

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI**  
**"FEDERICO II"**



**FACOLTA' DI FARMACIA**

**DOTTORATO DI RICERCA**

**IN**

**SCIENZA DEL FARMACO**

**XXIV CICLO**

**Il Galattosio: un valido vettore per la progettazione di  
nuovi profarmaci con un migliore profilo  
farmacocinetico e farmacologico**

Coordinatore:

Ch.ma Prof.ssa

Maria Valeria D'Auria

**Tutor:**

**Ch.ma Prof.ssa**

**Maria Grazia Rimoli**

**Candidata:**

**Dott.ssa**

**Elvira Luongo**

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
1.1 Il profarmaco .....	6
1.2 Meccanismo di trasporto cellulare.....	15
1.3 Gli zuccheri.....	19
<b>2. SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>29</b>
<b>3. RISULTATI.....</b>	<b>32</b>
3.1 Profarmaci degli anti-infiammatori .....	32
3.1.1 Introduzione : i FANS .....	32
3.1.2 Profarmaci di anti-infiammatori.....	46
3.1.3 Ketogal .....	49
3.1.3.1 Sintesi.....	49
3.1.3.2 Stabilità chimica ed enzimatica .....	51
3.1.3.3 Ulcerogenicità .....	53
3.1.3.4 Dati farmacocinetici.....	54
3.1.3.5 Attività analgesica.....	57
3.1.3.6 Attività anti-infiammatoria .....	59

3.1.3.7 Tossicità stomaco, fegato e reni.....	61
3.1.4 Flugal.....	64
3.1.4.1 Sintesi.....	64
3.1.4.2 Stabilità chimica ed enzimatica .....	66
3.1.4.3 Ulcerogenicità .....	67
3.1.4.4 Attività anti-infiammatoria .....	68
3.1.5 Okigal.....	69
3.1.5.1 Sintesi.....	69
3.1.5.2 Stabilità chimica ed enzimatica dell'Okigal .....	71
3.1.5.3 Ulcerogenicità dell'Okigal.....	72
3.1.5.4 Attività anti-infiammatoria dell'Okigal.....	73
3.1.6 Ibugal.....	74
3.1.6.1 Sintesi.....	74
3.1.6.2 Stabilità chimica ed enzimatica dell'Ibugal.....	76
3.1.7 Conclusione sui profarmaci galattosilati dei FANS.....	77
3.2 Peagal.....	79
3.2.1 Introduzione : la Palmitoiletanolamide .....	79
3.2.2 Sintesi.....	84

3.2.3 Stabilità chimica ed enzimatica di Peagal.....	87
3.2.4 Attività citoprotettiva di Peagal .....	88
3.2.5 Conclusioni sulla Peagal .....	91
3.3 Nagal.....	92
3.3.1 Introduzione: Nitro-arginina .....	92
3.3.2 Sintesi.....	105
3.3.3. Stabilità in vitro.....	107
3.3.4 Attività analgesica.....	109
3.3.5 Allodinia meccanica.....	110
3.3.6 Effetto anti-nocicettivo del Nagal associato alla presenza del trasportatore GLUT3 .....	112
3.3.7 Conclusioni sul Nagal .....	115
<b>4. CONCLUSIONI.....</b>	<b>116</b>
<b>5. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>118</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>140</b>

# 1. INTRODUZIONE

Negli ultimi dieci anni, la tecnologia del profarmaco è stata largamente studiata e sfruttata dall'industria farmaceutica. La distinzione tra nuovi analoghi e profarmaci è che i primi sono biologicamente attivi, i secondi richiedono una conversione *in vivo* per ottenere un'attività biologica. Inoltre, mentre il primo scopo dei nuovi analoghi è incrementare la potenza e ottenere la specificità di azione, i profarmaci sono sviluppati per superare le barriere farmaceutiche e farmacocinetiche nell'applicazione clinica del farmaco, compresi tossicità, instabilità chimica, basso assorbimento, mancanza di specificità del sito d'azione e bassa *compliance* del paziente. Inoltre, il più grande vantaggio del profarmaco è che essi sono più facili da sintetizzare rispetto ad un nuovo analogo e la loro efficacia è più facilmente prevedibile rispetto a nuovi composti. Effettivamente grazie alla loro conversione metabolica non alterano la struttura primaria del *parent drug*, ed hanno una più alta probabilità di diventare attivi rispetto ad un nuovo analogo.

Lo sviluppo di moderni profarmaci si basa sulla coniugazione di gruppi chimici o *carriers* al farmaco che sarà eventualmente rilasciato direttamente nel sito d'azione.

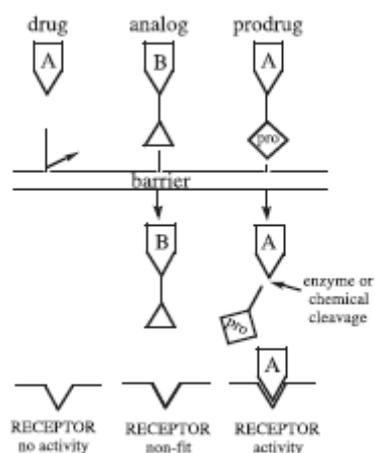
Sono state studiate un grande numero di combinazioni tra farmaci e differenti potenziali *carriers* che hanno contribuito alla realizzazione di nuovi profarmaci utilizzabili clinicamente (*Melisi D., 2011*).

