativo al valore ottenuto dopo 3 ore dall'iniezione del GALDA.

3.5 Dosaggio del GALDA in omogenati cerebrali

Il dosaggio del GALDA e del suo primo prodotto di idrolisi, la dopamina succinata, è stato effettuato per i ratti NHE e NRB, su sangue prelevato intracardialmente e su diverse zone cerebrali in seguito al trattamento con la tecnica “capillary depletion” (Triguero D. et al., 1990; Terasaki T. et al., 1991). Questa tecnica serve per allontanare i microvasi cerebrali per centrifugazione, in modo da ottenere un supernatante per il 95% privo di componenti vascolari.

Le zone cerebrali esaminate sono la corteccia prefrontale, lo striato ed il cervelletto. I diversi campioni sono stati analizzati usando un HPLC accoppiato ad uno spettrometro di massa (HPLC/MS). Anche in questo caso non sono presenti differenze significative tra i ratti NHE e NRB.

I risultati sono espressi come nanogrammi della molecola in esame per grammi di cervello analizzato, mentre per quanto riguarda il siero essi sono espressi in nanogrammi per mL.

Il GALDA è stato individuato in tutti gli omogenati cerebrali (Fig. 15) con un'elevata concentrazione a livello della corteccia prefrontale. Questa è un'importante dimostrazione del fatto che il profarmaco è in grado di attraversare la BEE e di arrivare a livello neuronale intatto, sfruttando il Glut1. Nessuna traccia del composto è stata invece riscontrata nel siero.

Anche la dopamina succinata è stata ritrovata in tutti gli omogenati, con prevalenza nella corteccia prefrontale e nello striato. Tracce di dopamina succinata sono state riscontrate anche nel siero, dimostrando che una parte del profarmaco viene già idrolizzata, come prevedibile, a livello periferico (Fig. 16) (Ruocco L.A., 2007, A).

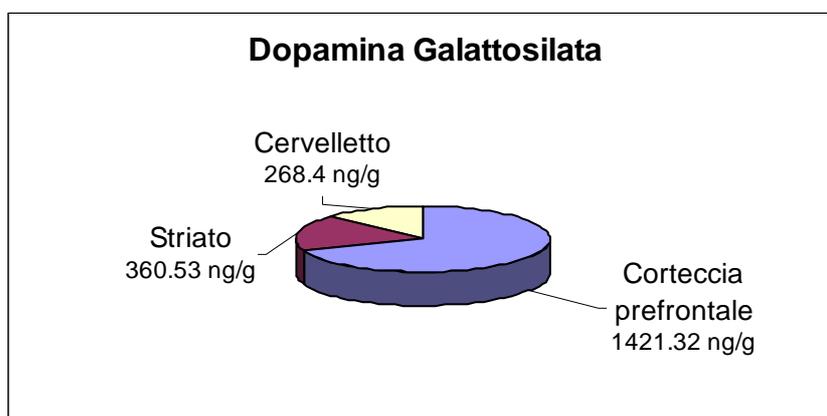


Fig. 15 *Recupero del GALDA nella corteccia prefrontale, nello striato e nel cervelletto.*

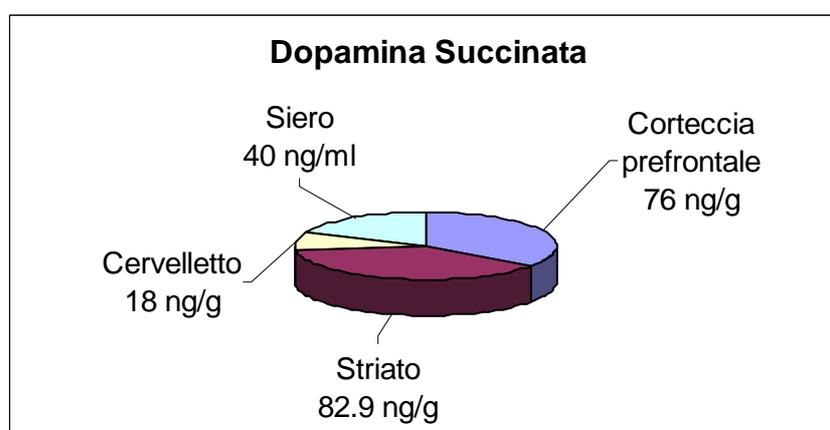


Fig. 16 *Recupero di dopamina-succinata nella corteccia prefrontale, nello striato, nel cervelletto e nel siero intracardiaco.*

3.6 Dosaggio della dopamina in omogenati cerebrali

Il dosaggio della dopamina rilasciata dal profarmaco GALDA è stato condotto su ratti NHE e NRB. Sono state analizzate diverse aree cerebrali: lo striato, il mesencefalo ventrale e la corteccia prefrontale, che sono state omogenate e sottoposte a centrifugazione. Il supernatante è stato iniettato in un HPLC dotato di un rivelatore elettrochimico. È stato scelto questo tipo di rivelatore per superare gli ostacoli relativi all'instabilità della dopamina.

E' stato individuato un aumento nel contenuto di dopamina, dopo la somministrazione del profarmaco, in tutte le aree in esame, in particolare nei ratti NHE (Fig. 17, 18 e 19). Da questi dati si ottiene un'ulteriore prova del rilascio di dopamina nel cervello da parte del GALDA.

Inoltre si deve sottolineare che in condizioni basali ci sono differenze significative nei livelli di dopamina nelle diverse regioni cerebrali, in particolare il livello è maggiore nello striato, minore nel mesencefalo e si riduce ulteriormente nella corteccia prefrontale, senza differenza tra ratti NHE e NRB. Il trattamento con il GALDA non produce variazioni significative nella concentrazione di dopamina di queste regioni, tranne che nello striato dei ratti NHE, dove l'aumento di dopamina è molto elevato (Fig 17).

In condizioni basali c'è correlazione positiva tra i livelli di dopamina nel mesencefalo rispetto allo striato ed alla corteccia prefrontale dei ratti NHE, ovvero aumentando il livello di dopamina nel mesencefalo si ha un aumento anche nel target (striato o corteccia prefrontale). Tale correlazione è negativa nei ratti di controllo NRB, ovvero quando si verifica un aumento del livello di dopamina nel mesencefalo si ha una sua riduzione nel target. La somministrazione del GALDA annulla questo andamento: in entrambi i ceppi viene a mancare la covariazione dei livelli di dopamina nelle diverse zone cerebrali. Si ipotizza che questo effetto sia dovuto all'azione della dopamina derivante dal GALDA sugli autocettori D2 a livello del mesencefalo. Questi recettori presinaptici se attivati inibiscono il rilascio di altra dopamina e, per rispettare i rapporti tra le concentrazioni del

neurotrasmettitore nelle diverse zone cerebrali, si verifica un aumento dei suoi livelli nello striato e nella corteccia prefrontale, quindi dove è maggiormente necessario per avere un effetto terapeutico sull'ADHD (Ruocco L.A., 2007, A).

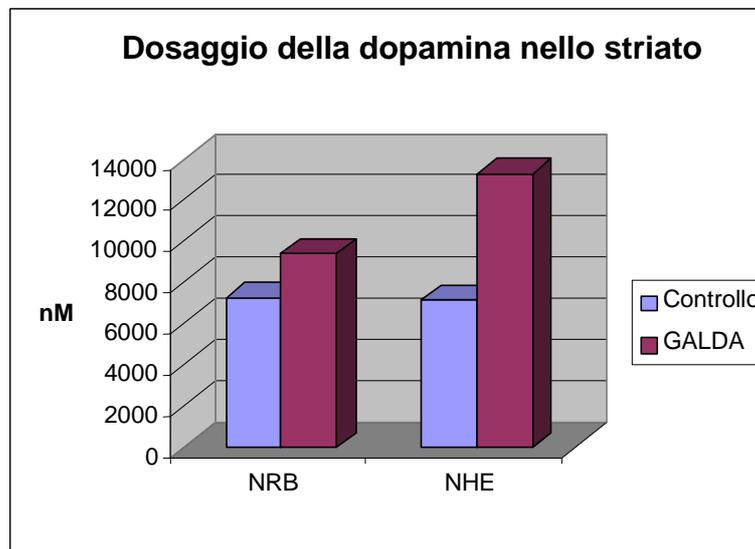


Fig.17 Concentrazione di dopamina nello striato dei ratti NRB ed NHE. È evidente l'aumento significativo del neurotrasmettitore negli NHE trattati con il GALDA.

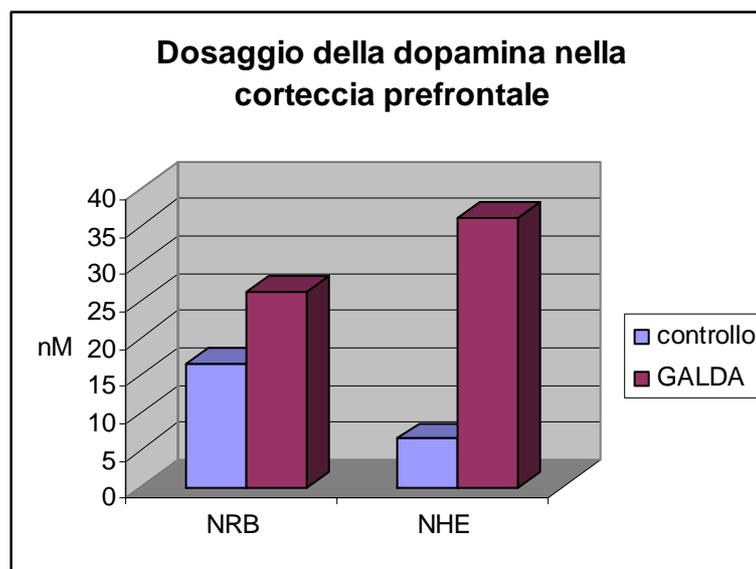


Fig. 18 Concentrazione di dopamina nella corteccia prefrontale dei ratti NRB ed NHE. Anche in questo caso aumenta il livello di neurotrasmettitore negli NHE trattati con il GALDA.

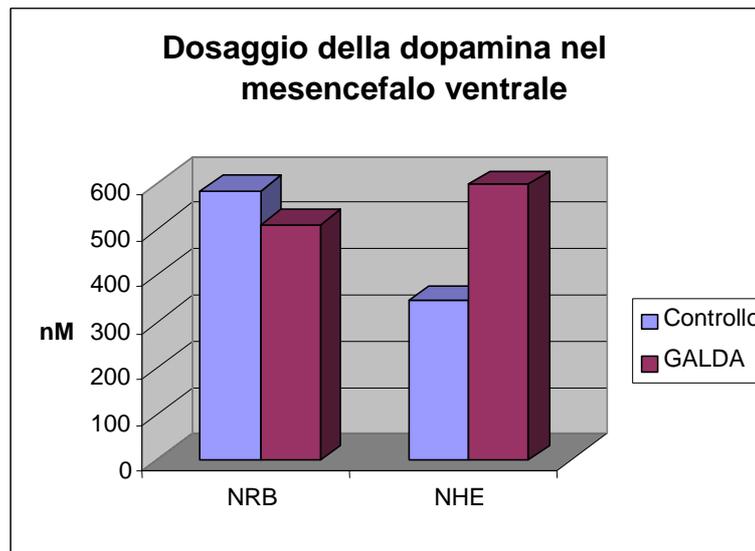


Fig. 19 *Concentrazione di dopamina nel mesencefalo ventrale dei ratti NRB ed NHE. Si verifica un aumento del livello di neurotrasmettitore negli NHE trattati con il GALDA, ma in misura inferiore rispetto alle precedenti zone.*

3.7 Saggi comportamentali

3.7.1 Esperimenti su ratti NHE

Gli esperimenti comportamentali sono stati effettuati innanzitutto su ratti NHE e NRB, in cui il GALDA è stato somministrato tramite iniezione intraperitoneale. Un gruppo di controllo è stato trattato solo con galattosio in modo da verificare se lo zucchero rilasciato dal profarmaco ha degli effetti sul comportamento. Sono state somministrate due dosi: 10 mg/kg e 100 mg/kg, quest'ultima per il trattamento acuto, e quantità equimolari per il galattosio (5 mg/kg e 50 mg/kg).

Il sistema sperimentale è costituito da un Låt-maze (“labirinto di Låt”) costruito in base alle dimensioni dei ratti. Brevemente, esso consiste in un box di legno quadrato che contiene al centro un box più piccolo di plastica trasparente. Ai ratti viene permesso di esplorare il corridoio esterno (Fig.20).

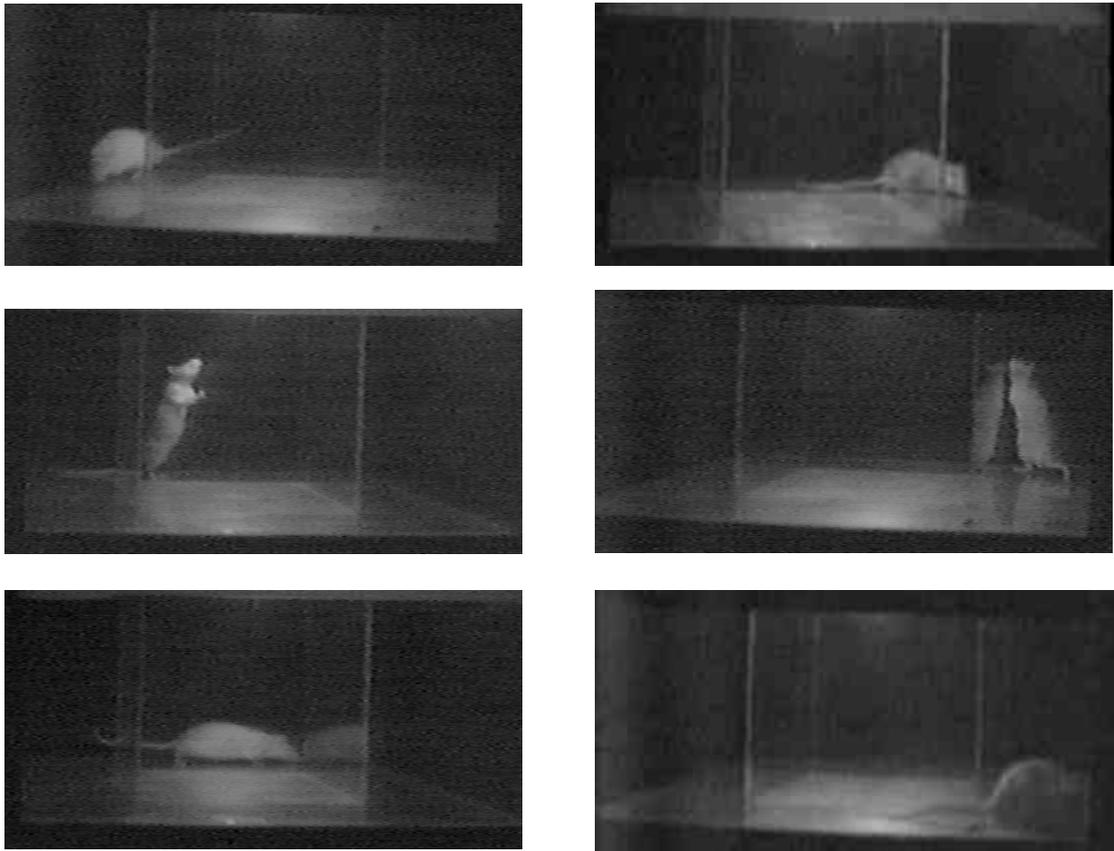


Fig.20 *Comportamento del ratto nel Làt-maze.*

Gli animali vengono introdotti nel Làt-maze per un test di 30 minuti, durante il quale vengono osservate entro 3 ore dall'iniezione le variabili comportamentali indicative dell'iperattività e dell'attenzione non-selettiva: il numero di "corner crossing", e la frequenza e la durata dei "rearings".

L'iniezione del galattosio da solo non ha dato nessun effetto significativo per quanto riguarda il numero o la durata dei "rearings". Tuttavia, la dose acuta utilizzata (50 mg/kg) sembra aumentare l'attività orizzontale ("corner crossing") solo nei ratti NHE.

L'iniezione del GALDA non ha alcun effetto sull'attività locomotoria orizzontale nei ratti di controllo NRB, mentre riduce la distanza percorsa nei ratti NHE in maniera dose-dipendente (Fig.21). I ratti NHE, trattati con la dose acuta di GALDA (100 mg/kg), hanno un'attività locomotoria orizzontale minore dei ratti NRB.

Il GALDA, inoltre, riduce anche l'attività verticale solo dei ratti NHE, in maniera dose-dipendente. Infatti il trattamento acuto col profarmaco (100 mg/kg) fa diminuire il numero dei rearings e aumentare la loro durata (Fig.21). Gli animali NRB, invece, non hanno subito alcun cambiamento significativo neppure nell'attività locomotoria verticale, in seguito alla somministrazione del GALDA (Fig. 22) (Ruocco L.A., 2007, A).

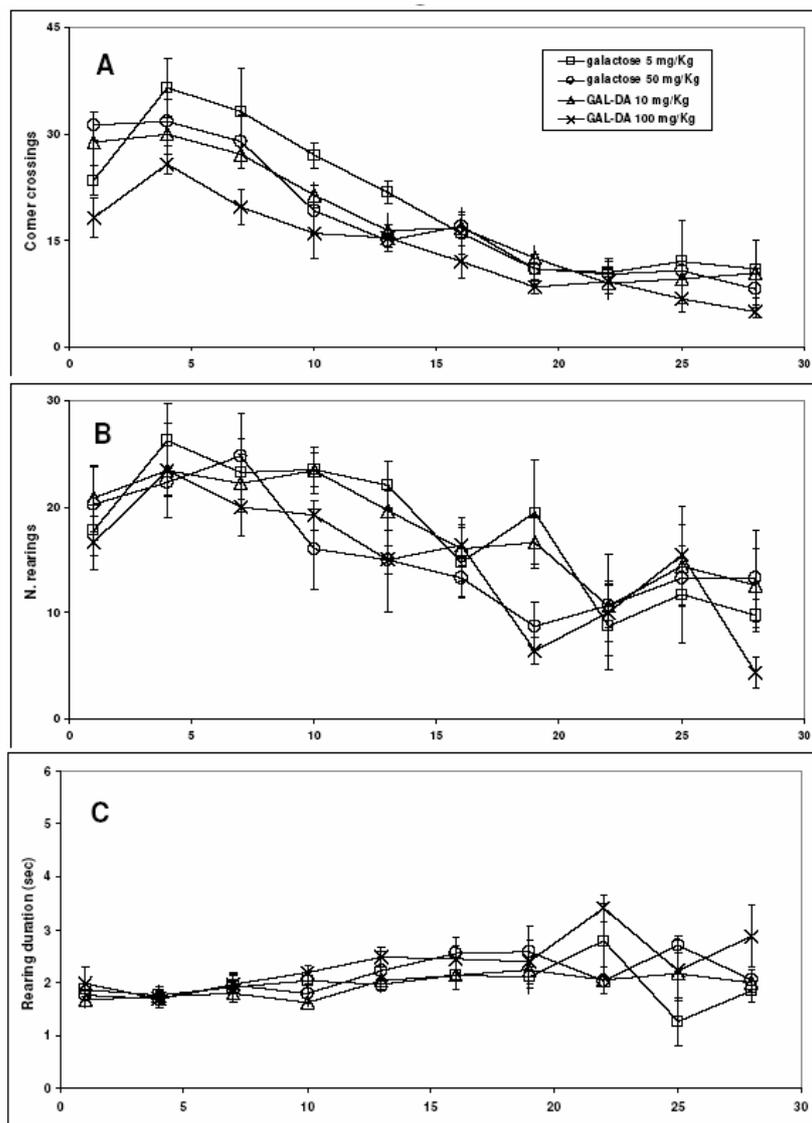


Fig. 21 Effetti comportamentali del GALDA sui ratti NHE. A) Numero di corner crossing. B) Numero di rearings. C) Durata dei rearings.

In definitiva il GALDA manifesta effetti comportamentali positivi soltanto sui ratti iperattivi, riducendo la loro attività locomotoria e aumentando il livello di attenzione non-selettiva. Confrontando questi risultati con quelli ottenuti per il dosaggio della dopamina nelle varie zone cerebrali, si può ipotizzare che l'effetto comportamentale positivo sia dovuto ad un riequilibrio dei livelli di dopamina causato dall'attivazione degli autocettori D2 presinaptici.

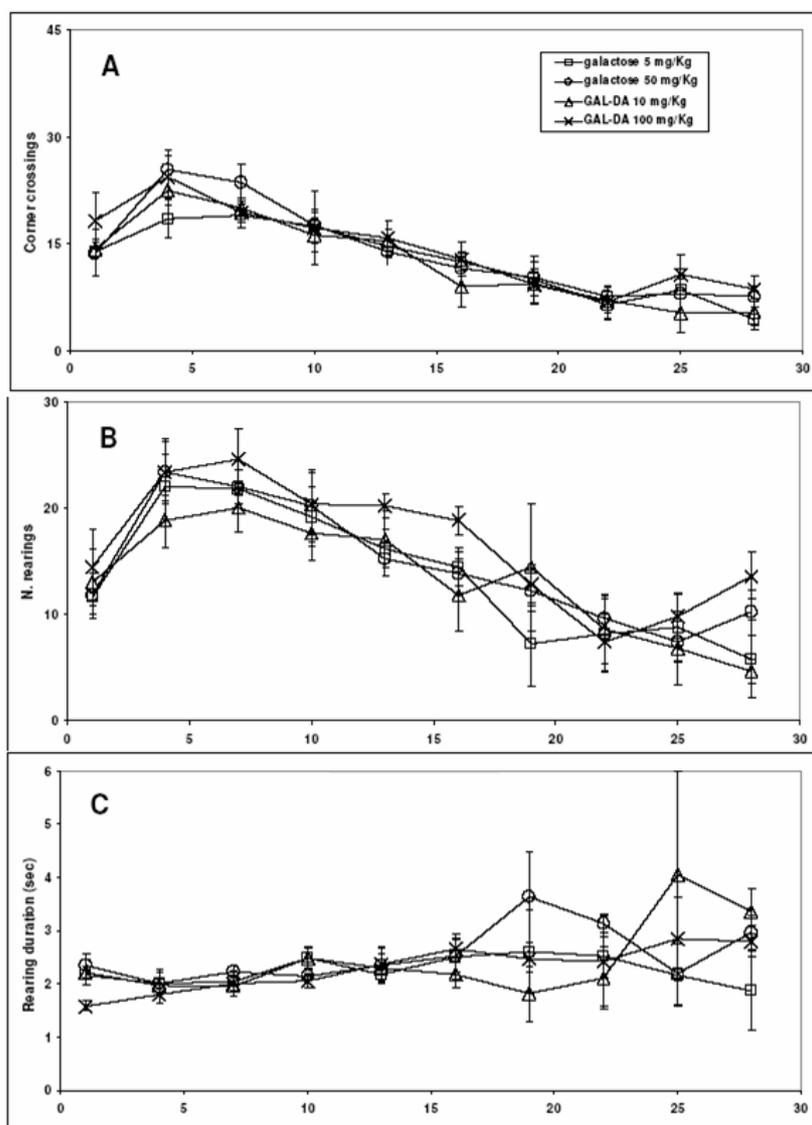


Fig. 22 Effetti comportamentali del GALDA sui ratti NRB. A) Numero di corner crossing. B) Numero di rearings. C) Durata dei rearings.

3.7.2 Esperimenti su topi C57BL/6

Per i successivi saggi comportamentali sono stati utilizzati topi C57BL/6 e topi Swiss albi come controllo. I topi C57BL/6 rappresentano un modello sperimentale di ADHD in quanto manifestano un profilo iperattivo, con la caratteristica di una bassa espressione di autocettori D2 nell'area ventrale tegmentale, ma non nella "substantia nigra". Questa caratteristica induce nei topi un comportamento iperattivo, rendendoli adatti per valutare alcuni aspetti dell'ADHD (Cabib2002).

Il GALDA è stato testato alle dosi di 10 mg/kg e 100 mg/kg e somministrato per via intraperitoneale. Anche in questo caso un gruppo di controllo è stato trattato solo con quantità equimolari di galattosio per verificare la presenza di effetti comportamentali causati dallo zucchero rilasciato dal profarmaco. I test sono stati condotti seguendo le stesse procedure usate gli esperimenti sui ratti NHE e NRB, monitorando i topi all'interno di un Låt-maze entro 3 ore dall'iniezione.

I risultati mostrano che il trattamento acuto con GALDA (100 mg/kg) ha causato un aumento significativo dell'attività orizzontale sia nei topi C57BL/6 sia nel controllo, probabilmente causato dall'attivazione dei recettori D2 postsinaptici nello striato e nella corteccia prefrontale. (Fig 23). Per quanto riguarda l'attività verticale si verifica un leggero aumento della frequenza dei "rearings", mentre la loro durata è significativamente aumentata, in entrambi i gruppi, manifestando un aumento dell'attenzione. (Fig 24 e 25). L'iniezione del galattosio da solo non ha dato nessun effetto significativo sull'attività locomotoria degli animali trattati.

Tali risultati sembrano a prima vista discordanti con quelli ottenuti dal GALDA sui ratti NHE, ma in realtà confermano l'ipotesi secondo la quale l'azione positiva del GALDA su questo modello deriva da una maggiore attivazione degli autocettori D2 presinaptici nel mesencefalo. Nei topi C57BL/6 sono proprio questi recettori ad essere meno espressi e si verifica un effetto sull'attività orizzontale opposto a quello ottenuto nei ratti NHE (Ruocco L.A., 2007, B).

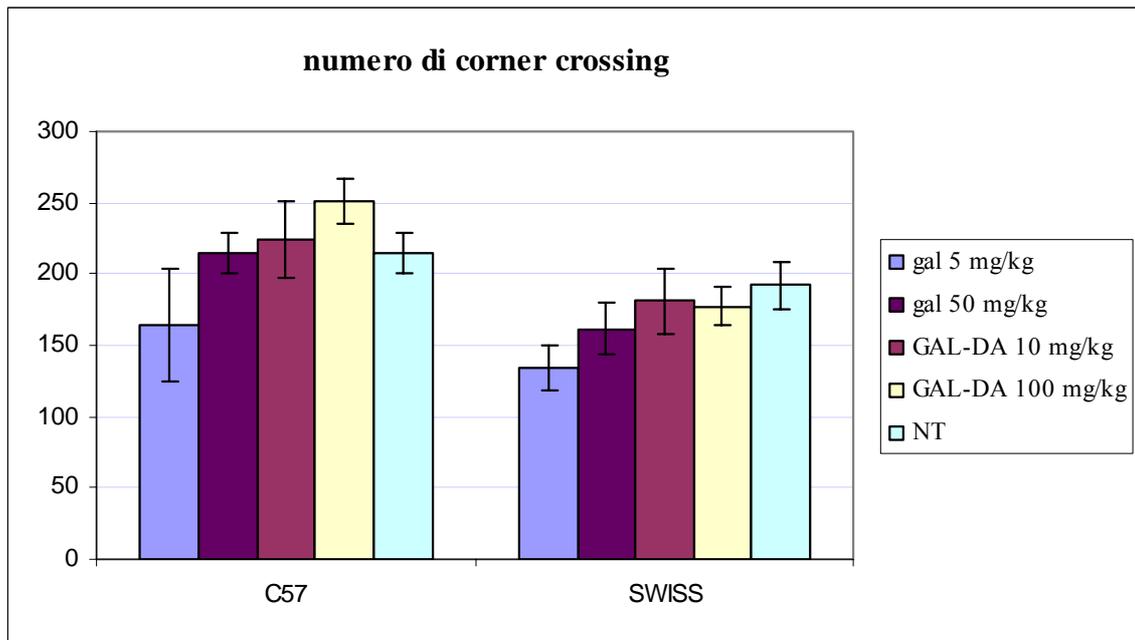


Fig. 23 Attività orizzontale espressa come numero di “corner crossing”, nei topi C57BL/6 e di controllo.

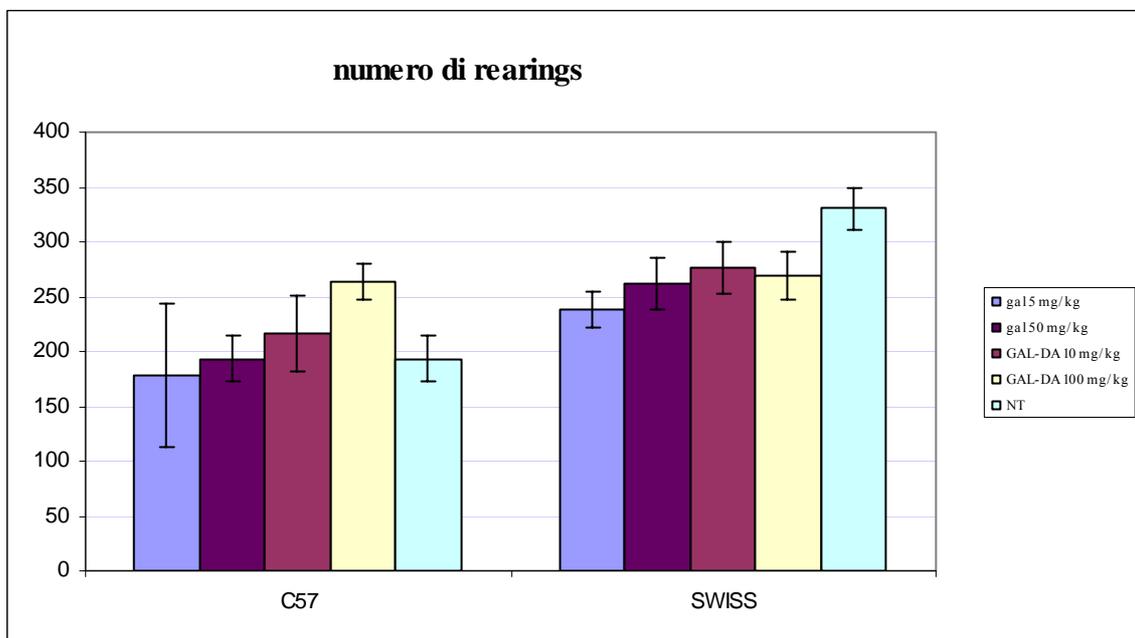


Fig. 24 Attività verticale espressa come numero dei “rearings”, nei topi C57BL/6 e di controllo.

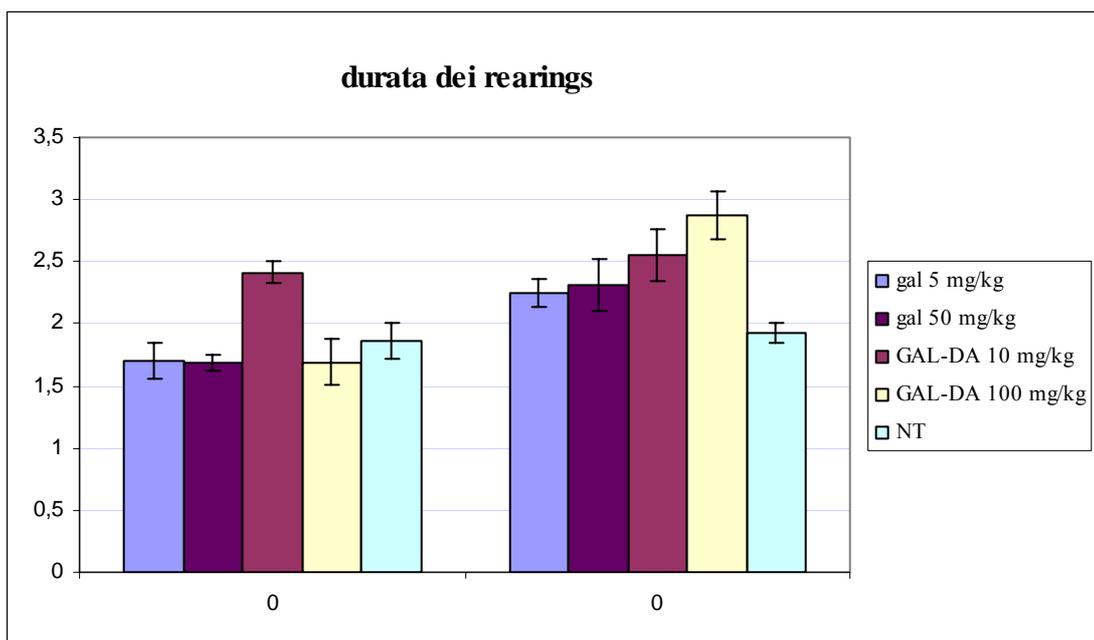


Fig. 25 Attività verticale espressa come durata dei “rearings”, nei topi C57BL/6 e di controllo.

3.8 Conclusioni sul GALDA

Da tutti gli esperimenti effettuati utilizzando il profarmaco GALDA si evince innanzitutto che esso è in grado di attraversare la BEE e di rilasciare il farmaco attivo a livello centrale.

Prove dell’effettivo passaggio della BEE da parte del profarmaco sono state ottenute, sia misurando l’aumento dei residui di galattosio nel cervello, mediante saggi istochimici, sia misurando direttamente, tramite HPLC/MS, il GALDA e la dopamina succinata e, tramite HPLC/EC, la dopamina liberata negli estratti cerebrali.

Ulteriori prove che la dopamina viene effettivamente rilasciata a livello neuronale provengono dai saggi comportamentali, che mostrano per il GALDA effetti dose-dipendenti e genotipo-dipendenti.

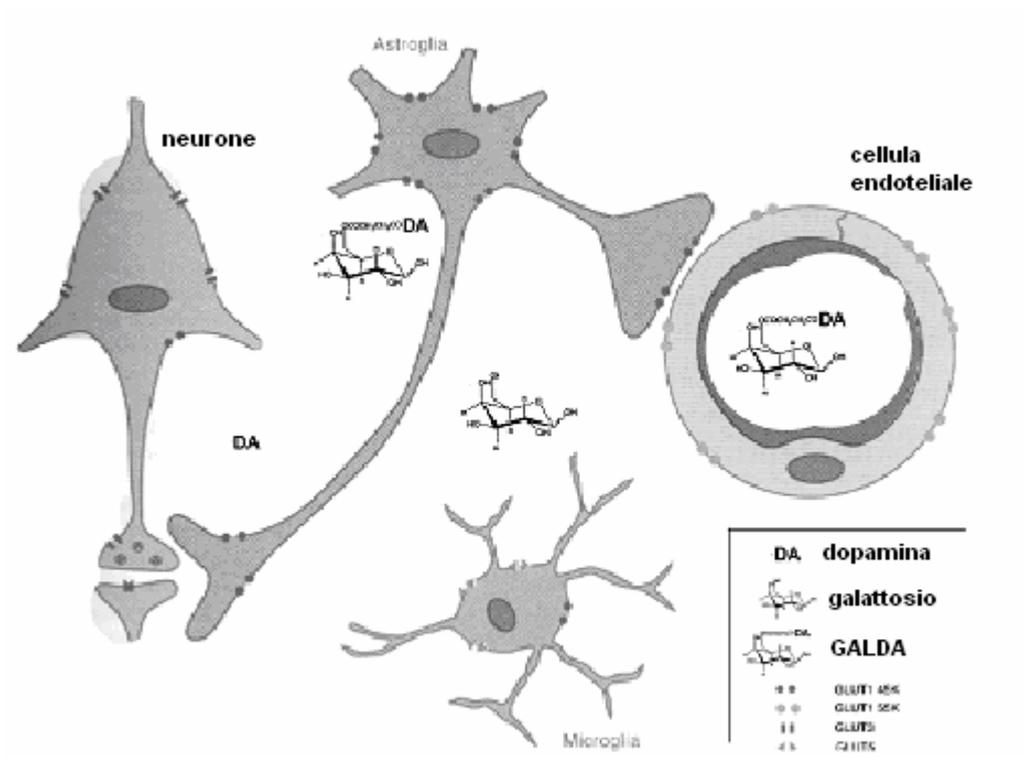


Fig. 26 Rilascio di dopamina dal GALDA nel SNC.

In generale, il profarmaco sembra esercitare piccoli effetti nella linea di controllo NRB, mentre ha effetti calmanti, simili a quelli esercitati dal metilfenidato, nei ratti NHE, causando un aumento dell'attenzione e una riduzione dell'attività locomotoria. Questi effetti sono probabilmente dovuti ad un riequilibrio dei livelli di dopamina nelle zone cerebrali coinvolte nell'ADHD, che deriva dal lento rilascio del neurotrasmettitore dal profarmaco (Fig.26).

Gli esperimenti effettuati sui ratti NHE sono stati ulteriormente confermati dai successivi test comportamentali sui topi C57BL/6.

In definitiva si può concludere che il profarmaco GALDA risulta essere un buon candidato per il trattamento di patologie in cui si verifica una carenza o un'alterazione dei livelli di dopamina nel SNC, per le quali ad oggi le strategie farmacologiche utilizzate comportano gravi effetti collaterali. Una di esse è rappresentata dall'ADHD, che colpisce dall'1 al 4 % dei bambini in età scolare e la cui incidenza è in continuo aumento.

4 D-ASPARTATO

4.1 Introduzione: il D-aspartato

All'inizio del XX secolo vari studi dimostrarono la presenza dei D-aminoacidi nei batteri, negli anfibi e negli invertebrati. Negli ultimi anni, lo sviluppo di tecniche cromatografiche più sensibili ha rilevato la presenza della forma destrogira degli aminoacidi, anche nei mammiferi, inclusi gli esseri umani. Probabilmente la loro presenza deriva dalla microflora batterica endogena, dall'ingestione con la dieta o dalla racemizzazione spontanea di L-amminoacidi (Fuchs S.A. et al., 2005).

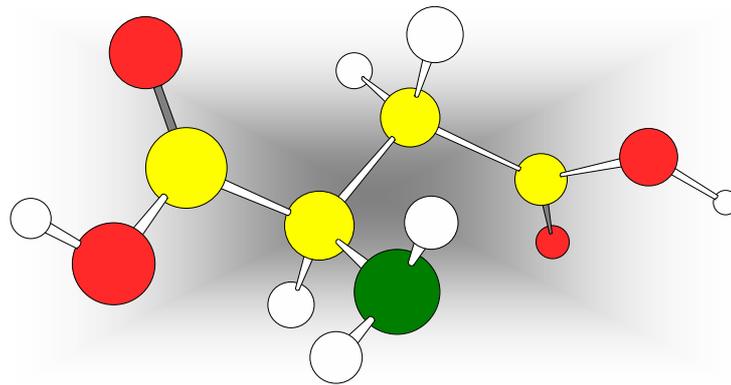
Inizialmente i D-amminoacidi non si ritenevano responsabili di alcuna azione fisiologica, ma studi successivi hanno evidenziato che talvolta la concentrazione dell'isomero destrogiro risulta maggiore di quella del levogiro, dimostrando il loro ruolo in specifiche funzioni biologiche. Quindi livelli alterati di tali D-amminoacidi possono causare condizioni patologiche.

Per esempio, è stato dimostrato per il D-aspartato un ruolo nella neurotrasmissione e nella regolazione delle ghiandole endocrine. Esso agisce nella regolazione della secrezione di diversi ormoni, come testosterone, ossitocina, ormone della crescita, ormone luteinizzante, prolattina e melatonina, di cui quest'ultimo è l'unico regolato negativamente.

Diversi dati suggeriscono che il D-aspartato è in grado di promuovere la sintesi delle proteine coinvolte nello sviluppo del sistema nervoso e nella neurotrasmissione e neuromodulazione a livello sinaptico. Inoltre, è stato visto che viene riconosciuto dal trasportatore del glutammato dallo spazio sinaptico agli assoni presinaptici (D'Aniello A., 2007).

Il D-aspartato è il precursore biologico dell'N-metil-D-aspartato ed è capace di interagire con il sito di legame del glutammato, a livello del recettore NMDA, dimostrando una possibile regolazione dello sviluppo corticale e nella neurotrasmissione mediata dai recettori NMDA. Esso ha per questo recettore

un'affinità elevata, ma 10 volte inferiore rispetto all'agonista endogeno, l'L-glutammato (Fuchs S.A. et al., 2005). Questa caratteristica potrebbe risultare positiva, poiché essendo il recettore NMDA un canale per il Ca^{++} , se viene eccessivamente attivato può portare a livelli tossici di Ca^{++} intracellulari. Andando a stimolare il recettore con un agonista più debole come il D-aspartato si potrebbe ottenere un effetto terapeutico senza rischio di citotossicità.