## 1.1 Il profarmaco

Al giorno d'oggi i profarmaci sono ampiamente sfruttati nell'industria farmaceutica per ottenere strategie terapeutiche nuove e più efficaci a minor costo. Per commentare il successo di questa innovazione farmaceutica, è sufficiente dire che i profarmaci attualmente in commercio sono sicuramente paragonabili a nuovi farmaci di sintesi in termini di farmacodinamica e farmacocinetica. Per questo motivo, questo approccio merita un ulteriore sviluppo, nel tentativo di migliorare l'efficacia delle strategie già sfruttate. Tuttavia, nonostante i nostri risultati incoraggianti ottenuti finora, l'industria farmaceutica tradizionale sembra ancora esprimere una nota di scetticismo sulla sua efficacia. Per decenni la principale preoccupazione della chimica farmaceutica è stata quella di progettare una gamma di nuovi analoghi sintetici strutturalmente correlati ad un composto attivo, provocando nel processo, uno spreco inutile di tempo e risorse economiche (**Fig. 1**).

Dall'altra parte, i profarmaci essendo derivati bioreversibili di farmaci attivi, sono molto più facili da sintetizzare, hanno una più alta probabilità di essere attivi con minori effetti collaterali, e soprattutto, hanno costi molto più bassi di sintesi. Queste ragioni hanno così generato un notevole interesse nell'industria farmaceutica impegnata al miglioramento della salute attraverso la progettazione di farmaci a costi più bassi e nel più breve tempo possibile senza andare a minare l'efficacia terapeutica.

In effetti, i profarmaci sono già stati sfruttati con successo nel trattamento di specifiche e diverse patologie, tra cui l'ipertensione, le malattie del colon, il cancro, le disfunzioni epatiche e renali, i disturbi del sistema nervoso centrale, così come le infezioni virali.



**Fig. 1** Schema utilizzato da Ferres (1983) per mostrare le differenze potenziali tra l'approccio dell'analogo strutturale e l'approccio del profarmaco al recettore

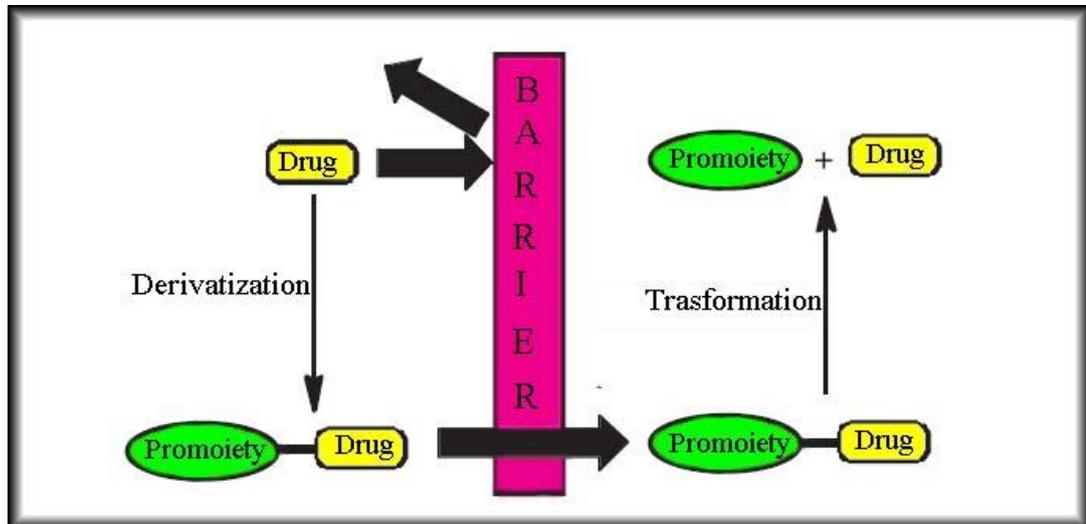
Ad oggi, il profarmaco, come definito dalla “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC), è un composto che deve subire biotrasformazione per mostrare un effetto farmacologico. Esso è costituito dal farmaco o *parent drug* a cui è legato covalentemente uno specifico gruppo non tossico, 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. 2**).

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.



**Fig. 2** *Schema di funzionamento del profarmaco*

### ***La strategia del profarmaco***

I profarmaci possono essere utilizzati per migliorare la somministrazione orale di farmaci scarsamente permeabili (*Stella V.J., 2007*).