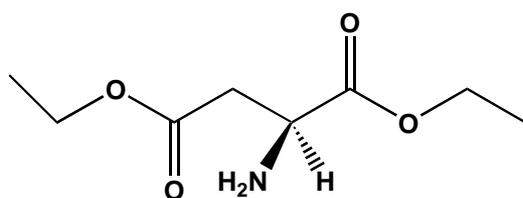
È stato visto che i livelli di D-aspartato sono alterati nei pazienti affetti dal morbo di Alzheimer ed è stato dimostrato che i recettori NMDA sono coinvolti anche nei processi di apprendimento e di memoria. In particolare, in questa patologia, i livelli di D-Aspartato sono aumentati nel fluido cerebrospinale dei pazienti e diminuiti nelle regioni cerebrali coinvolte, confermando che l'aumento del D-amminoacido potrebbe avere effetti terapeutici su questa malattia (D'Aniello et al., 1998).

Per quanto riguarda l'ADHD, studi recenti hanno dimostrato che nello striato degli NHE vi è una maggiore espressione di alcune subunità dei recettori NMDA, probabilmente per un ridotto rilascio del trasmettitore, sia esso glutammato, N-metil-D-aspartato o D-aspartato (Sadile A.G. et al., 1996). Dosaggi preliminari hanno provato che la quantità di glutammato è pari ai livelli fisiologici, per cui l'ipotesi di lavoro è che la causa dell'up-regulation dei recettori NMDA nei ratti NHE sia una minore concentrazione di D-aspartato. Per comprovare tale ipotesi sono stati sintetizzati dei profarmaci del D-aspartato, in grado di incrementare la

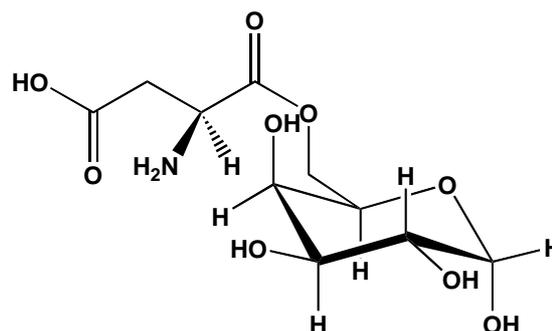
concentrazione dell'aminoacido nello striato dei ratti NHE, per diminuire il livello di iperattività di questi ratti.

4.2 Sintesi dei profarmaci del D-aspartato

Sono state progettate due diverse tipologie di profarmaci del D-aspartato: il **DEE** (D-aspartato-dietilestere), in cui i due gruppi carbossilici dell'amminoacido sono stati esterificati, con lo scopo di incrementare la lipofilia della molecola, per attraversare la BEE per diffusione passiva, ed il **GALASPA**, (D-aspartato-galattosio), in cui il galattosio funziona come molecola vettore, per permettere alla molecola di essere riconosciuta dal carrier Glut1 e di penetrare nel SNC.



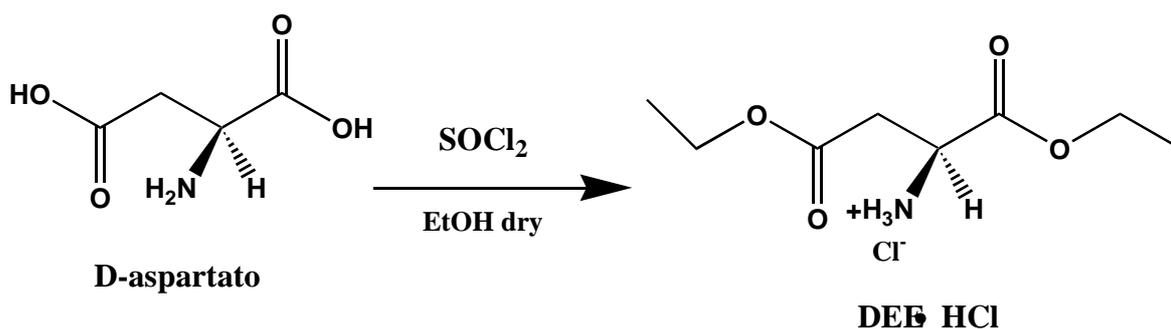
DEE



GALASPA

4.2.1 Sintesi del DEE

Per la sintesi del D-aspartato dietil estere (**DEE**) il D-aminoacido tal quale viene trattato con cloruro di tionile (SOCl_2) in presenza di etanolo anidro, ottenendo direttamente il profarmaco sotto forma di sale cloridrato (**DEE·HCl**) (Schema 2). La struttura del prodotto finale e di tutti gli intermedi di reazione è stata confermata da spettri NMR ^1H e ^{13}C e da spettrometria di massa.

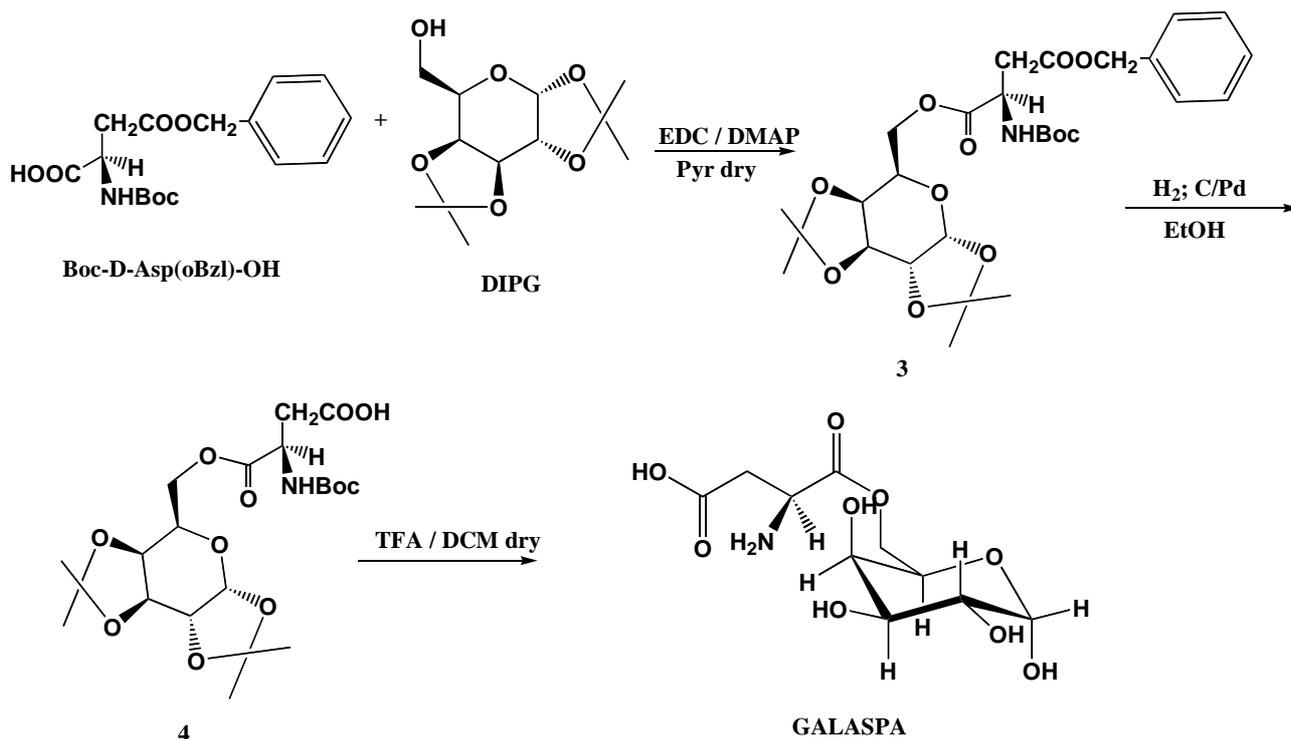


Schema 2 Sintesi del DEE

4.2.2 Sintesi del GALASPA

Il D-Aspartato-galattosio è stato sintetizzato facendo reagire il Boc-D-aspartato-4-benzil estere (Boc-D-Asp(OBzl)-OH) con l'1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D-galattosio (DIPG), in modo da derivatizzare in maniera specifica l'ossidrilico in posizione 6' dello zucchero. La reazione viene eseguita utilizzando l'N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimide cloridrato (EDC), come agente condensante, in piridina anidra (Pyr), in presenza di 4-dimetilaminopiridina (DMAP) come catalizzatore (Schema 3).

Il prodotto ottenuto, il diacetone 6'-O-(Boc-D-aspartato-4-benzil)-D-galattopiranoside (**3**), dev'essere poi soggetto a deprotezione. Il gruppo benzilico, che protegge il carbossile presente in catena laterale, viene rimosso mediante idrogenazione, in etanolo, in presenza di C/Pd. Infine, il prodotto debenzilato (**4**), viene sciolto in diclorometano anidro e trattato con acido trifluoroacetico (TFA), per rimuovere il gruppo Boc- dal gruppo amminico dell'aminoacido, e i chetali dallo zucchero ed ottenere il **GALASPA**. Anche in questo caso la struttura del prodotto finale è stata confermata da spettri NMR ^1H e ^{13}C e da spettrometria di massa.



Schema 3 Sintesi del GAL-ASPA

4.3 Saggi comportamentali sul profarmaco DEE

Per il momento i saggi comportamentali sono stati eseguiti solo sul profarmaco DEE. A tale scopo sono stati utilizzati gli stessi animali usati per i primi saggi comportamentali del profarmaco GALDA, ovvero i ratti iperattivi NHE e gli NRB, come controllo.

I ratti sono stati trattati per 17 giorni con D-aspartato 0.5 M, con il suo profarmaco DEE·HCl 0.5 M, oppure solo con il veicolo, tramite iniezioni intraperitoneali. Un'ora dopo la 15° iniezione i ratti sono stati esposti al Låt maze per 10 minuti, durante i quali il comportamento è stato monitorato ed analizzato in differita per indici di attività orizzontale (HA) e verticale (VA) ed attenzione non selettiva.

La figura 27 mostra che nel Labirinto di Låt il DEE, ma non il D-aspartato, riduce l'attività verticale nella prima parte del test, sia sui ratti NHE che in quelli NRB. Questo suggerisce che il rilascio lento del D-aminoacido da parte del profarmaco normalizza probabilmente i recettori NMDA, provocando un aumento dell'attenzione.

Vista la stretta relazione tra il comportamento dei ratti e l'ambiente circostante, oltre al labirinto Låt gli stessi test sono stati effettuati su un sistema più complesso rappresentato dal labirinto di Olton, a otto bracci (Fig. 28).

Il 17° giorno, un'ora dopo l'ultima iniezione, i ratti sono stati esposti al labirinto di Olton per 10 minuti, durante i quali il comportamento è stato monitorato ed analizzato in differita, come per il Låt maze.

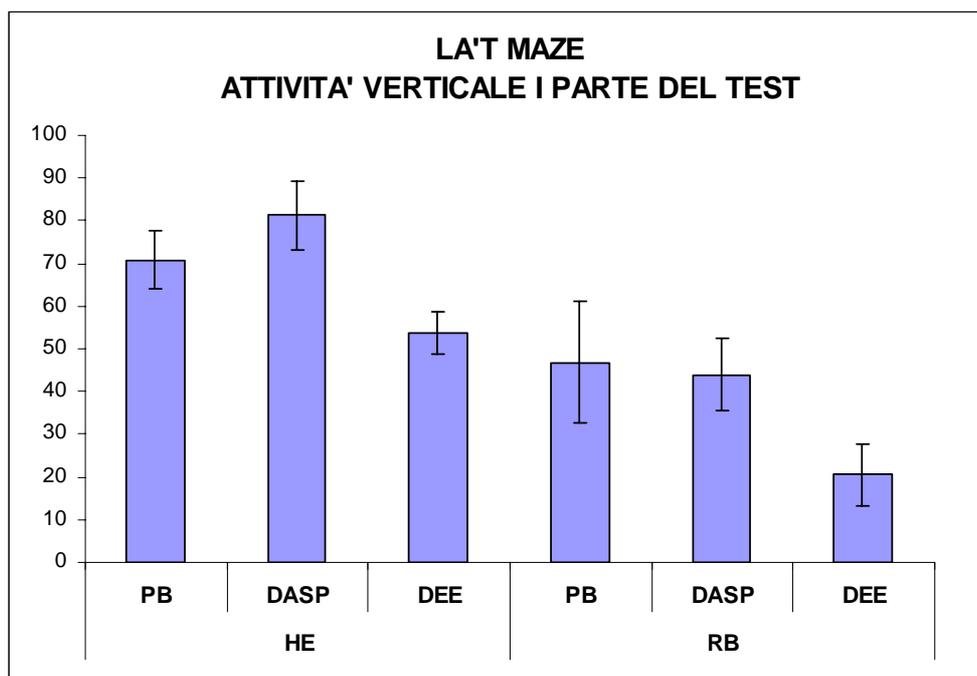


Fig. 27 Risultati Låt-maze

PB= controllo **D-ASP**= ratti trattati con D-Aspartato 0.5 M **DEE**= ratti trattati con DEE·HCl 0.5 M



Fig. 28 *Labirinto di Olton*

I risultati di quest'ultimo test mostrano che per quanto riguarda i ratti NHE il trattamento con il D-aspartato libero ha un effetto maggiore di quello con il suo profarmaco DEE, ovvero il D-aspartato riduce l'attività verticale nella prima parte del test più del DEE. Invece nei ratti NRB è solo il derivato DEE a provocare una diminuzione dell'attività verticale (Fig 29).

La riduzione dell'attività motoria, ottenuta nel labirinto di Låt dal DEE sui ratti NHE, è inferiore rispetto a quella ottenuta nell'Olton. La spiegazione di ciò può essere ricavata dal fatto che i parametri comportamentali assumono un significato cognitivo diverso in base al contesto in cui si trova l'animale. In una situazione più complessa, come quella del labirinto di Olton, probabilmente per i ratti NHE si attivano circuiti neuronali diversi, che non vengono influenzati dal rilascio di D-aspartato dal profarmaco, ma semplicemente dal neurotrasmettitore come tale. L'effetto prodotto sui ratti NHE dal D-aspartato viene riprodotto dal DEE nei ratti di controllo, confermando che anche nei due ceppi sono implicati diversi substrati neurali in una risposta comportamentale complessa.

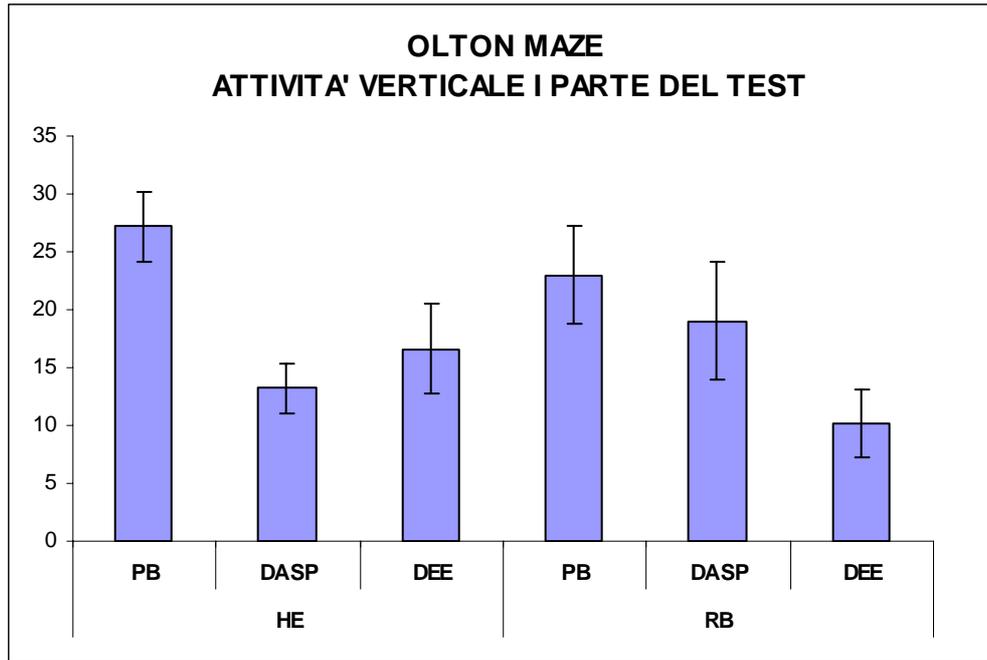


Fig. 29 Risultati nel labirinto di Olton

PB= controllo **D-ASP**= ratti trattati con D-Aspartato 0.5 M **DEE**= ratti trattati con DEE·HCl 0.5 M

4.4 Conclusioni sui profarmaci del D-aspartato

Il trattamento cronico con il profarmaco del D-aspartato DEE riduce l'iperattività dei ratti NHE nel Låt maze, mostrando che la molecola può risultare utile nel definire più accuratamente l'effettivo ruolo del D-aspartato nell'ADHD.

Probabilmente il lento rilascio del farmaco attivo da parte del DEE normalizza i recettori NMDA, che subiscono una up-regulation nei ratti NHE, quindi sono coinvolti nell'ADHD (Sadile AG et al., 1996).

Il diverso comportamento del D-aspartato come tale e del suo derivato DEE nei due modelli sperimentali del labirinto di Låt e di Olton conferma la complessità della risposta a diversi stimoli ambientali e che diversi circuiti neurali sono coinvolti nel comportamento e nei processi dell'attenzione dei ratti iperattivi (NHE) e non (NRB).

Ulteriori indagini sono necessarie per definire il coinvolgimento del D-aspartato nell'ADHD, partendo dal dosaggio dei neurotrasmettitori implicati (glutammato, D-aspartato e N-metil-D-aspartato) e dall'approfondimento dello studio dei recettori NMDA nel cervello dei ratti NHE, in modo da confermare l'ipotesi che sia proprio la carenza di D-aspartato a causare l'iper-espressione di questi recettori e a contribuire all'iperattività degli animali.

Sono in corso gli studi sulla stabilità del profarmaco DEE, che ai fini del trattamento cronico effettuato non è stata ritenuta di fondamentale importanza, ma che deve essere studiata per continuare il lavoro su questa molecola. Infatti gli esperimenti successivi prevedono il dosaggio del DEE e del D-aspartato liberatosi, nei cervelli dei ratti sacrificati in seguito ai saggi comportamentali.

Infine, gli stessi esperimenti verranno ripetuti per il derivato galattosilato, GALASPA, in modo da verificare quali delle due tipologie di profarmaco sia in grado d'incrementare maggiormente la concentrazione di D-aspartato nel SNC e di agire meglio sull'ADHD.

5. NAGAL

5.1 Introduzione: Nitroarginina e monossido d'azoto (NO)

La Nitroarginina è un inibitore non selettivo della Nitric Oxide Synthase (NOS), enzima che catalizza la reazione di trasformazione della L-arginina a L-citrullina e monossido di azoto (NO).

L'NO è una specie chimica altamente reattiva di natura radicalica. I radicali liberi, avendo gli elettroni del livello energetico più esterno spaiati, tendono a reagire attivamente nei tessuti biologici determinando variazioni dello stato di ossidazione delle molecole con cui vengono a contatto.

Esso è stato considerato per decenni un gas altamente inquinante e solo in epoca molto recente esso è stato individuato come uno dei più potenti mediatori biochimici che gli organismi viventi producono al fine di controllare molte delle loro funzioni (Brennan P.A. e Moncada S., 2002).

Tale molecola si trova in uno stato intermedio di ossidazione per cui è in grado sia di ossidare che di ridurre i composti chimici con cui viene a contatto.

Anche se l'NO può essere generato per via non enzimatica per riduzione dei nitriti, la sua biosintesi avviene principalmente attraverso la trasformazione della L-arginina in L-citrullina operata dalle NOS.

Il meccanismo della reazione enzimatica non è ancora del tutto chiarito nei dettagli: la reazione avviene per passaggi successivi, che portano alla ossidazione del gruppo guanidinico della L-arginina in un processo che utilizza 5 elettroni e richiede come cofattori il nicotinamide-adenin-dinucleotide fosfato ridotto (NADPH), il flavin-adenin-dinucleotide (FAD) ed il flavin-mononucleotide (FMN), con formazione stechiometrica di NO e L-citrullina.

Il NADPH agisce come fonte di elettroni, che passano attraverso il FAD ed il FMN, per arrivare al Fe^{3+} del gruppo eme che interagirà con l' O_2 molecolare, per attivarlo e permettere l'ossidazione della L-arginina.

Il primo passaggio consiste nella trasformazione della L-arginina in N-idrossi-L-arginina, l'unico intermedio di reazione che è stato identificato, a tale reazione seguirebbe la formazione di un ulteriore substrato intermedio che infine verrebbe convertito in L-citrullina con liberazione di NO (Fig. 30).

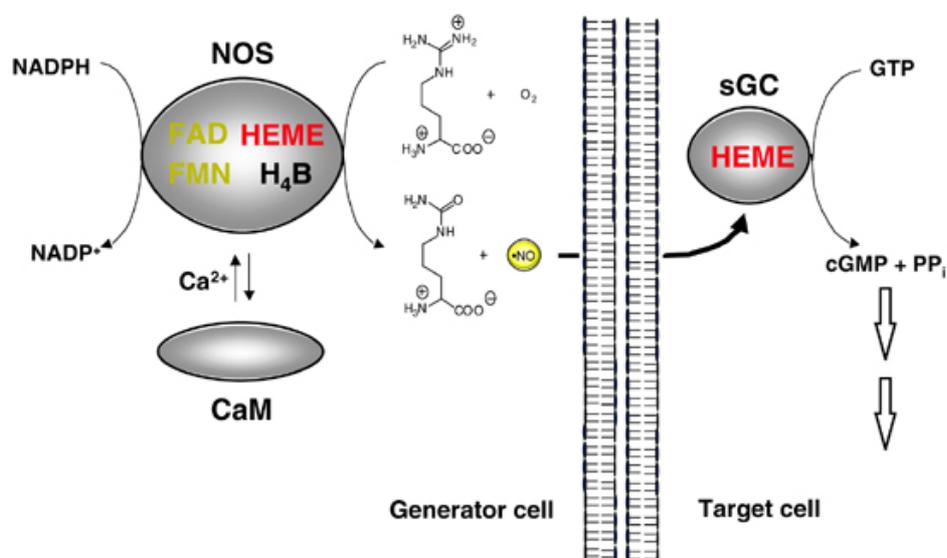


Fig. 30 *Meccanismo enzimatico della formazione di NO e di azione dell'NO sulla cellula bersaglio.*

Visto che la porzione COOH-terminale della NOS, ovvero il dominio con attività reduttasica, presenta un'elevata omologia con la citocromo P450 reduttasi, il meccanismo di trasferimento di elettroni è probabilmente simile a quello della famiglia dei citocromi P450, infatti la NOS presenta anche gli stessi siti di legame per i cofattori NADPH, FAD e FMN.

Il legame del complesso Ca^{2+} /Calmodulina, in presenza di O_2 e NADPH attiva la NOS, mentre la tetraidrobiopterina (BH_4) può facilitare il legame di L-Arginina attraverso la stabilizzazione dell'enzima.

L'ossidazione della L-arginina avviene nella porzione N-terminale della proteina, dove è presente il gruppo eme. Tra il dominio con attività reduttasica e

quello ossidativo si trova il sito di legame per la calmodulina, che sembra regolare il flusso di elettroni tra le due regioni della proteina.

La NOS è quindi un complesso di attività enzimatiche: oltre all'attività arginina N^o-idrossilasi ed alla N^o-idrossiarginina mono-ossigenasi tetraidrobiopterino-dipendente, sono presenti le attività diidropteridina reduttasi NADPH-dipendente e NADPH ossidasi (Knowles R.G. e Moncada S., 1994). Questo enzima presenta una struttura distinta in due domini, che costituiscono un omodimero. La dimerizzazione degli omodimeri è necessaria per l'attività enzimatica ed è favorita dalla presenza dell'eme, della tetraidrobiopterina (BH4) e della L-arginina.

Sono state identificate tre isoforme dell'enzima di cui due costitutive (eNOS e nNOS) e una inducibile (iNOS):

- **nNOS** (neuronale o NOS I), localizzata nel tessuto neuronale centrale e periferico, è un enzima Ca²⁺-dipendente, regolato dalle variazioni della concentrazione del Ca²⁺ citosolico, che fa legare la calmodulina, necessaria per l'attivazione di questa isoforma della NOS.
- **eNOS** (endoteliale o NOS III), localizzata nell'endotelio, nel sistema nervoso e nell'epitelio renale, recentemente è stata identificata anche nei miociti cardiaci, nei linfociti T e B, negli epatociti, negli adipociti bianchi e bruni ed in molte linee cellulari. Come la nNOS, anche questa isoforma è costitutiva e regolata dal sistema Ca²⁺/calmodulina.
- **iNOS** (inducibile o NOS II), si ritrova nelle cellule, e in particolare nei macrofagi, in risposta alla stimolazione da parte di una varietà di citochine, (come l'alfa-interferone e il lipopolisaccaride), in seguito ad un fenomeno di infiammazione. Inoltre è indipendente dall'ingresso di Ca²⁺ nella cellula, in quanto ha già la calmodulina strettamente legata, quindi non ha bisogno che essa si leghi per attivarsi, ed è regolata tramite l'attivazione genica che porta all'espressione della proteina. Una volta attivata, la NOS nei macrofagi produce grandi quantità di NO per periodi prolungati. Questo NO media la distruzione di microrganismi e può indurre un danno tissutale patologico.

Inoltre le NOS costitutive generano NO in modo regolato, non continuo e a concentrazioni nanomolari, mentre la iNOS genera NO in modo continuo nel tempo e a concentrazioni che spesso raggiungono il micromolare (Hobbs A.J. et al., 1999; Clementi F. e Fumagalli G., 2004).

5.2 Effetti dell' NO

Il monossido d'azoto è un gas altamente diffusibile e reattivo e la sua formazione può essere controllata attraverso la regolazione delle NOS.

Queste ultime, infatti, presentano dei siti di fosforilazione che vengono fosforilati da diverse chinasi, come le proteine chinasi calcio/calmodulina dipendenti, cAMP dipendenti e cGMP dipendenti, e la proteina chinasi C. Una fosforilazione da parte di questi enzimi causa una riduzione dell'attività catalitica dell'enzima.

L' NO si lega al gruppo eme della guanilato ciclasi, altera la conformazione dell'enzima, attivandolo e facendo aumentare la sintesi di GMP ciclico (Fig. 30). Esso può legarsi anche al gruppo eme della NOS inibendo la sua stessa formazione con un meccanismo di inibizione a feed-back e al gruppo ferro-zolfo di altri enzimi, come la cis-aconitasi, la NADH-succinato ossidoreduttasi, la NADH-ubichinone ossidoreduttasi e la ribonucleotide reduttasi, causando un'inibizione della sintesi del DNA (Clementi F. e Fumagalli G., 2004).

Il monossido d'azoto media molteplici funzioni:

- **Vasodilatazione:** in seguito a stimolazione con Acetilcolina e altri vasodilatatori endogeni, si ha un aumento di Ca^{2+} intracellulare che porta all'attivazione della eNOS e ad un'aumentata sintesi di NO, questo, a sua volta, attiva la guanilato ciclasi con aumento della formazione di cGMP. Tale aumento determina il rilassamento della muscolatura liscia vasale con conseguente vasodilatazione e riduzione della pressione arteriosa. Questo effetto si può sfruttare anche a livello respiratorio nel trattamento dell'ipertensione polmonare,

in cui per inalazione di NO si ha una riduzione della pressione nell'arteria polmonare e un aumento dell'ossigenazione del sangue, oltre ad un effetto diretto di rilassamento della muscolatura liscia che porta ad una broncodilatazione.

- **Potente inibizione dell'aggregazione piastrinica:** a livello delle piastrine, in cui sono presenti le isoforme eNOS e iNOS, la riduzione dell'NO, causa un aumento dell'aggregazione piastrinica e ciò può portare ad un aumento degli eventi trombotici.

- **Inibizione dell'adesione dei neutrofilii all'endotelio vascolare:** l'NO inibisce l'espressione di molecole di adesione presenti sulla superficie endoteliale. Questo effetto è positivo nel trapianto d'organo in cui l'NO può agire come citoprotettivo per la riduzione di radicali liberi, per l'inibizione dell'aggregazione piastrinica e dell'adesione dei neutrofilii alla parete vascolare. Ma una concentrazione troppo elevata di NO, dovuta all'attivazione della iNOS da parte di citochine, può essere dannosa durante la fase di rigetto dell'organo. Infatti usando inibitori delle NOS si ha un aumento della sopravvivenza dell'organo trapiantato.

- **Neurotrasmettitore in neuroni NANC (non-adrenergici-non-colinergici):** le vie NANC sono responsabili dell'innervazione autonoma della muscolatura liscia gastrointestinale, di organi pelvici, delle vie respiratorie e del sistema genito-urinario, a questo livello l'NO causa rilassamento della muscolatura liscia.

- **Mediatore dell'infiammazione sia acuta che cronica:** attraverso meccanismi non ancora ben identificati, probabilmente perché favorisce l'edema e la permeabilità capillare, l'aumento di NO sembra avere un effetto dannoso sulle patologie autoimmuni e infiammatorie croniche, come l'artrite reumatoide; ciò implica che gli inibitori delle iNOS possono avere un effetto protettivo dose-dipendente. Inoltre l'NO stimola la produzione di prostaglandine infiammatorie per effetto dell'attivazione dell'isoforma inducibile della cicloossigenasi (COX2), quindi inibendo le NOS abbiamo anche un effetto antinfiammatorio diretto (Hamilton L.C. e Warner T.D., 1998).

- **Neurotrasmettitore nel SNC nei terminali nervosi pre- e post-sinaptici:** come schematizzato in figura 31, in seguito a depolarizzazione del neurone pre-

sinaptico, il glutammato viene rilasciato dalla terminazione nervosa e va ad attivare i recettori non-NMDA presenti sulla membrana del neurone post-sinaptico, inducendo depolarizzazione per ingresso di Na^+ . Inoltre la depolarizzazione consente l'ingresso di Ca^{2+} nel neurone attraverso i recettori di tipo NMDA attivati dal glutammato. L'aumento di $[\text{Ca}^{2+}]_i$ attiva la nNOS con conseguente formazione di NO, che può sia agire a livello citoplasmatico nella sede di formazione, sia diffondere nello spazio extracellulare e stimolare la guanilato ciclastasi a livello delle terminazioni nervose e della glia. Inoltre l'NO a livello pre-sinaptico ha azione facilitante il processo di fusione delle vescicole contenenti il glutammato, stimolando così un maggior rilascio di neurotrasmettitore. In questo caso l'NO agisce come un messaggero retrogrado: viene sintetizzato in siti post-sinaptici, diffonde verso il terminale pre-sinaptico e facilita il rilascio del glutammato.

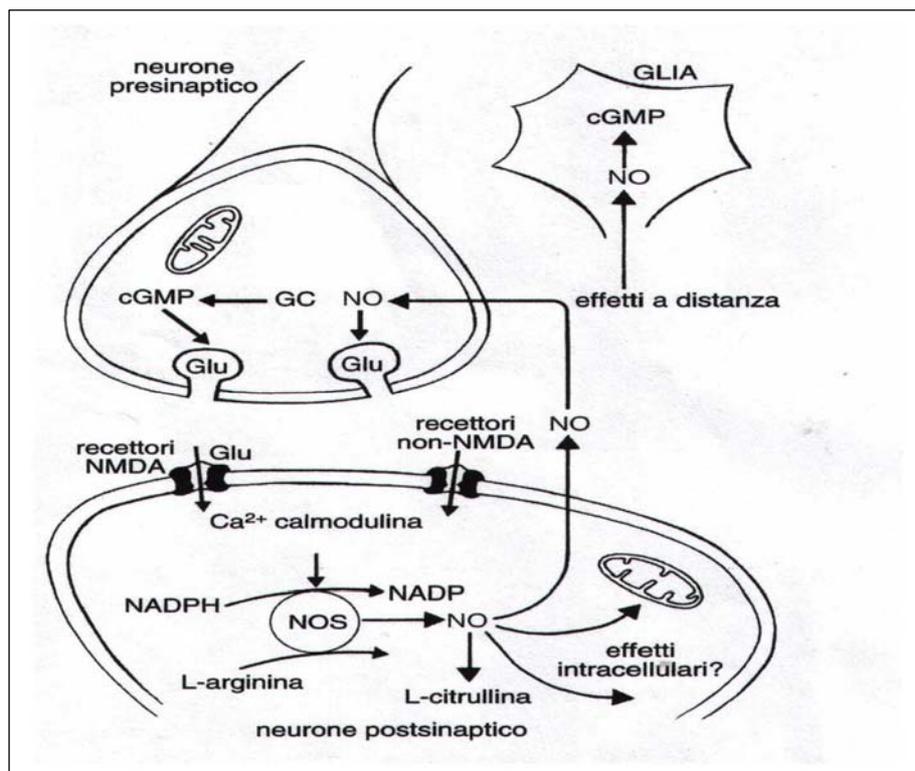


Fig. 31 *Rapporti tra neurotrasmissione eccitatoria, sintesi dell'NO e comunicazione sinaptica.*

Questi effetti derivanti dall'interazione con amminoacidi eccitatori sono alla base della "long term potentiation" sostenuta dall' NO, meccanismo strettamente correlato ai processi di apprendimento e della memoria a breve e a lungo termine (Clementi F. e Fumagalli G., 2004).

Un' eccessiva attivazione del recettore NMDA causa degenerazione neuronale, per aumento del Ca^{2+} che può attivare eccessivamente la nNOS con elevata formazione di NO e conseguente aumento di radicali liberi e di perossinitrito ($ONOO^-$). L'NO, infatti, interagisce col radicale libero superossido (O_2^-) con formazione del radicale perossinitrito ($ONOO^-$) che ha alta affinità per i gruppi sulfidrilici delle proteine e quindi inattiva molti enzimi dotati di centri ferro-zolfo, come la Calcio ATPasi che viene inibita con ulteriore aumento di Ca^{2+} , causando neurotossicità.

Dal momento che la NOS è coinvolta nella neurotossicità da attivazione del recettore NMDA, che può contribuire ai processi neurodegenerativi nelle malattie come il morbo di Alzheimer e di Huntington, usando NOS inibitori si può ridurre la neurotossicità NMDA mediata.

I bloccanti del radicale superossido come la superossido dismutasi (SOD) aumentano la potenza e la durata d'azione dell'NO. Anche il glutatione regola la quantità di NO libero o presente come perossinitrito, in quanto si lega all'NO, formando l'S-nitrosoglutatione, che può funzionare come un addotto di NO con maggiore emivita o come trasportatore di NO. Ma in questo modo si riducono i livelli di glutatione presenti nella cellula e si può determinare una citotossicità da radicali liberi, non più neutralizzati da questo antiossidante.

- **L' NO promuove la progressione del tumore e delle metastasi** mantenendo il flusso sanguigno tramite l'angiogenesi, la maturazione dei vasi e la loro dilatazione (Fig.32). Induce la proliferazione delle cellule endoteliali e la loro migrazione, il rinvigorimento delle cellule che derivano dal midollo osseo e di quelle perivascolari. Induce l'iperpermeabilità vascolare, contribuisce alla formazione del tumore nella matrice extracellulare ed incrementa l'angiogenesi e la crescita tumorali (Fukumura D. et al., 1997).

È stato dimostrato un aumento dell'espressione di eNOS ed iNOS in diversi tumori (Brennan P.A. e Moncada S., 2002), in particolare anche nel carcinoma papillare tiroideo (PTC) (Donckier J.E. et al., 2006).

La diminuzione dell'adesione dei leucociti e gli effetti citotossici dell'NO potrebbero permettere di evitare l'attacco da parte del sistema immunitario al tumore. La linfogenesi ed il mantenimento del flusso linfatico possono contribuire alla formazione di metastasi linfatiche. Inoltre, l'NO potrebbe partecipare nella sintesi di RNA e DNA nelle cellule tumorali. Inoltre l'NO stimola l'espressione di un enzima riparatore del DNA, la proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PK), che protegge le cellule sia dall'effetto tossico dell'NO stesso, sia dagli agenti dannosi per il DNA, come i raggi X e gli antitumorali, tra cui il cisplatino e la bleomicina.

D'altro canto, gli effetti citotossici dell'NO riducono i livelli di vari fattori di crescita che derivano da cellule stromali non neoplastiche, provocando, quindi, una regressione del tumore. Anche l'aggregazione piastrinica contribuisce alla formazione di metastasi, per cui la sua riduzione tramite l'NO può essere anche causa di riduzione della massa tumorale. Elevate concentrazioni di NO, dell'ordine di μM , inducono l'apoptosi in molti tipi di cellule tumorali, d'altro canto in circostanze particolari, alti livelli di NO possono risultare citoprotettivi. La citoprotezione avviene quando l'interazione dell'NO con specie dell'ossigeno parzialmente ridotte viene indirizzata verso specie meno dannose.

Si verifica un paradosso secondo cui a diverse concentrazioni l'NO può avere effetto opposto: è capace di inibire la crescita delle cellule tumorali da una parte e di permettere una migliore vascolarizzazione e una maggiore crescita del tumore dall'altra (Hirst D. e Robson T., 2007; Xu W. Et al., 2002; Tozer G.M. e Everett S.A., 1997; Sagar S.M. et al., 1995).

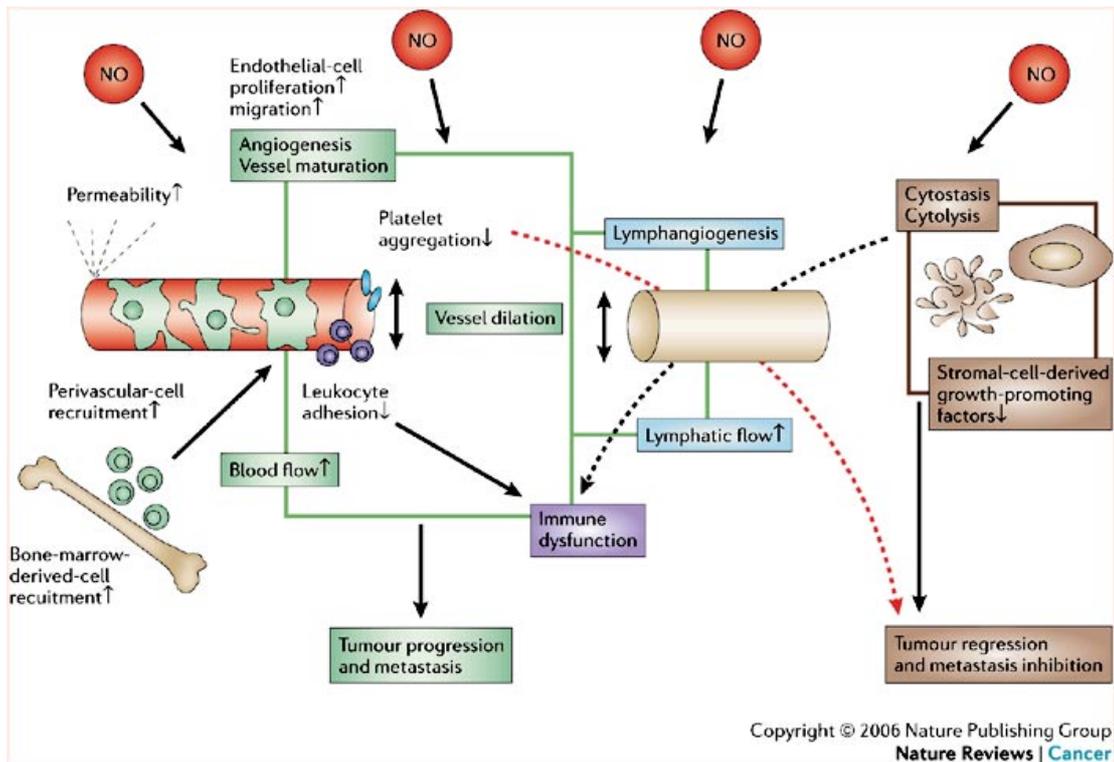


Fig. 32 Coinvolgimento dell'NO nel tumore.