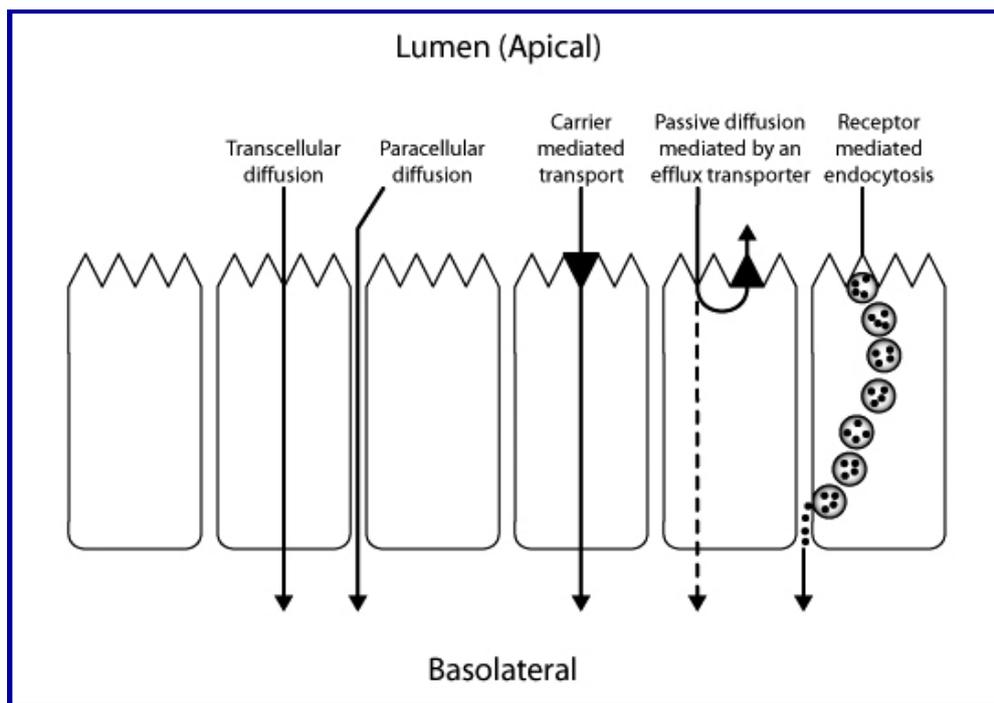
La somministrazione orale di farmaci può presentare alcuni ostacoli:

- Il farmaco non si scioglie nel tratto gastrointestinale;
- Il farmaco è troppo polare e non è in grado di permeare le cellule che rivestono il tratto gastrointestinale (enterociti);
- Il farmaco è un substrato per le pompe di efflusso presenti sugli enterociti;
- Il farmaco subisce un metabolismo presistemico nel contenuto luminale, negli enterociti e/o nel fegato prima di raggiungere la circolazione sistemica.

Il farmaco somministrato per via orale può fisicamente permeare la membrana attraverso uno, o una combinazione dei seguenti meccanismi (**Fig. 3**):

- diffusione passiva transcellulare;
- diffusione passiva transcellulare mediato da trasportatori di efflusso;
- diffusione passiva paracellulare;
- trasporto carrier-mediato;
- endocitosi mediata da recettori.

La permeazione è la somma di permeazioni che si verificano da ciascuno di questi percorsi.



**Fig. 3** Cinque maggiori meccanismi di permeazione a livello gastro-intestinale

La diffusione passiva transcellulare è, in generale, l'itinerario preferito per la permeazione attraverso una membrana. Ciò è principalmente dovuto all'elevata area superficiale disponibile per la diffusione passiva e minori vincoli di dimensioni rispetto alla diffusione paracellulare (Stella V.J., 2007). Rispetto al trasporto carrier-mediato e all'endocitosi recettore mediata, la diffusione passiva transcellulare è anche preferibile perché ci sono meno vincoli riguardanti il riconoscimento da parte dei trasportatori o recettori.

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.

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 dell'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. 4**).

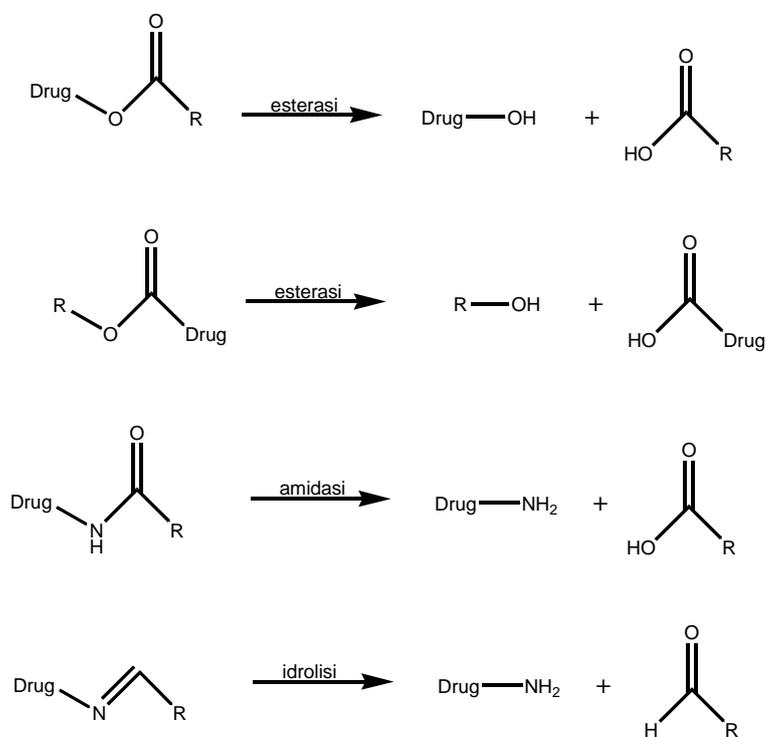
Essi saranno poi facilmente ripristinati in vivo grazie alla presenza ubiquitaria nel nostro organismo delle esterasi.

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.

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.



**Fig. 4** Funzioni derivatizzabili per sintetizzare profarmaci

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 endovena 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.

I 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 (*Stańczyk A., 2006; Wermut C.G., 2000*).

## 1.2 Meccanismo 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 a proteine di membrana capaci di fungere da recettori per attivare una serie di risposte biologiche, a marcatori di superficie per il riconoscimento cellulare, a mediatori per l'adesione cellulare, regolando 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.

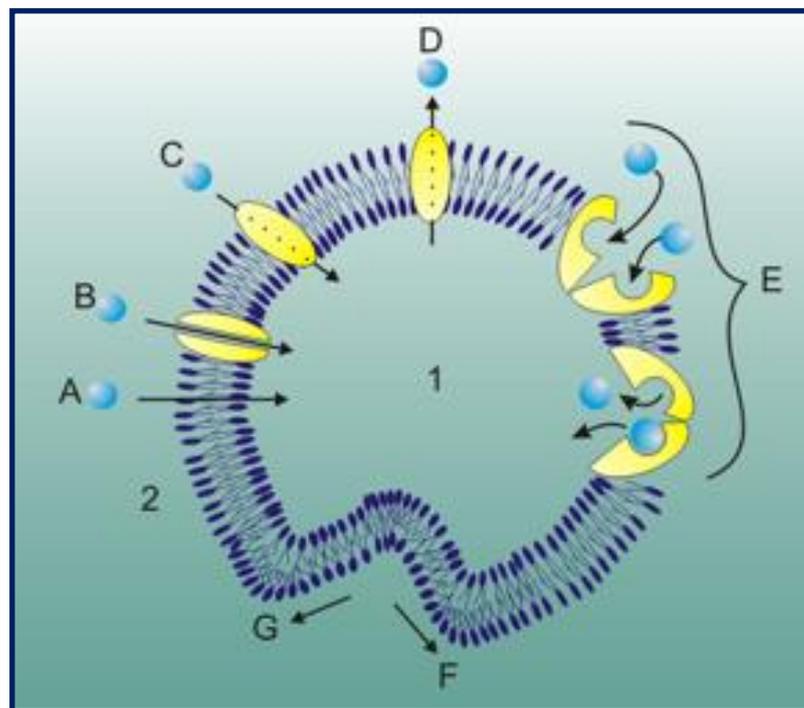
I meccanismi principali di trasporto sono due: il *trasporto passivo* e il *trasporto attivo*.

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. 5**).

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. 5** Alcune delle possibilità di movimento di molecole tra citoplasma (1) e spazio extracellulare (2). Trasporto passivo: A. Diffusione semplice, B. Diffusione facilitata. Trasporto attivo: D. Trasporto primario (contro gradiente), C.-E. Trasporto secondario: C. Uniporto, E. Simporto

Nel processo di diffusione facilitata non c'è consumo di energia sottoforma 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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e per gli anioni  $\text{Cl}^-$ , 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. 5**).

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.

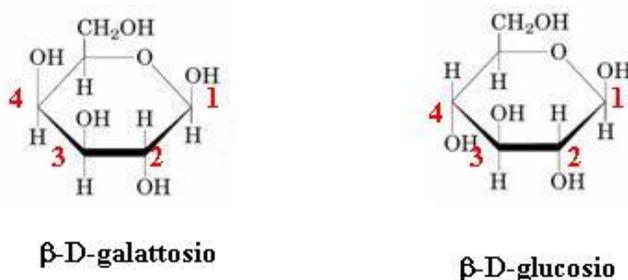
Alcune pompe possono essere anche a trasporto attivo indiretto, quando non provocano un'idrolisi diretta di ATP, ma sfruttano il gradiente di concentrazione, mantenuto tramite trasporto attivo diretto, di uno ione mentre pompano un'altra sostanza. In questo caso si verifica il fenomeno del cotrasporto, 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*).

### 1.3 Gli zuccheri

Gli zuccheri o glucidi sono derivati aldeidici o chetonici di polialcoli. Nei glucidi, il rapporto idrogeno/ossigeno è di 2/1 come nell'acqua:  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  (formula bruta degli zuccheri) dove  $n$  può variare da 3 a 9, donde le denominazioni di triosi, tetrosi, pentosi, esosi, eptosi, ecc. Essi si distinguono in aldosi e chetosi: i primi contengono il gruppo carbonilico ( $\text{C}=\text{O}$ ) in posizione terminale, mentre gli altri in posizioni intermedie.