5.3 Inibitori delle NOS

Sono stati progettati e sintetizzati diversi inibitori delle NOS, con l'obiettivo di contrastare gli effetti tossici prodotti dall'NO. Le ricerche di nuovi inibitori delle NOS sono tuttora in corso per migliorare la selettività su una specifica isoforma e perché spesso un composto selettivo in vitro non mostra la stessa selettività in vivo (Salerno L. et al., 2002).

Gli inibitori delle NOS si distinguono in diverse categorie di molecole che differiscono tra loro per struttura e meccanismo d'azione (Fig. 33) (Hobbs A.J. et al., 1999):

- **L-Arginina analoghi**

Sono analoghi del substrato che inibiscono l'enzima in modo competitivo. Presentano il vantaggio di penetrare nella cellula tramite i trasportatori per gli aminoacidi, avendo struttura simile alla L-arginina. I composti appartenenti a

questa classe presentano una sostituzione sull'azoto guanidinico che li rende inibitori delle NOS, mentre una sostituzione sui gruppi α -amminico o α -carbossilico li rende inattivi, sia come inibitori, sia come substrati.

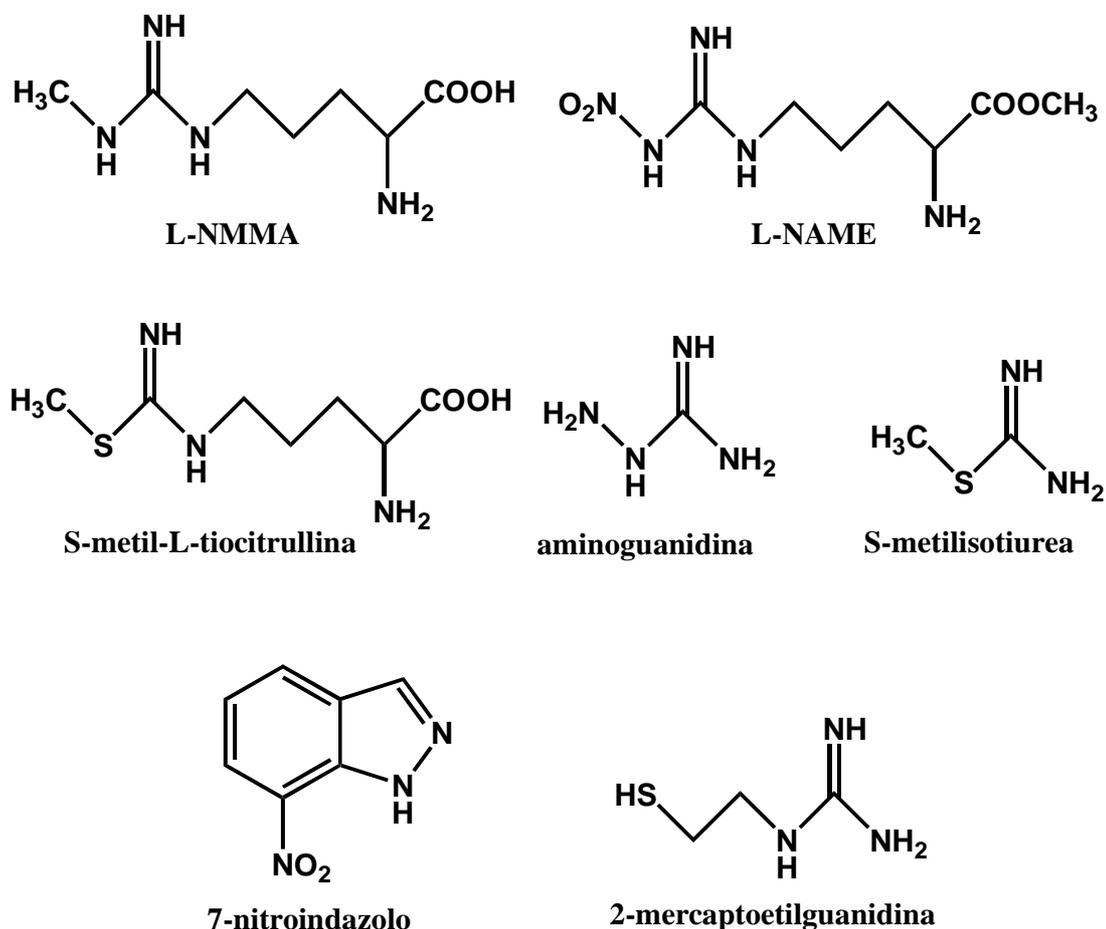


Fig. 33 *Inibitori delle NOS*

Il primo ad essere stato descritto è la N^G-metil-L-Arginina (L-NMMA) che è stato usato soprattutto per capire le azioni fisiologiche dell'NO. Essa presenta degli svantaggi in quanto il suo derivato idrossilato può causare inibizione irreversibile delle NOS oppure, in alcune cellule, può essere metabolizzata a L-arginina, annullando l'inibizione delle NOS.

Un altro analogo della L-arginina, potente inibitore delle NOS è la N^G-nitro-L-arginina (L-NA). A causa della sua scarsa solubilità è stato sintetizzato il profarmaco N^G-nitro-L-Arginina-metil estere (L-NAME), che per agire deve essere idrolizzato dalle esterasi e liberare il farmaco attivo. Esso ha risolto i problemi di solubilità della L-NA e viene usato nella ricerca sperimentale, ma non come specialità medicinale, a causa dei suoi elevati effetti collaterali.

In generale gli analoghi della L-arginina mostrano un'elevata potenza, ma una scarsa selettività di azione sulle tre isoforme delle NOS.

- **L-Citrullina analoghi:**

Sono analoghi del prodotto di reazione, come la S-metil-L-tiocitrullina, ed inibiscono la sintesi dell'NO tramite il legame al gruppo eme.

- **Composti non amminoacidici**, tra cui distinguiamo l'aminoguanidina, che in vitro si comporta da potente inibitore della iNOS, mentre in vivo, a causa delle dosi troppo elevate, è in grado di inibire anche le altre isoforme della NOS e altri enzimi contenenti centri ferro-zolfo.

A questa classe appartengono anche la S-metil-isotiourea e i suoi derivati con sostituenti diversi sullo zolfo, alcuni sono selettivi, ma non vengono usati a causa della loro scarsa permeabilità di membrana ed elevata tossicità.

Un altro inibitore non amminoacidico è il 7-nitroindazolo, che in vitro inibisce le tre isoforme enzimatiche della NOS, mentre in vivo, diventa inibitore selettivo della NOS neuronale probabilmente per un diverso reuptake cellulare. Esso si lega al gruppo eme dell'enzima in modo reversibile e altera il legame tra NOS, L-arginina e tetraidrobiopterina. Inoltre si comporta da antinocicettivo e riduce il flusso sanguigno cerebrale.

Infine in questo gruppo sono presenti i derivati mercato-alchil-guanidinici, tra cui la 2-mercaptoetilguanidina, che è selettiva per la iNOS in vitro e in vivo, quindi potrebbe essere sfruttata per contrastare il fenomeno dell'infiammazione.

Tra queste molecole è stata scelta per essere derivatizzata la L-nitroarginina che, essendo un inibitore non selettivo delle NOS può essere utilizzata per andare ad investigare l'eventuale attività antitumorale. La mancanza di selettività è

necessaria in quanto non si conosce ancora quale delle tre isoforme è realmente implicata nel meccanismo citotossico dell'NO nel tumore.

Recentemente l'L-NAME è stato saggiato in vitro, su diverse linee tumorali, mostrando attività antiproliferativa. Questi risultati sono stati confermati in vivo dalla regressione della massa tumorale, tuttavia la somministrazione periferica di questo profarmaco causa elevati effetti collaterali cardiovascolari, tra cui ipertensione e aterosclerosi, dovuti all'inibizione aspecifica delle NOS, che causa una riduzione anche dei livelli di NO necessari per le normali funzioni fisiologiche (Shang Z.-J. Et al., 2006; Hirst D. e Robson T., 2007).

Si evince la necessità di una nuova strategia che direzioni il farmaco maggiormente nelle cellule tumorali. Ciò può avvenire tramite la sintesi di un nuovo profarmaco della N-nitro-L-Arginina, il derivato galattosilato, chiamato **NAGAL**.

È ormai ampiamente riconosciuto che nelle cellule tumorali si manifesta una iper-espressione dei trasportatori per gli esosi, per far fronte alla aumentata richiesta energetica delle cellule tumorali, in continua replicazione (Smith T.A., 1999; Medina R.A. e Owen G.I. 2002).

In particolare è stato riscontrato che un singolo trasportatore specifico, il Glut1, è espresso a più alti livelli nel carcinoma tiroideo se paragonato a una varietà di forme normali o non maligne di malattie della tiroide. Il Glut1 può essere usato come marker per distinguere il carcinoma papillare, forma molto aggressiva di tumore della tiroide, rispetto a quello follicolare o ad altre malattie benigne della tiroide (Yasuda M. et al., 2005).

Le cellule tiroidee mostrano, generalmente, un aumento nel recupero del glucosio in risposta al TSH, ma l'espressione dei geni GLUTs non sembra essere significativamente influenzata dal TSH nel caso delle linee tumorali, suggerendo che il recupero del glucosio sia incrementato grazie alla localizzazione/traslocazione del Glut1, piuttosto che attraverso una iper-espressione del suo gene. Di conseguenza si ha un processo di reclutamento di

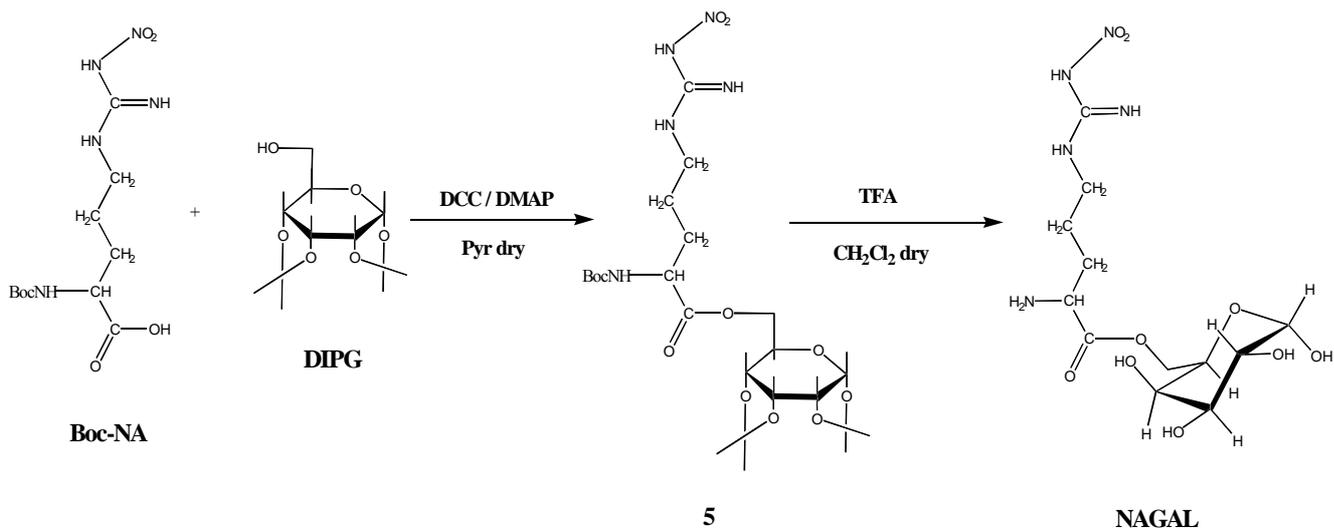
unità trasportatrici pre-esistenti, a livello della membrana cellulare (Matsuzu K. Et al., 2005).

Il profarmaco galattosilato della N-nitro-L-arginina è stato progettato per indirizzare in maniera specifica il farmaco attivo all'interno delle cellule tumorali tiroidee, data la maggiore presenza di Glut1 sulle loro membrane. La presenza del Glut1 permette un ingresso preferenziale del profarmaco nelle cellule tumorali, ottenendo un'inibizione delle NOS situate nel tessuto tumorale e non di quelle presenti in tutto l'organismo.

5.4 Sintesi chimica

Il profarmaco N-nitro-L-arginina-Galattosio, **NAGAL**, è stato preparato tramite la formazione di un legame estereo tra il gruppo carbossilico della N-nitro-L-arginina e l'ossidrile in posizione 6' del D-galattosio.

La N-(terz-butilossicarbonile)-N^o-(NO₂)-L-Arginina (Boc-NA) è stata trattata con 1,2,3,4-di-O-isopropylidene- α -D-galattopiranosio (DIPG) in piridina anidra, in presenza di dicicloesilcarbodiimmide (DCC) come agente condensante e di dimetilamminopiridina (DMAP) come catalizzatore, per ottenere l'estere **5** che, per deprotezione con acido trifluoroacetico (TFA) in diclorometano anidro, dà origine alla 6'-O-N^o-(NO₂)-L-Arginina-galattopiranoside **NAGAL** (Schema 4).



Schema 4 Sintesi del NAGAL.

5.5 Stabilità in vitro

Come è stato fatto per il profarmaco GALDA, anche per il NAGAL sono state misurate la stabilità chimica e quella enzimatica in vitro, per poter confermare l'ideoneità della molecola prescelta all'utilizzo come profarmaco.

Per valutare la stabilità chimica, una quantità nota di NAGAL è stata solubilizzata in una soluzione tampone fosfato a pH 7.4 e tenuta in ambiente termostato a 37°C sotto costante agitazione, in modo da riprodurre una situazione quanto più simile a quella fisiologica. Ad intervalli di tempo stabiliti sono state determinate le concentrazioni di profarmaco e farmaco, tramite elettroforesi capillare. I risultati ottenuti sono mostrati nella tabella 4, si evince un'emivita chimica di circa due ore.

La stabilità enzimatica è stata studiata in campioni di plasma fortificati con quantità note di NAGAL e tenuti sotto costante agitazione a 37°C. Ad intervalli prefissati un'aliquota di questi campioni è stata prelevata e sottoposta ad elettroforesi capillare. Anche in questo caso è stato ottenuto un valore di emivita plasmatica di circa due ore, i risultati sono riassunti nella tabella 5.

Tabella 4 Stabilità chimica

Tempo (h)	Recupero % NAGAL	Recupero % nitroarginina
0	100.00	0
1	70.07	28.43
3	36.70	54.75
4	26.95	64.08
24	0	100

$t_{1/2}$ NAGAL = 1.8 h

Tabella 5 Stabilità enzimatica

Tempo (h)	Recupero % NAGAL	Recupero % nitroarginina
0	100.00	0
0.5	85.92	21.29
1	72.65	32.51
1.5	61.00	42.03
2	50.17	47.91
3	38.62	67.05
24	0	100.00

$t_{1/2}$ NAGAL = 1.8h

Dopo circa due ore in entrambi gli esperimenti la quantità di NAGAL diminuisce del 50%, generando una quantità di L-nitroarginina equivalente e scomparendo del tutto dopo 24 ore. I dati relativi alle due stabilità evidenziano una stabilità chimica non elevata, che dà un'idea di come utilizzare il composto durante i successivi esperimenti, sciogliendolo al momento del test, per evitare che

si degradi prima della somministrazione. La stabilità enzimatica risulta essere buona e rende il NAGAL un buon candidato per le successive analisi in vitro.

5.6 Test di vitalità cellulare

E' stata valutata l'attività anti-proliferativa del NAGAL e dell'L-NAME su tireociti umani tumorali RO82.

La presenza di galattosio nella molecola del NAGAL dovrebbe favorire la penetrazione del farmaco all'interno della cellula, incrementando l'azione antiproliferativa della nitroarginina. Tale attività viene confrontata con quella dell'L-NAME, che ha già mostrato un'azione antitumorale in vitro, ma che possiede un elevato numero di effetti collaterali periferici, a causa della sua scarsa selettività nei confronti delle NOS.

I tireociti umani tumorali RO82, coltivati secondo le procedure descritte nella parte sperimentale, sono stati messi in contatto con NAGAL e L-NAME ad una concentrazione di 10 mM e 15 mM a tempi di 2 - 4 - 24 e 48 ore.

La loro vitalità è stata studiata mediante il saggio dell'MTT, che prevede la valutazione della vitalità e della proliferazione cellulare mediante la misurazione dell'attività dell'enzima deidrogenasi mitocondriale. In breve, la quantificazione dell'attività della deidrogenasi mitocondriale viene valutata considerando la conversione del sale solubile di tetrazolio (MTT, incolore) nel suo corrispondente prodotto, il formazano (colorato). La valutazione quantitativa della conversione del sale nella sua forma colorata è stata effettuata spettrofotometricamente. I livelli di conversione del substrato sono quindi proporzionali all'attività enzimatica la quale, a sua volta, rappresenta un marker della vitalità e proliferazione cellulare.

In fig. 34 e 36 sono riportati i dati di vitalità cellulare a vari tempi e con le diverse concentrazioni di NAGAL e di L-NAME.

Le figure 35 e 37 mostrano, invece, immagini al microscopio ottico delle

cellule in seguito agli esperimenti effettuati. È chiaramente visibile come il NAGAL causi un aumento della mortalità cellulare.

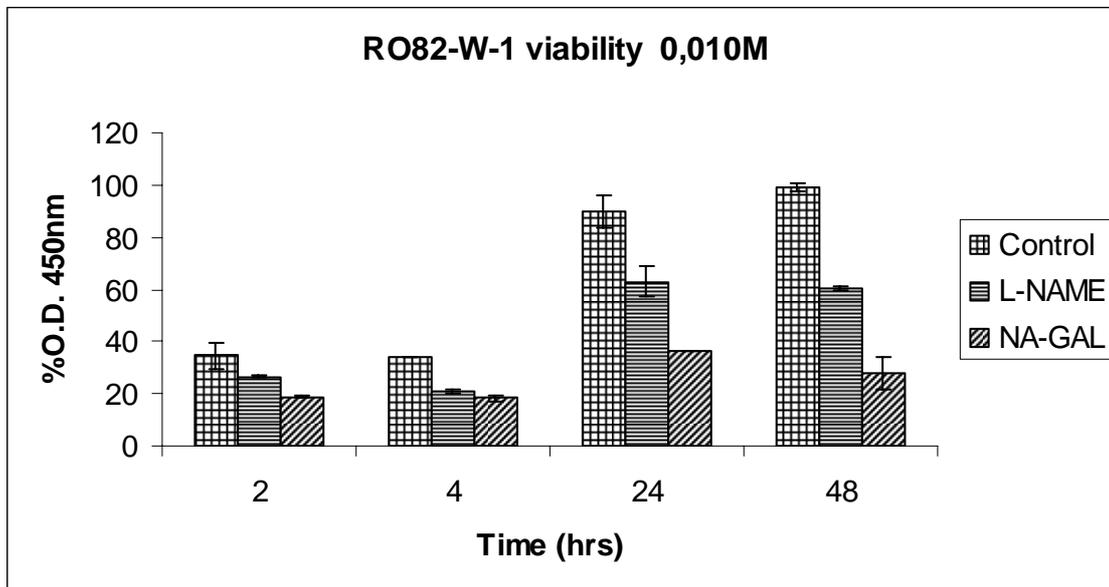


Fig.34 Grafico di proliferazione delle cellule RO82 con concentrazione 10 mM di NA-GAL e di L-NAME.