Il glucosio è una molecola a 6 atomi di carbonio che rientra tra gli aldosi in quanto, nella forma aperta, il gruppo aldeidico è presente in posizione C1, in C(2-3-4-5) sono presenti quattro gruppi alcolici secondari e in C6 il gruppo alcolico primario. Il gruppo aldeidico reagisce intramolecolarmente con il gruppo alcolico del carbonio 5 dando origine ad una struttura ciclica (semiacetale interno).



**Fig. 6** Galattosio e glucosio

Il galattosio (**Fig. 6**) è un aldoso destrogiro, monosaccaride epimero del glucosio, uguale nella composizione, è simile ad esso nella struttura, l'unica differenza fra i due esosi è nella posizione dell'-OH sul C-4.

Il D-Galattosio viene prodotto in piccole quantità dal nostro organismo e viene utilizzato per la sintesi di polimeri complessi. La maggior parte del galattosio usato dal nostro organismo ha una origine esogena; esso è infatti il costituente di un importante e diffuso disaccaride, il lattosio (lo zucchero

del latte). Quando la quantità di galattosio introdotta con gli alimenti supera i bisogni dell'organismo, esso viene utilizzato per produrre energia; per assolvere a questa funzione il galattosio deve essere prima convertito in glucosio.

### ***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.

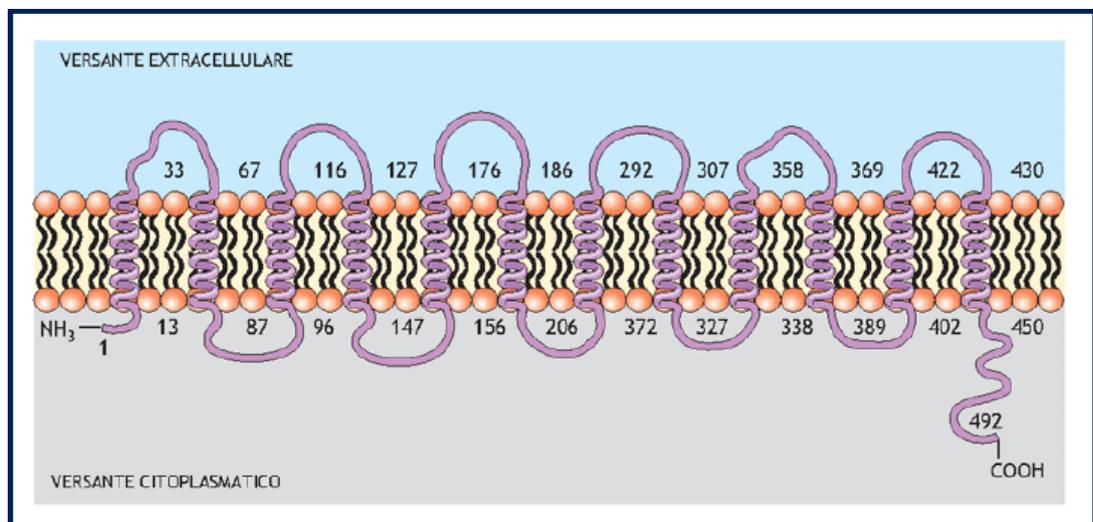
Il glucosio entra nella cellula per diffusione facilitata, sfruttando *carriers* di membrana, adibiti al trasporto degli esosi. La molecola di glucosio internalizzata viene fosforilata dall'enzima esochinasi, con la formazione del glucosio-6-fosfato, che non è più affine per il trasportatore, quindi 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, che vengono nominati da GLUT1 a GLUT7 ed i loro relativi geni (Mueckler M., 1994). La principale caratteristica di queste proteine è la presenza di 12 segmenti transmembranari ad  $\alpha$  elica (**Fig. 7**), 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  $\alpha$  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** Struttura transmembranaria tipica dei GLUTs.

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 il 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.

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  $\beta$  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*).

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.

<b>Trasportatore</b>	<b>Distribuzione</b>	<b>K<sub>m</sub> (mM) (D-Glu)</b>	<b>K<sub>m</sub> (mM) (D-Gal)</b>	<b>K<sub>m</sub> (mM) (D-Frut)</b>
<b>GLUT1</b>	Eritrociti, BEE, placenta, tessuti fetali	17	17	> 5M
<b>GLUT2</b>	Fegato, cellule $\beta$ del pancreas, rene, intestino tenue	42	> 50	66 mM
<b>GLUT3</b>	Neuroni cerebrali	11	8.5	N.D.
<b>GLUT4</b>	Muscolo scheletrico, cuore, adipociti	2	> 50	N.D.
<b>GLUT5</b>	Intestino tenue	N.D.	N.D.	6-14 mM
<b>GLUT7</b>	Reticolo endoplasmatico degli epatociti	N.D.	N.D.	N.D.

**Tabella1** *Isoforme dei GLUTs*

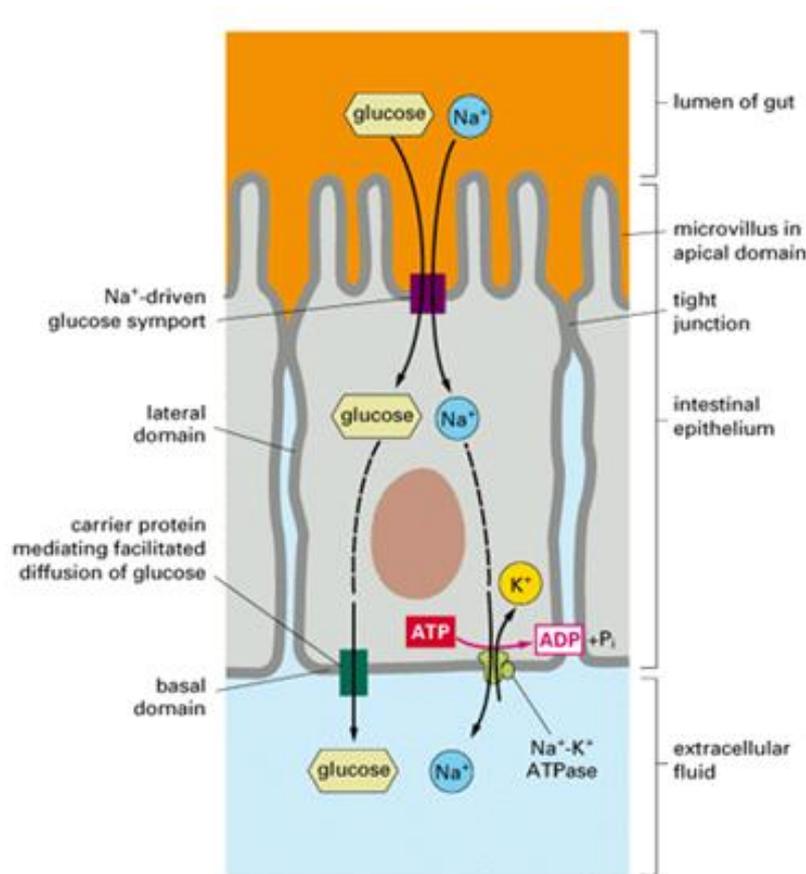
### *Meccanismi di trasporto del glucosio*

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  $\text{Na}^+$ /glucosio e il sistema della “glucosio permeasi” (**Fig. 8**). Il simporto  $\text{Na}^+$ /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 del  $\text{Na}^+$ .

Il cotrasportatore  $\text{Na}^+$ /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.



**Fig. 8** *Trasporto intestinale del glucosio.*

Il loro funzionamento si basa sull'utilizzo del gradiente di  $\text{Na}^+$  come fonte di energia per il trasporto attivo del glucosio. Il gradiente è generato dalla pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi, presente sulla membrana basolaterale della cellula, che espelle il  $\text{Na}^+$  con consumo di ATP, in modo da creare una maggiore concentrazione di  $\text{Na}^+$  all'esterno della cellula. Una volta generato il gradiente al cotrasportatore si legano il glucosio e il  $\text{Na}^+$ , che rappresenta lo ione trainante, provocando un cambio conformazionale nella proteina che permetterà il rilascio all'interno della cellula del  $\text{Na}^+$ , 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*).

## 2. SCOPO DEL LAVORO

Questo lavoro vuole concentrarsi solo su una singola molecola, il D-Galattosio, come potenziale vettore per il *design* di profarmaci.

È stato preferito il D-Galattosio al D-Glucosio semplicemente perché quest'ultimo è implicato in molti equilibri che potrebbero essere alterati dopo somministrazione croniche di profarmaci glucosilati. Questa scelta si basa anche sul fatto che sono stati già sintetizzati diversi derivati glucosilati e/o galattosilati di farmaci che normalmente non sono in grado di attraversare la BEE: la Dopamina (*Fernandez C., 2000; Bonina et al., 2003*), l'Acido 7-clorokinurenico (*Battaglia G., 2000*), l'Acido nipecotico (*Bonina F., 1999*) e diversi antinfiammatori e agenti antiossidanti (*Uhrig R.K., 2000*). L'obiettivo era stato quello di poterne aumentare la concentrazione a livello del SNC sfruttando il GLUT1 presente nella BEE. Spesso i risultati migliori vengono ottenuti in seguito alla somministrazione del profarmaco galattosilato, probabilmente per la sua maggiore affinità nei confronti del GLUT1.

Lo zucchero è sembrato il miglior candidato nel design di profarmaci per diverse ragioni: 1) esso esercita una certa attività biologica senza generare effetti avversi; 2) esso dimostra un'alta solubilità in acqua; 3) i suoi trasportatori sono ubiquitari e sono iper-espressi in maniera selettiva in diverse condizioni patologiche; 4) la buona caratterizzazione chimica facilita la sintesi del profarmaco (*Melisi D., 2011*).

Infatti, l'originalità di questo lavoro consiste nell'aumentare l'ampio spettro di possibilità nell'utilizzo di un così semplice composto per la sintesi di nuovi profarmaci.