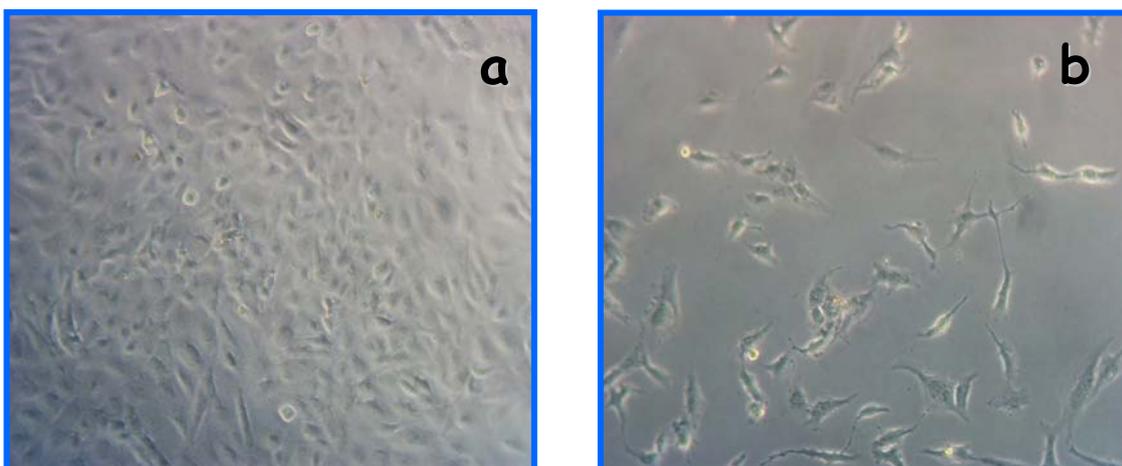


Fig. 35 Tireociti RO82 incubati con L-NAME (a) e NAGAL (b) alla dose 10 mM per 48 ore. Magnification 10X.

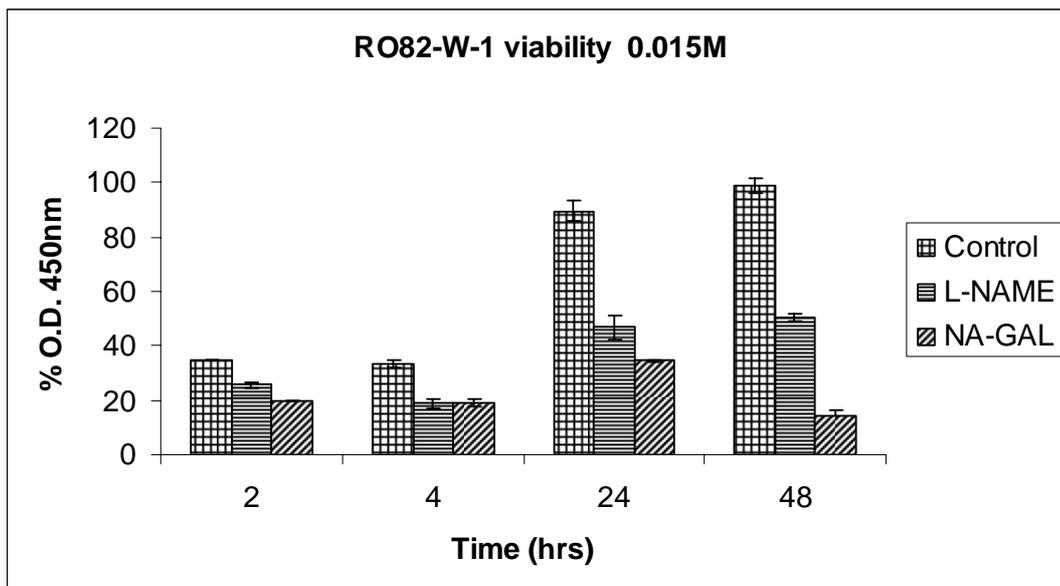


Fig. 36 Grafico di proliferazione delle cellule RO82 con concentrazione 15 mM di NA-GAL e di L-NAME

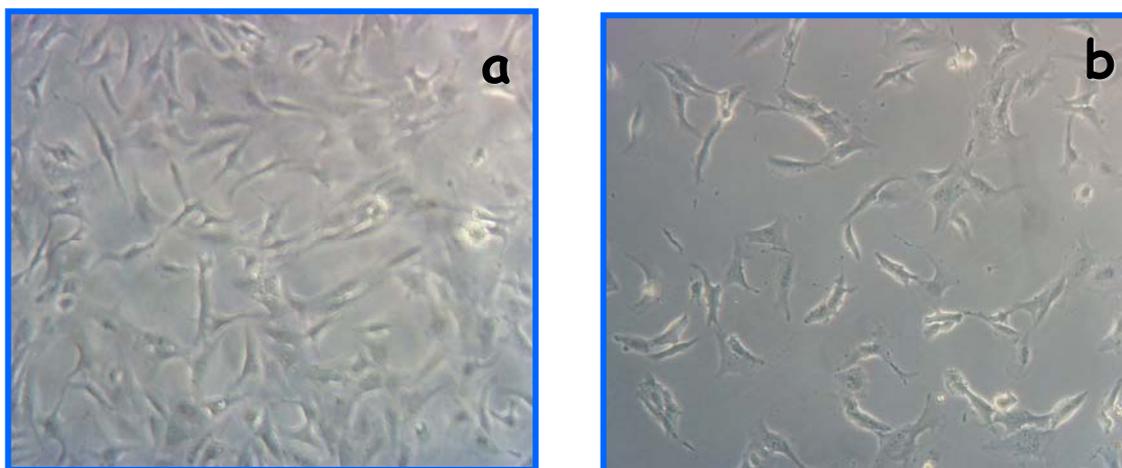


Fig. 37 Tireociti RO82 incubati con L-NAME (a) e NAGAL (b) alla dose 15 mM per 48 ore. Magnification 10X.

Dai risultati ottenuti si evince che è possibile monitorare, con certezza, l'attività antiproliferativa dei farmaci dopo 24 ore e ciò concorda con i tempi di duplicazione delle RO82, che hanno un ciclo di duplicazione di circa 15-20 ore. Infatti dopo 2 e 4 ore non viene rilevata alcuna differenza significativa tra le cellule

tumoriali trattate con il NAGAL o con L-NAME, ed inoltre la vitalità cellulare non è modificata rispetto al controllo, escludendo un'azione tossica diretta dei due profarmaci. Dopo le 24 ore è possibile vedere l'attività antiproliferativa, in quanto le cellule, che dovrebbero replicarsi e quindi aumentare di numero, vanno incontro a morte.

Il profarmaco NAGAL ha un'attività maggiore rispetto all'L-NAME e che persiste nel tempo, dimostrando che il NAGAL è in grado di penetrare nelle cellule e di liberare gradualmente la nitroarginina.

5.7 Dosaggio della L-nitroarginina

Per verificare l'effettivo attraversamento della membrana plasmatica da parte del NAGAL, ed il conseguente aumento della quantità di farmaco attivo derivante dalla sua idrolisi, è stato effettuato il dosaggio del profarmaco come tale e della L-nitroarginina rilasciata all'interno delle cellule.

Le cellule RO82 sono state incubate con L-NAME, usato anche stavolta come riferimento, e con NAGAL, ad una concentrazione di 10 mM, per 2, 4 e 24 h. In seguito è stato allontanato il terreno di coltura e le cellule sono state lisate e centrifugate; il supernatante è stato analizzato all'HPLC/MS.

La figura 38 mostra il dosaggio dei due profarmaci NAGAL ed L-NAME all'interno delle cellule trattate. È possibile vedere come per tutti gli intervalli di tempo presi in esame la quantità di L-NAME è sempre significativamente maggiore rispetto a quella di NAGAL.

Probabilmente ciò è dovuto all'ingresso dell'L-NAME nella cellula per diffusione passiva, meccanismo non saturabile. Il NAGAL, invece, entra nella cellula per diffusione facilitata, sfruttando il carrier Glut1 che si può saturare, impedendo un ingresso incondizionato della molecola nella cellula, caratteristico dell'L-NAME.

La quantità di NAGAL intracellulare, inoltre, dopo un picco iniziale tende a diminuire, sia perché ne entra di meno, sia perché quello che entra libera il farmaco attivo e quindi si sottrae al dosaggio.

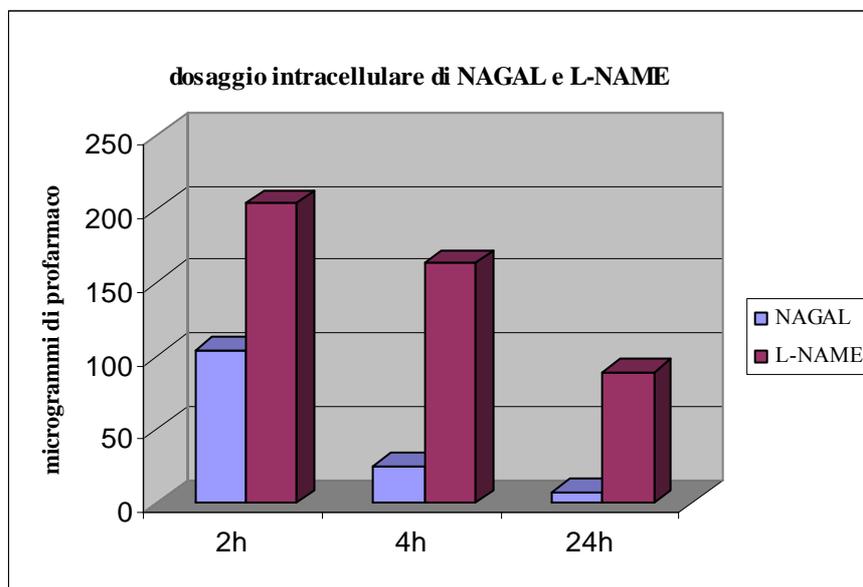


Fig. 38 *Dosaggio di NAGAL ed L-NAME nelle cellule RO82.*

Nella figura 39 è mostrato il dosaggio della nitroarginina liberatasi in seguito al trattamento con i due profarmaci. In questo caso è significativo il risultato dopo 2 ore, in cui il livello di nitroarginina derivante dal NAGAL è molto maggiore rispetto a quella liberata dall'L-NAME.

Quindi, anche se il NAGAL intracellulare è in quantità inferiore, libera più farmaco attivo ed è probabilmente questo il motivo per il quale l'attività antiproliferativa del NAGAL è maggiore di quella dell'L-NAME.

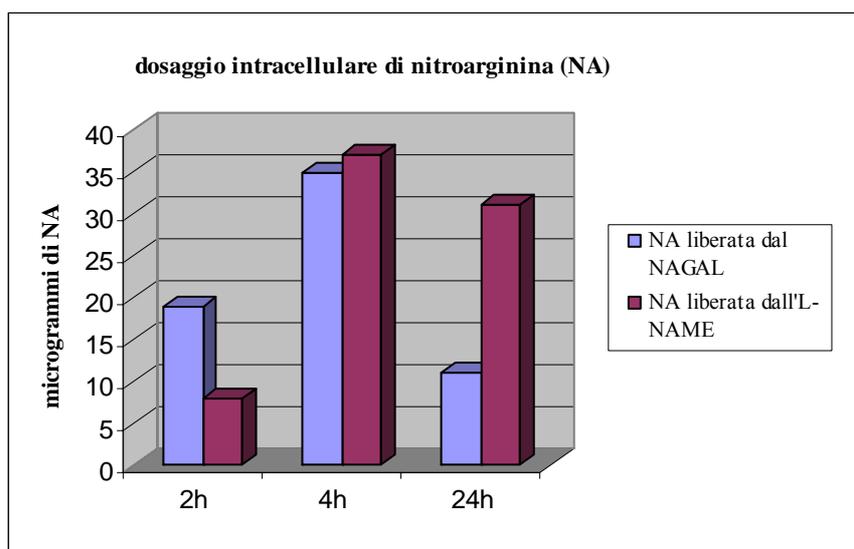


Fig. 39 *Dosaggio di nitroarginina dopo trattamento con NAGAL ed L-NAME, nelle cellule RO82.*

5.8 Conclusioni sul NAGAL

Dai risultati ottenuti si può concludere che l'approccio del profarmaco può essere utilizzato per incrementare l'attività antiproliferativa della nitroarginina. Il NAGAL ha mostrato la capacità di aumentare il rilascio di farmaco attivo nelle cellule tumorali, rispetto all'L-NAME. L'incremento della concentrazione intracellulare di nitroarginina è, inoltre, responsabile dell'aumentata attività antitumorale del NAGAL.

Ulteriori studi sono necessari per approfondire i meccanismi con cui avviene l'azione antiproliferativa e se la morte cellulare sia causata da necrosi o apoptosi. Inoltre sono in corso esperimenti in vivo, su ratti che esprimono il tumore tiroideo, per confermare l'attività antitumorale e verificare la minore incidenza di effetti collaterali. In seguito sono previsti dosaggi del profarmaco come tale e del suo derivato attivo nelle zone in cui si sviluppa il tumore, per confermare l'effettivo direccionamento preferenziale del NAGAL nelle cellule tumorali.

6. CONCLUSIONI

In conclusione questa tesi dimostra la validità dell'approccio del profarmaco, sia utilizzando come vettore il galattosio, per sfruttare il carrier Glut1 ed ottenere un direzionamento del farmaco attivo, sia aumentando la lipofilia del composto di partenza per incrementare la permeabilità di membrana.

Sono state fornite valide strategie per il trattamento di alcuni disordini neuropsichiatrici, caratterizzati da carenze di neurotrasmettitori in specifiche aree cerebrali, come l'ADHD. Il possibile impiego di profarmaci anche nella terapia antitumorale, a tutt'oggi associata ad elevati effetti collaterali, può rappresentare un valido approccio.

Tutte le sintesi progettate sono il risultato di un lavoro di perfezionamento dei vari steps di reazione, al termine del quale ogni reazione ha mostrato una resa elevata ed adeguati tempi di lavorazione. La caratterizzazione di ogni composto finale ha permesso di stabilire l'entità univoca della molecola e la sua purezza.

L'approccio del profarmaco può risultare particolarmente interessante per le aziende farmaceutiche, in quanto progettare e sintetizzare dei profarmaci per eliminare determinate caratteristiche negative di molecole già note, può permettere il lancio sul mercato farmaceutico di prodotti validi e con costi limitati. Infatti essendo il farmaco attivo già noto vengono ridotti i tempi della ricerca del meccanismo di azione e della tossicità, in quanto sarà sufficiente dimostrare che il profarmaco come tale è inattivo ed in vivo rilascia esclusivamente il farmaco voluto, ovvero che la molecola in questione risponde a tutte le caratteristiche necessarie per essere definita "profarmaco".

7. PARTE SPERIMENTALE

7.1 Sintesi Chimica

I prodotti utilizzati per la sintesi, sono stati acquistati dal catalogo Sigma-Aldrich. L'andamento delle reazioni e la purezza dei prodotti sono stati monitorati mediante cromatografia su strato sottile TLC, impiegando lastre di gel di silice su supporto di alluminio 60F254 della Merck. Le macchie su TLC sono state evidenziate con lampade UV, per esposizione ai vapori di iodio e ninidrina. La purificazione dei composti intermedi e di quelli finali è stata ottenuta con cromatografia su gel di silice (Aldrich 230-400 mesh), oppure con cromatografia flash H12i Biotage su colonne preimpaccate (Flash Si). I prodotti sono stati caratterizzati mediante spettrometria NMR ^1H e ^{13}C utilizzando uno spettrometro Varian Mercury 400. Gli spettri di massa sono stati effettuati con uno spettrometro Applied Biosystem API 2000, equipaggiato con una sorgente ESI. I punti di fusione sono stati determinati con un sistema Buchi Melting Point B-540.

Sintesi dell'1,2,3,4-diisopropilidene- α -D-galattopiranoside-6-O-succinil estere (1)

Ad una soluzione di 1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D-galattosio (DIPG) (1g; 3.94 mmol) in piridina anidra (10 mL) è stata aggiunta 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (30 mg; 0.25 mmol) ed anidride succinica (800 mg; 8 mmol).

La miscela è stata tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 12 ore, a temperatura ambiente. Dopo evaporazione sotto vuoto del solvente di reazione, il residuo oleoso ottenuto è stato ripartito tra cloroformio e acqua distillata. La fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio anidro (Na₂SO₄), filtrata ed evaporata sotto vuoto, ottenendo 1.4g del prodotto **1**, come solido bianco, con una resa del 98%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.50-1.45-1.26-1.25 (4s, 12H, chetali); 2.65 (m, 4H, -COCH₂-CH₂CO-); 4.00 (m, 1H, 4-H); 4.2 (m, 2H, 5-H e 6-H); 4.3 (m, 1H, 2-H); 4.6 (m, 1H, 3-H); 5.5 (d, 1H, 1-H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 25.3, 26.2, 26.7, 26.8 (4CH₃-chetali); 28.8 (-COCH₂CH₂CO-); 29.9 (-COCH₂CH₂CO-); 63.4 (C6'); 66.3 (C4'); 70.6 (C5'); 71.0 (C2'); 71.3 (C3'); 96.2 (C1'); 109.4, 112.4 (2C- chetali); 171.0, 175.0 (2C, CO).

Sintesi del Diacetone 6-O-[N-(3,4-diidrossifenilettil)-succinamil]- α,β -D-galattopiranoside (2)

Ad una soluzione costituita dal prodotto **1** (1g; 2.78 mmol), DMAP (17 mg; 0.14 mmol) ed N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (EDC) (532 mg; 2.78 mmol) in diclorometano anidro, viene aggiunta la dopamina (530 mg; 2.78 mmol), sciolta in piridina anidra, goccia a goccia per 30 minuti. La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 12 ore, a temperatura ambiente, ed in condizioni anidre. Dopo l'evaporazione sotto vuoto del solvente di reazione, il residuo ottenuto viene ripartito tra cloroformio ed acqua distillata. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄, filtrata ed evaporata sotto vuoto, ottenendo un residuo che è stato sottoposto a flash cromatografia su gel di silice, eluendo con cloroformio. Si ottengono 850 mg del prodotto **2** come solido bianco, con una resa del 62%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.2, 1.25, 1.35, 1.45 (4s, 12H, chetali); 2.4 (m, 2H, -COCH₂CH₂CO-); 2.6 (m, 4H, -COCH₂CH₂CO- e 7-H); 3.4 (m, 2H, 8-H); 4 (m, 1H, 4'-H); 4.2 (m, 3H, 5'-H e 6'-H); 4.3 (m, 1H, 2'-H); 4.65 (m, 1H, 3'-H); 5.5 (m, 1H, 1'-H); 6.3 (s, 1H, NH); 6.55 (d, 1H, 6-H); 6.7 (s, 1H, 2-H); 6.8 (d, 1H, 5-H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 25.2, 26.2, 26.7, 26.8 (4CH₃-chetali); 29 (-COCH₂CH₂CO-); 30 (-COCH₂CH₂CO-); 34 (C7); 41 (C8); 67.2 (C6'); 72.4 (C4'); 76.6 (C5'); 79.7 (C2'); 81.8 (C3'); 105.1 (C1'); 109.4, 112.3 (2C-chetali); 115 (C2); 115.5 (C5); 120 (C6); 130 (C1); 142.5 (C4); 143.5 (C3); 172, 173 (2C, CO).

Sintesi del 6-O-[N-(3,4-diidrossifenilettil)-succinamil]- α,β -Dgalattopiranosio (GALDA)

Ad una soluzione del composto **2** (900 mg; 1.81 mmol) in diclorometano anidro (10 mL), viene aggiunto acido trifluoroacetico (TFA) (5 mL), e la miscela viene tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 48 ore a temperatura ambiente. Dopo l'evaporazione del solvente di reazione, il residuo ottenuto viene sottoposto a cromatografia su colonna con silice disattivata, eluendo con cloroformio in gradiente di metanolo. Si ottengono 440 mg del prodotto finale **GALDA** come solido bianco, con un resa del 58%. P.f. 138-140 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (D_2O): δ 2.40 (s, 2H, $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$); 2.60 (m, 4H, 7-H e $-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$); 3.4 (m, 2H, 8-H); 3.5-4.6 (m, 6H, 4'-H, 6'-H, 5'-H, 2'-H, 3'-H); 5.2 (m, 1H, 1'-H); 6.28 (s, 1H, -NH); 6.57 (d, 1H, 6-H); 6.72 (s, 1H, 2-H); 6.81 (d, 1H, 5-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): δ 30 ($-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$); 31 ($-\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$); 34 (C-7); 41 (C-8); 64 (C-6'); 70 (C-4'); 71 (C-5'); 73 (C-2'); 75 (C-3'); 94 e 99 (C-1'); 115 (C-2); 116.5 (C-5); 121 (C-6); 131 (C-1); 144.5 (C-4); 146.5 (C-3); 172.5 e 173 (2C, CO).