Il Galattosio è un composto semplice e naturale che è sfruttato molto nelle strategie del profarmaco. I profarmaci galattosilati possono essere considerati un buon approccio per raggiungere obiettivi diversi nell'applicazione terapeutica, soprattutto quando i farmaci tradizionali sono probabilmente destinati al fallimento terapeutico a causa di diversi motivi.

Infatti, di fondamentale importanza è la loro capacità di aumentare la selettività del composto di origine, un fenomeno che aiuta a ridurre l'incidenza di effetti avversi, pur mantenendo intatte le caratteristiche farmacodinamiche del *parent drug*. Infatti, con tale strategia è stato ottenuto un selettivo target farmacologico per cellule cerebrali, ma è stata anche migliorata la permeabilità cellulare, così come il profilo farmacocinetico del *parent drug*. Questi profarmaci migliorano la permeabilità della membrana cellulare, aumentando così le concentrazioni intra-cellulari del farmaco, migliorano i parametri farmacocinetici, aumentando così la biodisponibilità di farmaco e riducendo gli effetti nocivi.

A dimostrazione di tutto ciò, lo scopo del mio lavoro di dottorato è stato di:

- Sintetizzare profarmaci galattosilati di Ketorolac (Ketogal), Flurbiprofene (FluGal), Ketoprofene (Okigal), dell'Ibuprofene (Ibugal) esterificando la funzione carbossilica dei farmaci con una molecola di galattosio per migliorare la farmacocinetica, migliorare l'attività farmacologica e ridurre l'ulcerogenicità gastrica (*Curcio A., 2009; Patent: WO 2010/013279A2, Patent: US 2011212904*).

- Sintetizzare un derivato galattosilato della PEA (Peagal), utilizzando uno spacer succinico in grado di coniugare, mediante due gruppi esterei, la funzione ossidrilica terminale della PEA e l'ossidrilico in posizione 6' dello zucchero per ottenere un farmaco chimicamente maneggevole e in grado di

aumentare la concentrazione intracellulare di PEA e quindi aumentarne l'attività.

- Sintetizzare un derivato galattosilato della Nitroarginina (Nagal), in grado di funzionare come profarmaco (*Melisi D., 2009; Giordano C., 2011*). La coniugazione tra le due porzioni è stata ottenuta tramite la formazione di un legame estereo tra il gruppo carbossilico dell'amminoacido e l'ossidrile in posizione 6' dello zucchero per superare gli ostacoli, di tipo farmacocinetico e tossicologico, che non permettono l'uso clinico dell'L-NAME e dei suoi congeneri (bassa disponibilità orale, instabilità chimica, scarsa specificità cellulare e tossicità a livello cardiovascolare) per incrementare la permeabilità cellulare; per dimostrare che la presenza dei trasportatori per il galattosio nell'astroglia (GLUT3) sia implicata nella maggiore attività analgesica del nostro profarmaco.

## 3. RISULTATI

### 3.1 Profarmaci degli anti-infiammatori

#### 3.1.1 Introduzione : i FANS

I farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS, con terminologia inglese “*Non Steroidal Antiinflammatory Drugs*”, “NSAIDs”) sono tra i farmaci più utilizzati in terapia a livello mondiale. La categoria FANS comprende una varietà di farmaci differenti appartenenti a classi chimiche diverse. Questa diversità chimica comporta anche caratteristiche farmacocinetiche diverse. La maggior parte di essi, comunque, sviluppa prevalentemente tre tipi di effetti:

- effetti analgesici: riduzione di certe forme di dolore;
- effetti antipiretici: abbassamento della temperatura corporea in caso di iperpiressia.
- effetti anti-infiammatori: modificazione della risposta infiammatoria;

*Effetto anti-piretico.* La temperatura corporea viene regolata da un centro situato nell’ipotalamo che assicura un bilanciamento tra calore dissipato e calore prodotto. La febbre si manifesta quando viene disturbato questo “termostato” ipotalamico, che eleva il punto predeterminato della temperatura corporea. I FANS riportano al livello normale il termostato e a questo punto i meccanismi di regolazione (dilatazione dei vasi superficiali, sudorazione ecc...) iniziano ad attivarsi per ridurre la temperatura. La temperatura normale non è influenzata dai FANS.

Il meccanismo di azione antipiretica dei FANS sembra derivare dall’inibizione della produzione delle prostaglandine nell’ipotalamo. Durante la risposta infiammatoria, endotossine batteriche determinano il rilascio dai macrofagi di un pirogeno (IL-1) che stimola la produzione

nell'ipotalamo di prostaglandine di tipo E (PGE) che possono successivamente promuovere l'aumento della temperatura. La COX-2 potrebbe avere un ruolo a questo livello poiché indotta dall'IL-1 dell'endotelio dei vasi sanguigni dell'ipotalamo.