MS (EI) m/z: 416 (M^+).

Sintesi del D-Aspartato Dietil Estere (DEE)

Ad una soluzione di D-Aspartato (5.55 g; 0.042 mol) in etanolo (90 mL) viene aggiunto a goccia a goccia cloruro di tionile (SOCl₂) (15 mL, d=1.631 g/mL; 0.207 mol), a 0°C. La reazione viene tenuta per 12 ore sotto agitazione elettromagnetica, a temperatura ambiente, in condizioni anidre. Al termine della reazione si allontana il solvente per evaporazione sotto vuoto e si aggiunge HCl 0.1 N (2 mL), per ottenere il prodotto come cloridrato. Dalla precipitazione con etere etilico si ottengono 8,9 grammi di **DEE** come sale cloridrato, come solido bianco. **Resa:** 95%

¹H-NMR (D₂O): δ 1.10 (t, 6H, -CH₃); 3.0 (m, 2H, 3-H); 4.10 (m, 4H, -CH₂); 4.20 (m, 1H, 2-H).

¹³C-NMR (D₂O): δ 13.3 (2CH₃); 34 (3C); 49.3 (2C); 63-64 (2CH₂); 169 (1-CO); 171.3 (4-CO).

MS (EI) m/z: 189 (M⁺).

Sintesi del Diacetone 6'-O-(Boc-D-aspartato-4-benzil)-D-galattopiranoside (3)

L'acido Boc-(4-benzil)-D-aspartico (Boc-D-Asp-(OBzl)-OH) (870 mg; 2.7 mmol) viene sciolto in diclorometano anidro e si aggiungono N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodimide cloridrato (EDC) (568 mg; 3 mmol), DMAP (17 mg; 0.14 mmol) e 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D-galattopiranosio (DIPG) (700 mg; 2.7 mmol). Si mantiene la reazione per 12 ore sotto agitazione elettromagnetica, a temperatura ambiente, in condizioni anidre. Si allontana il solvente sotto pressione e si esegue un'estrazione H₂O/Acetato, la fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Si purifica il grezzo di reazione mediante cromatografia su colonna con gel di silice, utilizzando cloroformio come eluente. Si ottengono 760 mg dell'estere **3** come olio incolore con una resa del 50 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.22, 1.39, 1.41 (3s, 12H, chetali); 1.38 (1s, 9H, Boc); 2.9 (m, 2H, 3-H); 3.9 (m, 1H, 4'-H); 4.19 (m, 2H, 5'-H e 2'-H); 4.25 (m, 2H, 6'-H); 4.3 (m, 1H, 3'-H); 4.6 (t, 1H, 2-H); 5.1 (s, 2H, -CH₂); 5.45 (m, 1H, 1'-H); 5.55 (d, 1H, -NH); 7.3 (s, 5H, Ph).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 25.2, 25.5, 25.6, 26.0 (4CH₃-chetali); 28.2 (3CH₃-Boc); 37 (C3); 50 (C2); 64.0 (C6'); 66.0 (C4'); 67 (CH₂-Ph); 70.5 (C5'); 71.0 (C2'); 71.5 (C3'); 80.0 (C-Boc); 96.5 (C1'); 109.0, 110.0 (2C-chetali); 128.5 (C4); 129 (4C-Ph); 136 (C1); 156 (CO-Boc); 171.1 (2C, CO).

Diacetone 6'-O-(Boc-D-aspartato)-D-galattopiranoside (4)

760 mg del composto **3** (1.34 mmol) vengono sottoposti a idrogenazione su C/Pd al 10 % , per circa 2,5 ore a 2 atm. Il grezzo di reazione viene filtrato su celite, in modo da allontanare il catalizzatore, e portato a secco. In seguito a lavaggi con esano vengono ottenuti 475 mg di prodotto **4**, come solido bianco, con una resa del 75 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.3, 1.5 (2s, 12H, chetali); 1.4 (1s, 9H, Boc); 2.9 (m, 2H, 3-H); 4.0 (m, 1H, 4'-H); 4.2 (m, 2H, 6'-H); 4.3 (m, 1H, 5'-H); 4.39 (m, 1H, 2'-H); 4.41 (m, 1H, 3'-H) 4.6 (t, 1H, 2-H); 5.3 (m, 1H, 1'-H); 5.55 (d, 1H, -NH).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 24.2, 25.0, 25.9, 26.0 (4CH₃-chetali); 28.0 (3CH₃-Boc); 37 (C3); 50 (C2); 64.0 (C6'); 66.0 (C4'); 70.5 (C5'); 71.0 (C2'); 71.5 (C3'); 80.5 (C-Boc); 96.5 (C1'); 109.0, 110.0 (2C-chetali); 156 (CO-Boc); 171 (1-CO); 175 (4-CO).

D-Aspartato-galattosio (GALASPA)

475 mg di composto **4** (1.0 mmol) si sciolgono in 5mL di diclorometano anidro e si aggiungono 4 mL di acido trifluoroacetico (TFA). La reazione viene lasciata 12 ore sotto agitazione elettromagnetica. Al termine della reazione si allontana il TFA, mediante riscaldamento, ed il diclorometano sotto pressione. In seguito a lavaggi con etere etilico si ottengono 240 mg di **GALASPA**, come solido bianco, con una resa dell' 81 %. P.f. 113-115 °C.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 3.45 (m, 2H, b); 3.80 (m, 1H, 4'-H); 3.95 (m, 1H, 5'-H); 4.15 (m, 2H, 6'-H); 4.30 (m, 1H, 2'-H); 4.40 (m, 1H, 3'-H); 4.45 (m, 1H, a); 5.45 (m, 1H, 1'-H).

¹³C-NMR (D₂O): δ 34 (b); 49.3 (a); 65.5 (C-6'); 68 (C-4'); 70 (C-5'); 73.1 (C-2'); 74.9 (C-3'); 92 e 98 (C-1'); 169 (1-CO); 171.3 (4-CO).

MS (EI) m/z: 296 (M⁺).

Diacetone 6'-O-[N-(Boc)-N^o-(NO₂)-Arginina]- α,β -D-galattopiranoside (5)

La N-(Boc)-N^o-(NO₂)-Arginina (1 g; 3.13 mmol) viene attivata in presenza di 4-dimetilamminopiridina (DMAP) (0.02 g; 0.16 mmol) e dicioesilcarbodiimmide (DCC) (1g; 4.46 mmol) per 15 minuti, in 10 mL di piridina anidra. Viene poi aggiunto l'1,2,3,4-di-O-isopropilidene- α -D-galattopiranosio (0.820 g; 3.13 mmol) e la miscela viene lasciata sotto agitazione magnetica per 24 ore a temperatura ambiente. La soluzione viene quindi portata a secco sotto vuoto. Il residuo è ripreso con acetato di etile, in modo tale da far precipitare la DCC come DCU, che viene allontanata per filtrazione e si effettua un'estrazione con H₂O. La fase organica viene anidrificata con Na₂SO₄ anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Il residuo ottenuto viene purificato con una cromatografia flash su gel di silice usando come eluente il CHCl₃; si ottengono 1.25 g di prodotto **5** puro come solido bianco, con una resa del 69% .

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.30,1.31,1.40,1.41 (4s, 12H, chetali); 1.35 (s, 9H, Boc); 1.65 (m, 2H, 4-H); 1.81 (m,2H, 3-H); 3.20 (m,2H,5-H); 3.90 (m, 1H, 4'-H); 4.11 (m,1H, 5'-H); 4.14 (m, 2H, 6'-H); 4.25 (m, 1H, 2-H); 4.37 (m,1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 5.40 (m,1H, 1'- H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 13.5 (2CH₃-2''); 18 and 20 (4CH₃-Ketals); 25 (CH₃-6''); 25.4 (CH₃-7''); 25.5 (CH₃-4''); 26.6 (C-4); 28.9 (3CH₃-Boc); 29.2 (C-3); 33.9 (C-3''); 41.5 (C-5); 44 (C-2); 65 (C-6'); 66.7 (C-4'); 71 (C-5'); 71.5 (C-2'); 72 (C-3'); 81 (C-Boc); 86.5 (C-2''); 97 (C-1'); 109 and 111(C-Ketals); 117.4 (C-7''); 125 (C-3''a); 132.8 (C-4''); 133.4 (C-6''); 138.9 (C-5''); 156 (C-7''a); 159.1 (C-6); 170 (CO-Boc); 172.5 (CO).

N^ω-NO₂-Arginina-D- Galatto-6'-il estere (NAGAL)

Il composto **5** (1.25 g; 2.16 mmol) viene trattato con acido trifluoroacetico (TFA) (7.5 mL) in diclorometano anidro (25 mL) e lasciato sotto agitazione magnetica a temperatura ambiente per 72 ore. Si allontana il TFA per riscaldamento e si porta a secco sotto vuoto. Sul residuo vengono effettuati lavaggi con etere e diclorometano ottenendo così 0.62 g di prodotto **NAGAL** puro, come solido bianco, con una resa del 75 %. P.f. 126-128 °C.

¹H-NMR (D₂O): δ 1.75 (m, 2H, 4-H); 2.00 (m, 2H, 3-H); 3.30 (m, 2H, 5-H); 3.80 (m, 1H, 4'-H); 3.95 (m, 1H, 5'-H); 4.15 (m, 2H, 6'-H); 4.30 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 2-H) 5.20 (m, 1H, 3'-H); 5.45 (m, 1H, 1'-H).

¹³C-NMR (D₂O): δ 25.2 (C-4); 28.8 (C-3); 41.7 (C-5); 55.6 (C-2); 65.5 (C-6'); 68 (C-4'); 70 (C-5'); 73.1 (C-2'); 74.9 (C-3'); 94 and 99 (C-1'); 157 (C-6); 170 (CO).

MS (EI) m/z: 382 (M⁺).

7.2 Stabilità chimica ed enzimatica

I saggi di stabilità chimica ed enzimatica sono stati eseguiti mediante elettroforesi capillare (CE).

L'analisi CE è stata condotta con un apparecchio 3DCE (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) dotato di un rivelatore DAD (diode array detector). Il capillare utilizzato è un capillare di silice non rivestito di 50 cm × 50 µm di diametro interno.

Per l'analisi CE è stato utilizzato come eluente un tampone fosfato preparato con acqua bidistillata, il cui pH è stato aggiustato con acido fosforico diluito. L'acetonitrile (Merck) e l'acido fosforico concentrato (Merck) sono di grado HPLC. La soluzione di cloruro di sodio allo 0.9 % è di marca Eurospital.

Il plasma umano è stato fornito dal laboratorio dell'Ospedale Civile di Sassari. Tutti gli altri prodotti chimici utilizzati per l'analisi sono reagenti di grado analitico ottenuti da fonti commerciali.

Preparazione delle soluzioni standard dei profarmaci

Le soluzioni standard dei profarmaci e dei rispettivi "parent drug" sono state preparate con acqua bidistillata e conservate a 4°C. L'acqua deionizzata e bidistillata è stata preparata con un apparecchio Milli Q System (Millipore). Le successive diluizioni sono state preparate a partire dalle soluzioni standard e conservate alla stessa temperatura.

Stabilità chimica ed enzimatica dei profarmaci

Le soluzioni di profarmaci per le prove di stabilità chimica ed enzimatica, sono state preparate solubilizzando un'aliquota del composto rispettivamente nel tampone fosfato a pH 7.4 e nel plasma. La soluzione viene tenuta sotto costante agitazione in un bagno termostato a 37°C, in modo da riprodurre una situazione tanto più simile a quella fisiologica. Ad intervalli regolari vengono effettuate le analisi CE per valutarne la stabilità, dosando la quantità di profarmaco e di "parent

drug” recuperati, per confronto con le soluzioni standard precedentemente preparate. I campioni di plasma (1 mL), prima di essere analizzati, vengono estratti con acetonitrile, il rapporto plasma/acetonitrile è di 1:2. Le miscele ottenute sono vortexate e centrifugate per 15 min a 3000 giri/min per favorire la precipitazione delle proteine. Il surnatante è stato portato a secco sotto azoto e ripreso con 1 ml di acqua per l’analisi CE.

Prove di stabilità in vitro del GALDA

La separazione elettroforetica è stata condotta utilizzando come eluente un tampone fosfato 100mM a pH 2.5. Il voltaggio applicato è di 30 Kvolt. L’iniezione viene eseguita applicando una pressione di 50 mbar per 10 secondi. Il rivelatore DAD è stato programmato ad una lunghezza d’onda di 200 nm. I tempi di migrazione (t_M) ottenuti sono di 6 minuti per la dopamina e di 25 minuti per il GALDA.

Prove di stabilità in vitro del NAGAL

La separazione elettroforetica è stata condotta utilizzando come eluente un tampone fosfato 100mM a pH 2.9. Il voltaggio applicato è di 30 Kvolt. L’iniezione viene eseguita applicando una pressione di 50 mbar per 10 secondi. Il rivelatore DAD è stato programmato ad una lunghezza d’onda di 264 nm. I tempi di migrazione (t_M) ottenuti sono di 5 minuti per il NAGAL e di 16 minuti per la Nitroarginina.

7.3 Dosaggio istochimico del galattosio nel cervello

I ratti NHE e NRB sono stati trattati, tramite iniezione intraperitoneale, con 100 mg/kg di GALDA (n=20) o solo con soluzione salina (n=5), come controllo, tra le 9:00 e le 11:00 a.m. Ad intervalli di tempo prestabiliti di 0, 0.5, 1.5, 3 e 6 ore dopo l'iniezione i cervelli sono stati fissati con formaldeide al 4% in PBS (Posphate Buffered Saline), utilizzando 5 ratti per gruppo.

I cervelli sono stati crioprotetti in saccarosio 18% e congelati in ghiaccio secco. Criosezioni dello spessore di 50 µm sono state analizzate con lo scopo di individuare i residui di galattosio usando una lectina biotinilata galattosio-specifica (Bandeiraea Simplicifolia isolectin B4; 1:100 in PBS tutta la notte). I siti di legame specifici sono stati rivelati usando un sistema ABC (vettore) e DAB (diaminobenzidina) come cromogeno.

La densità ottica relativa (ROD) dello striato è stata misurata con un microscopio ottico; le misure densitometriche sono state effettuate usando un basso ingrandimento (0.5X obj).

Si verifica un aumento dei siti di legame del galattosio nello striato, in seguito all'iniezione del GALDA.

7.4 Dosaggio del GALDA in omogenati cerebrali

Dopo l'iniezione i.p. del GALDA (100mg/kg) il cervello dei ratti NHE e NRB (n=5) è stato isolato e trattato mediante la tecnica della "capillary depletion" (Triguero et al 1990; Terasaki et al 1991). Due ore dopo l'iniezione l'animale è stato anestetizzato ed un campione di sangue prelevato intracardialmente. Il campione di sangue, a cui è stato aggiunto dell'EDTA 0.1M, è stato centrifugato a 13000 giri per 10 minuti ed il plasma è stato utilizzato per l'analisi successiva.

Successivamente l'animale è stato trattato con 10mL di tampone fosfato (PB), per rimuovere i globuli rossi dal parenchima cerebrale, ed il cervello prelevato. Esso è stato ulteriormente sezionato in corteccia prefrontale, striato e cervelletto. I campioni sono stati omogenati in 1mL di PB in ghiaccio secco in una Eppendorf e centrifugati a 4500g a 4°C per 15min. Il supernatante è stato utilizzato per l'analisi.

E' stato precedentemente dimostrato che, mentre l'omogenato contiene materiale costituito da componenti del parenchima vascolari e non-vascolari, il supernatante è per il 95% privo dei componenti vascolari, mentre il pellet è costituito dai microvasi cerebrali (Triguero 1990).

I diversi campioni ottenuti sono stati analizzati in un HPLC accoppiato ad uno Spettrometro di massa. È stato usato un apparato LC/MSD Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) serie 1100, equipaggiato con un iniettore Rheodyne da 20 µL, un rivelatore DAD (diode array detector) direttamente accoppiato alla sorgente ESI (Electrospray Ionisation). L'azoto è usato come gas nebulizzante. Per ottenere la massima intensità del segnale è stata condotta un'analisi SIM ("Selected ion monitoring") (SIM) in corrispondenza dei picchi 398 m/z, per il GALDA e 254 m/z, per il suo primo prodotto d'idrolisi, la dopamina succinata. Il picco corrisponde allo ione molecolare protonato di ogni analita. La colonna analitica è una Luna® C18 (250mm ×4.6 i.d., 5µm) dalla Phenomenex, collegata ad una precolonna (cartridge 2.1mm×12.5 mm). La temperatura della colonna è di 25°C. Il tempo totale della corsa cromatografia è di 10 min. I tempi di ritenzione sono: 6.4 minuti, per la dopamina succinata e 7.8 minuti, per il GALDA. Le quantità del composto in esame sono state determinate per confronto con standards esterni.

Il programma del gradiente utilizzato è mostrato nella Tabella 6.

Tabella 6 Programma del gradiente

Time(min)	Acetonitrile (fase mobile A, %)	Acido formico 0.1% (fase mobile B, %)
0.00	35	65
5.00	35	65
5.01	40	60
7.00	40	60
7.01	60	40

7.5 Dosaggio della dopamina in omogenati cerebrali

Ratti maschi adulti delle linee NHE e NRB sono stati trattati con il GALDA 100mg/kg, via i.p., (n=4) o con soluzione salina (n=8). Due ore dopo l'iniezione intraperitoneale gli animali sono stati sacrificati e il cervello sezionato in due diverse aree: il neostriato (NS) ed il mesencefalo ventrale (MES). Sono state pesate le aree del cervello con una precisione di 0.1 mg, omogeneizzate in 1.8% di acido tricloroacetico (3ml/g di tessuto) e centrifugate a 13000 giri per 10 min.

Il supernatante (20 µl) è stato iniettato in un HPLC dotato di una colonna a fase inversa (BAS MF-6213) e di un rivelatore elettrochimico (+650mV vs Ag/AgCl; BAS LC-4B) per quantificare la dopamina. L'elettrodo è stato regolato ad un potenziale di +650mV vs Ag/AgCl. L'eluente è costituito da: 50 mM NaH₂PO₄, 5mM Na₂HPO₄, 0.1mM Na₂EDTA, 0.5mM SOS, 15% metanolo, a pH 5.5 ; la velocità di flusso è di 0.8ml/min. Il segnale amperometrico è stato acquisito su un PC attraverso un convertitore analogico digitale connesso ad una porta parallela (basata sul chip ADS-7818 della Texas Instruments). I dati sono stati acquisiti ed analizzati attraverso un software personalizzato scritto con il LabView (National instruments). La quantità di dopamina, in ciascun cromatogramma, è

stata calcolata misurando l'area del picco corrispondente (tempo di eluizione di 3.6min), confrontandola con lo standard esterno.

7.6 Saggi comportamentali su ratti NHE

Sono stati utilizzati ratti maschi NHE e NRB come controllo. Gli esperimenti sono stati condotti su animali dell'età di 55-60 giorni. I ratti vengono allevati in gabbia a due a due in condizioni standard con un ciclo artificiale di luce-buio 12:12 (LD cycle). La luce resta accesa tra le 6 a.m. e le 6 p.m.

Il GALDA è stato sciolto in soluzione salina (NaCl 0.9%). Un gruppo di controllo è stato trattato solo con galattosio per verificare la presenza di eventuali effetti comportamentali causati dallo zucchero rilasciato dal profarmaco. Le somministrazioni sono state fatte intraperitoneali (i.p.) tra le 9:00 e le 11:00 a.m. Nella Tabella 7 sono schematizzate le dosi somministrate, in ogni gruppo, costituito da 5 esemplari, i ratti sono stati selezionati casualmente.

Tabella 7

		NHE	NRB
Galattosio (controllo)	5 mg/kg	N=5	n= 5
	50 mg/kg	N=5	n= 5
GALDA	10 mg/kg	N=5	n= 5
	100 mg/kg	N=5	n= 5

Gli animali vengono studiati monitorando l'attività locomotoria e l'attenzione non-selettiva entro 3 ore dall'iniezione, i test vengono eseguiti in condizioni di doppio cieco.

Il sistema sperimentale è costituito da un Låt-maze (“labirinto di Låt”) costruito in base alle dimensioni dei ratti. Esso consiste in un box di legno quadrato (60x60x40) che contiene al centro un box più piccolo di plastica trasparente (40x40x30). Ai ratti viene permesso di esplorare il corridoio formatosi (60 cm di lunghezza, 15 cm di larghezza, 40 cm di altezza). Due di tali box sono posti in una camera insonorizzata, ognuno di essi è illuminato da una lampada bianca 4W, collocata 60 cm sopra la base, al centro del coperchio di legno.

I ratti vengono introdotti nel Låt-maze per un test di 30 minuti. Il test viene condotto dall’inizio della fase di luce del “LD cycle” e due membri della stessa gabbia vengono osservati contemporaneamente per minimizzare le interferenze con la nuova condizione. Il comportamento viene monitorato con una videocamera ad alta risoluzione e registrato su una videocassetta, per analizzare off-line l’esperimento. Le variabili comportamentali osservate, la frequenza dei “corner crossing” e la frequenza e la durata dei “rearings”, vengono misurati visivamente in blocchi di 3 minuti. L’attendibilità dei dati è abbastanza elevata ($r=0.914$; $df=98$; $p<0.001$).

7.7 Saggi comportamentali su topi C57BL/6

Sono stati utilizzati topi C57BL/6 e topi Swiss albini come controllo. Gli esperimenti sono stati condotti su giovani maschi adulti con età compresa tra 60 e 90 giorni. I topi vengono allevati in gabbia a due a due in condizioni standard con un ciclo artificiale di luce-buio 12:12 (LD cycle). La luce resta accesa tra le 7 a.m. e le 7 p.m.

Il GALDA è stato sciolto in soluzione salina (NaCl 0.9%) ed è stato testato alle dosi di 10 mg/kg e 100 mg/kg. Un gruppo di controllo è stato trattato solo con galattosio per testarne gli eventuali effetti comportamentali. I topi sono trattati con iniezioni i.p. tra le 9:00 e le 11:00 a.m. Nella Tabella 8 sono schematizzate le dosi somministrate, i gruppi sono stati formati in maniera casuale.

Tabella 8

		C57BL6	Swiss
Galattosio (controllo)	5 mg/kg	n=5	n= 5
	50 mg/kg	n=5	n= 5
GALDA	10 mg/kg	n=5	n= 5
	100 mg/kg	n=5	n= 5

Il sistema sperimentale è costituito da un Låt-maze, costruito in base alle dimensioni dei topi. Esso consiste in un box di legno quadrato (30x30x20) che contiene al centro un box più piccolo di plastica trasparente (20x15x15). I topi esplorano il corridoio (30 cm di lunghezza, 15 cm di larghezza, 20 cm di altezza). Vengono eseguite le stesse procedure usate per gli esperimenti sui ratti NHE e NRB, monitorando i topi entro 3 ore dall'iniezione, per un test di 30 minuti.

7.8 Saggi comportamentali sul DEE

Sono stati utilizzati ratti prepuberi (29 gg) NHE e NRB come controllo. Vengono allevati in gabbia a due a due in condizioni standard con un ciclo artificiale di luce-buio 12:12 (LD cycle). La luce resta accesa tra le 6 a.m. e le 6 p.m.

I ratti sono stati trattati per 17 giorni con D-aspartato 0.5 M, con DEE·HCl 0.5 M o con soluzione salina, con iniezioni i.p. tra le 9:00 e le 11:00 a.m. Ogni gruppo è costituito da 5 esemplari ed i ratti sono stati selezionati casualmente. La tabella 9 riassume i composti testati e i gruppi di animali formati. I composti testati sono stati sciolti in soluzione salina (NaCl 0.9%).

Tabella 9		
	NHE	NRB
controllo	n=5	n=5
D-Asp 0.5 M	n=5	n=5
DEE·HCl 0.5 M	n=5	n=5

Un'ora dopo la 15° iniezione i ratti sono stati esposti al Låt maze per 10 minuti, valutando gli stessi parametri usati per il profarmaco GALDA, analizzando il comportamento in differita.

Simili procedure sono state utilizzate per analizzare il comportamento dei ratti nel labirinto ad otto bracci di Olton, al quale sono stati esposti per 10 minuti, un'ora dopo la 17° iniezione.

7.9 Test di vitalità cellulare sul NAGAL

È stata utilizzata la linea cellulare RO82-W-1 (Banca cellulare e culture in GMP-IST Genova), costituita da cellule umane tumorali della tiroide provenienti da carcinoma-follicolare.

Le cellule sono state poste in terreno di coltura con D-MEM (Dulbecco's modified Eagle Medium, GIBCO), F-12 (Ham nutrient mixture, GIBCO), MCDB 105 medium (Sigma) in rapporto di 2:1:1, 10 % FBS (Fetal bovin serum, GIBCO), 2mM di L-Glutamine, 1% di penicillina- streptomycina.

La linea cellulare è stata incubata a 37°C con il 5% di CO₂. Le RO82 hanno una tempo di duplicazione di circa 18-20 ore.

Tali cellule vengono messe a contatto con NAGAL e L-NAME, disciolti in soluzione salina (NaCl 0.9%), ad una concentrazione di 10 mM e 15 mM a tempi

di 2 - 4 - 24 e 48 ore, per valutare l'attività antiproliferativa di questi composti, attraverso il test di vitalità cellulare MTT-wst8.

L'MTT (Mytocondrial Tetrazolium salt Test) test prevede la valutazione della vitalità e della proliferazione cellulare mediante la misurazione dell'attività dell'enzima deidrogenasi mitocondriale. È stato usato il WST-8 test messo a punto dalla Dojindo (Japan), che rappresenta una variante del metodo MTT.

L'attività della deidrogenasi mitocondriale viene quantizzata mediante la conversione del sale solubile di tetrazolio (MTT, incolore) in formazano (colorato). Si effettuano misure spettroscopiche, valutando l'assorbimento a 450 nm e correggendo la lettura con il valore di assorbimento a 600 nm (turbidimetria). Dai valori di assorbanza si ricava l'entità dell'attività enzimatica, proporzionale alla vitalità ed alla proliferazione cellulare.

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato e ne è stata calcolata la deviazione standard.

Alla fine di tali esperimenti le cellule sono state visualizzate direttamente in piastra, senza essere fissate, utilizzando un microscopio ottico rovesciato NIKON TE 2000-S, a contrasto di fase, con ingrandimento 10X. Le immagini sono state acquisite con fotocamera NIKON Digital Sight DS-L.

7.10 Dosaggio della L-nitroarginina

Le cellule RO82 sono state incubate con NAGAL e con L-NAME, come riferimento, ad una concentrazione di 10 mM, per 30 min, 2 h e 24 h. Una volta allontanato il terreno di coltura, vengono poste per 2 ore a 4°C a contatto con il RIPA (RadioImmuno Precipitation Assay) buffer, un tampone costituito dal Twin 20, usato come detergente per permettere la rottura della membrana plasmatica, Tris-HCl, un tampone a pH 7.4, che serve ad impedire la denaturazione proteica, e NaCl per prevenire l'aggregazione proteica non specifica, con aggiunta di una combinazione di inibitori delle proteasi per evitare la degradazione proteica. In

questo modo si ottiene un lisato che viene centrifugato a 15000 giri/min per 20 minuti a 4°C, ed il supernatante è analizzato all'HPLC/MS.

La separazione cromatografia è stata effettuata con un sistema LC Agilent 1100, che include una pompa binaria, un Diode-Array Detector (DAD), colonna termostata, degassatore ed autocampionatore HTS-PAL (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La colonna HPLC è una HP HILIC (2.1 x 150 mm, 3 µm) della Alltech (Deerfield, IL, USA) con una precolonna. Una soluzione 100 mM di formiato d'ammonio con lo 0.2 % di acido acetico è stata preparata come fase mobile A, mentre la fase mobile B è acetonitrile. La velocità di flusso è stata settata a 0.3 mL/min e la temperatura della colonna a 38 °C. E' stato usato un gradiente lineare per la separazione, con il 5 % di fase A da 0 a 3 minuti, poi da 5 a 40 % di fase A da 3 a 18 minuti (Tabella 9). Il tempo totale della corsa è di 21 minuti.

Tabella 9 Programma di gradiente

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	5	95
3	5	95
18	40	60

Lo spettrometro di massa è un Agilent G1946 (MSD 1100) a singolo quadrupolo, equipaggiato con una sorgente ESI (Electrospray Atmospheric Pressure Ionization), usata col potenziale positivo. Lo spettrometro è stato programmato per accettare ioni positivi con rapporto massa/carica (m/z) di 404 (NAGAL + Na), 234 (L-NAME) e 220-242 (nitroarginina), in modalità SIM (Selected Ion Monitoring). Il potenziale di ionizzazione è 3100 mV. Dopo ottimizzazione i parametri del nebulizzatore sono stati così settati: Temperatura: 350°C, pressione Neb 45 psi e velocità del flusso del gas drying 10 L/min. I dati analitici sono stati acquisiti con una Agilent ChemStation HP A.10.02.

Bibliografia

Abbott J.N. e Romero I.A., “Transporting therapeutics across the blood-brain barrier”, *Mol Med Today*, Marzo 1996, pp.106-113.

Baldwin S.A., “Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins” *Biochim Biophys Acta* 1993, **1154**, pp 17-49

Battaglia G., La Russa M., Bruno V., Arenare L., Ippolito R., Copani A., Bonina F. P. e Nicoletti F., “Systemically administered D-glucose conjugates of 7-chlorokynurenic acid are centrally available and exert anticonvulsant activity in rodents” *Brain Res* 2000, **860**, pp.149-156.

Begley D.J., “The Blood-brain Barrier: Principles for Targeting Peptides and Drugs to the Central Nervous System”, *J Pharm Pharmacol*, 1996, **48**, pp. 136-146.

Begley D.J., “Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities”, *Pharmacol Ther*, 2004, **104**, pp. 29-45.

Bonina F.P., Arenare L., Palagiano F., Saija A., Nava F., Trombetta D. e de Caprariis P., “synthesis, stability and pharmacological evaluation of nipecotic acid prodrugs”, *J Pharm Sci*, 1999, **88**, pp.561-567.

Bonina F.P., Arenare L., Ippolito. R., Boatto G., Battaglia G., Bruno V. e de Caprariis P., “Synthesis, phamacokinetics and anticonvulsant activity of 7-chlorokynurenic acid prodrugs”, *Int J Pharm*, 2000, **202**, pp. 79-88.

Bonina F.P., Puglia C., Rimoli M.G., Melisi D., Boatto G., Nieddu M., Calignano A., La Rana G., e de Caprariis P., “Glycosyl derivatives of dopamine and L-dopa as anti-parkinson prodrugs: Synthesis, pharmacological activity and in vitro stability studies” *J Drug Target*, 2003, **1**, pp.25-36.

Brennan P.A. e Moncada S., “From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer” *Ann R Coll Surg Engl*, 2002, **84**(2), pp. 75-78.

Cabib S., Puglisi-Allegra S. e Ventura R., “The contribution of comparative studies in inbred strains of mice to the understanding of the hyperactive phenotype”, *Behav Brain Res*, 2002, **130**, pp. 103–109.

Clementi F. e Fumagalli G., “Farmacologia generale e molecolare”, III ed., 2004, UTET , Torino.

Dalpiaz A., Filosa R., De Caprariis P., Conte G., Bortolotti F., Biondi C., Scatturin A., Prasad P.D., Pavan B., “Molecular mechanism involved in the transport of a prodrug dopamine glycosyl conjugate”, *Int J Pharm*, 2007, **336**, pp.133-139.

D’Aniello A., “D-aspartic acid: an endogenous amino acid with an important neuroendocrine role” *Brain Res Rev*, 2007, **53**, pp.215-34.

D’Aniello A., Lee J.M., Petrucelli L. e Di Fione M.M., “Regional decreases of free D-aspartate levels in Alzheimer’s disease”, *Neurosci Lett*, 1998, **250**, pp.131-134.

Donckier E. J., Michel L., Delos M., Havaux X. e Van Beneden R., “Interrelated overexpression of endothelial and inducible nitric oxide synthase, endothelin-1 and angiogenic factors in human papillary thyroid carcinoma”, *Clin Endocrinol*, 2006, **64**, pp. 703-710.

Fernandez C., Nieto O., Rivas E., Montenegro G., Fontenla J.A. e Fernandez-Mayoralas A., “Synthesis and biological studies of glycosyl dopamine derivatives as potential antiparkinsonian agents”, *Carbohydr Res*, 2000, **327**, pp.353-365.

Fuchs S.A., Berger R., Klomp L.W.J. e de Konig T.J., “D-Amino acids in the central nervous system in health and disease”, *Mol Genet Metab*, 2005, **85**, pp. 168-180.

Fukumura D., Yuan F., Endo M. e Jain R.K., “Role of Nitric Oxide in tumor microcirculation”, *Am J Pathol*, 1997, **150**, pp. 713-725.

Goodman & Gilman, “Le Basi Farmacologiche della Terapia”, IX ed., 1997, McGraw-Hill, Milano.

Hamilton L.C. e Warner T.D., “Interactions between inducible isoforms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in vivo; investigation using the selective inhibitors 1400W and celecoxib”, *Br J Pharmacol*, 1998, **125**, pp. 335-340.

Hirst D. e Robson T., “Targeting nitric oxide for cancer therapy”, *J Pharm Pharmacol*, 2007, **59**, pp. 3-13.

Hobbs A.J., Higgs A. e Moncada S., “Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target”, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, **39**, pp. 191-220.

Katzung B.G., *Farmacologia generale e clinica*, IV ed., 2000, Piccin, Padova.

Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, “Membrane transporters as Drug Targets”, edited by Amidon and Sadée.

Knowles R.G. e Moncada S., “Nitric Oxide Synthases in mammals”, *Biochem J*, 1994, **298**, pp. 249-258.

Löscher W. e Potschka H. “Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases”, *Progr in Neurobiol*, 2005, **76**, pp. 22–76.

Manfredini S., Pavan B., Vertuani S., Scaglianti M., Compagnone D., Biondi C., Scatturin A., Tanganelli S., Ferraro L., Prasad P. e Dalpiaz A., “Design, synthesis and activity of ascorbic acid prodrugs of nipecotic, kinurenic and diclophenamic acids, liable to increase neurotropic activity”, *J Med Chem*, 2002, **45**, pp.559-562.

Matsuzu K., Segade F., Wong M., Clark O.H., Perrier N.D. e Bowden D.W., “Glucose Transporters in the Thyroid”, *Thyroid*, 2005, **15**(6), pp. 545-550.

Medina R.A. e Owen G.I., “Glucose transporters: expression, regulation and cancer”, *Biol Res*, 2002, **35**(1), pp.9-26.

Mueckler M., “Facilitative glucose transporters”, *Eur J Biochem*, 1994, **219**, pp. 713-725

Nishizaki T., Kammesheidt A., Sumikawa K., Asada T. e Okada Y., “A sodium and energy-dependent glucose transporter with similarities to SGLT1-2 is expressed in bovine cortical vessels”, *Neurosci Res*, 1995, **22**, pp. 13-22.

Osculati F., “XV Corso avanzato in Chimica Farmaceutica e Seminario Nazionale per Dottorandi “E.Duranti”, Urbino, 3-7 Luglio 1995.

Pardridge W.M., “Targeting neurotherapeutic agents through the Blood-Brain Barrier”, *Arch Neurol*, 2002, **59**, pp.35-40.

Ruocco L.A., Viggiano D., Viggiano A., Abignente E., Rimoli M.G., Melisi D., Curcio A., Nieddu M., Boatto G., Carboni E., Gironi Carnevale U.A. e Sadile

A.G., “Galactosilated dopamine enters into the brain, blocks mesocorticolimbic system and modulates activity and scanning time in naples high excitability rats”, *Neuroscience*, 2007 (A), in press.

Ruocco L.A., Viggiano D., Pignatelli M., Iannaccone T., Rimoli M.G., Melisi D., Curcio A., De Lucia S., Carboni E., Gironi Carnevale U.A., de Caprariis P., Sadile A.G., “Galactosilated dopamine increases attention without reducing activity in C57BL/6 mice”, *Behav Brain Res*, 2007 (B), in press.

Sadile A.G., Pellicano M.P., Sagvolden T. e Sergeant J.A, “NMDA and non-NMDA sensitive [L-³H]glutamate receptor binding in the brain of the Naples high- and low- exitability rats: an audiographic study” *Behav Brain Res*, 1996, **78**, pp. 163-174.

Sagar S.M., Singh G., Hodson I.D. e Whitton A.C., “Nitric oxide and anti-cancer therapy”, *Cancer Treat Rev*, 1995, **21**, pp. 159-181.

Salerno L., Sorrenti V., Digiacoimo C., Romeo G. e Siracusa M.A., “Progress in the Development of Selective Nitric Oxide Synthase (NOS) Inhibitors”, *Curr Pharm Des*, 2002, **8**, pp. 177-200.

Shang Z.J., Li Z.B., Li J.R., “In vitro effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on oral squamous cell carcinoma : a preliminary study”, *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2006, **35**, pp. 539-543.

Smith T.A., “Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue”, *Br J Biomed Sci*, 1999, **56**(4), pp. 285-292.

Solanto M.V., “Neuropsychopharmacological mechanisms of stimulant drug action in attention-deficit hyperactivity disorder: a review and integration”, *Behav Brain Res*, 1998, **94**, pp. 127-152.

Stanczak A. e Ferra A., “Prodrugs and soft drugs”, *Pharmacol Rep*, 2006, **58**, pp. 599-613.

Swanson J.M., Sergeant J.A., Taylor E., Sonuga-Barke E.J.S., Jensen P.S., Cantwellet D.P., “Attention Deficit Hyperactivity Disorder and Hyperkinetic Disorder”, *Lancet*, 1998, **351**, pp. 429-433.

Terasaki T., Deguchi Y., Sato H., Hiral K., Tsuji A., “In vivo transport of a dynorphin-like analgesic peptide, E-2078, through the blood-brain barrier: an application of brain microdialysis”, *Pharm Res*, 1991, **8**, pp. 815-820.

Tozer G.M. e Everett S.A., “Nitric oxide in tumour biology and cancer therapy. Part 2: therapeutic implications”, *Clin Oncol*, 1997, **9**, pp. 357-364.

Triguero D., Buciak J., Pardridge W.M., “Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins”, *J Neurochem*, 1990, **54**, pp. 1882-1888.

Tsukaguchi H., Tokui T., Mackenzie B., Berger U.V., Chen X.-Z., Wang Y., Brubaker R.F. e Hediger M.A., “A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters”, *Nature*, 1999, **399**, pp.70-75.

Uhrig R.K., Picard M.A., Beyreuther K. e Wiessler M., “Synthesis of antioxidative and anti-inflammatory drugs glucoconjugates”, *Carbohydr Res*, 2000, **325**, pp.72-80.

Wermuth C.G., “Le applicazioni della chimica farmaceutica”, 2000, EdiSES, Napoli.

Wolburg H., Neuhaus J., Kniesel U., Krauß B., Schmid E.M., Öcalan M., Farrell C. e Risau W., “Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells: effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes”, *J Cell Sci*, 1994, **107**, pp. 1347-1357.

Wolfe S.L., “Introduzione alla biologia cellulare e molecolare”, IX ed., 2000, EdiSES, Napoli.

XU W., Liu L.Z., Loizidou M., Ahmed M. e Charles I.G., “The role of nitric oxide in cancer”, *Cell Res*, 2002, **12**(5-6), pp. 311-320.

Yasuda M., Ogane N., Hayashi H., Kameda Y., Miyagi Y., Iida T., Mori Y., Tsukinoki K., Minematsu T. e Osamura Y., “Glucose transporter-1 expression in the thyroid gland: clinicopathological significance for papillary carcinoma”, *Oncol Rep*, 2005, **14**, pp. 1499-1504.