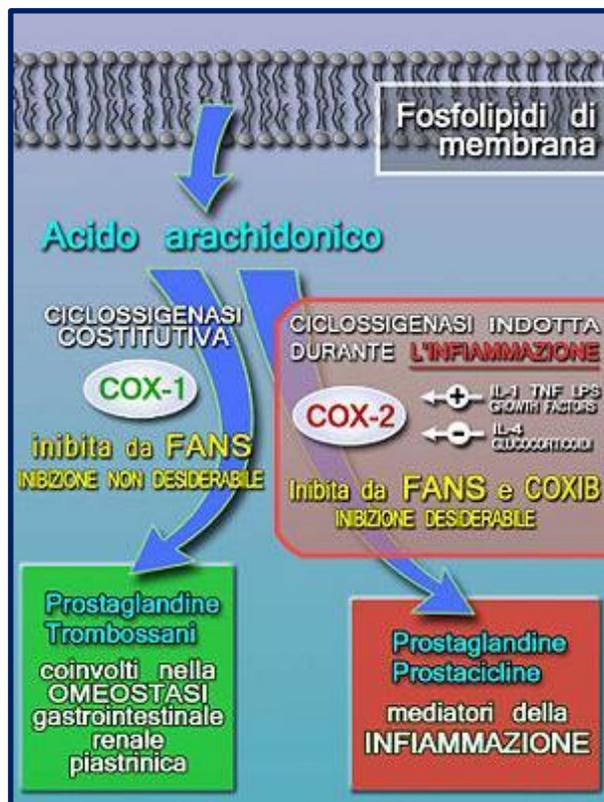
*Effetti analgesici.* I FANS sono efficaci principalmente nel dolore associato all'infiammazione o al danno tissutale, perché riducono la sintesi di prostaglandine che sensibilizzano i nocicettori verso i mediatori dell'infiammazione quali, ad esempio, la bradichinina e l'istamina.

*Effetti anti-infiammatori.* I FANS riducono principalmente quelle componenti dell'infiammazione e della risposta immunitaria in cui i prodotti dell'azione delle COX-2 svolgono un ruolo significativo, vale a dire: vasodilatazione (per la diminuzione delle prostaglandine vasodilatatrici come la PGE<sub>2</sub> e le prostaciline), edema e dolore.

Questi effetti sono dovuti all'enzima ciclossigenasi (COX) che prende parte alla cosiddetta cascata dell'acido arachidonico per la formazione di prostaglandine (PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>), prostaciline (PGI<sub>2</sub>) e trombossano A<sub>2</sub>. Questi sono eicosanoidi, che insieme anche ai leucotrieni, sono ottenuti a partire da fosfolipidi di membrana e sono dotati di importanti ruoli fisiologici e patologici. I leucotrieni si formano anch'essi dall'acido arachidonico per azione però dell'enzima 5-lipossigenasi.

Le prostaglandine sono molecole che inducono i classici fenomeni dell'infiammazione (vasodilatazione, aumento della permeabilità capillare, edema, dolore) sia direttamente sia potenziando le azioni di altri noti mediatori quali: istamina, serotonina e bradichinina. La sintesi delle prostaglandine viene indotta dalle citochine infiammatorie (come l'interleuchina-1, IL-1) e dal fattore di necrosi tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) che sono liberate in seguito ad infiammazione, infezione, danno tissutale, reazioni di rigetto di trapianti, tumori o altri stati morbosi.

Sono noti due tipi di ciclossigenasi, vale a dire la COX-1 e la COX-2, anche se recentemente ne è stata descritta una terza forma (COX-3). La COX-1 è un enzima costitutivo espresso nella maggior parte dei tessuti, comprese le piastrine del sangue, ed è coinvolta nel segnale tra cellula e cellula e nell'omeostasi tissutale. La COX-2 viene prodotta nelle cellule infiammatorie quando queste vengono attivate ed è responsabile della produzione di prostanoidei, mediatori dell'infiammazione. La maggior parte dei FANS, usati correntemente, sono inibitori di entrambi gli isoenzimi sebbene possono differire nel grado di inibizione delle singole forme. **Meccanismo d'azione.** L'azione anti-infiammatoria dei FANS è chiaramente legata alla loro inibizione della COX-2 mentre i loro effetti indesiderati sono per la maggior parte dovuti all'inibizione della COX-1. Alcuni composti ad azione selettiva su COX-2 (COXIB) sono ora in uso clinico mentre altri sono in fase di sviluppo (**Fig. 9**).



**Fig. 9** Meccanismo dell'infiammazione

Gli inibitori della ciclossigenasi, di per sé, non hanno alcun effetto su quei processi che contribuiscono al danno tissutale in caso di infiammazione cronica (rilascio di enzimi lisosomiali, produzione di radicali tossici dell'ossigeno) (*Lemke T. S., 2010; Rang H.P., 2005*).

La principale azione dei FANS consiste nell'inibizione dell'attività metabolizzante l'acido arachidonico della COX. La ciclossigenasi è un enzima bifunzionale che possiede due attività distinte: un'attività principale che da origine alla PGG<sub>2</sub>, e un'attività perossidasi che converte la PGG<sub>2</sub> a PGH<sub>2</sub>. Sia gli inibitori della COX-1 sia quelli della COX-2 inibiscono solo la reazione principale della COX. Entrambe le isoforme enzimatiche sono associate alla membrana e sono formate da un lungo canale con una curvatura terminale. L'apertura del canale è principalmente idrofobica.

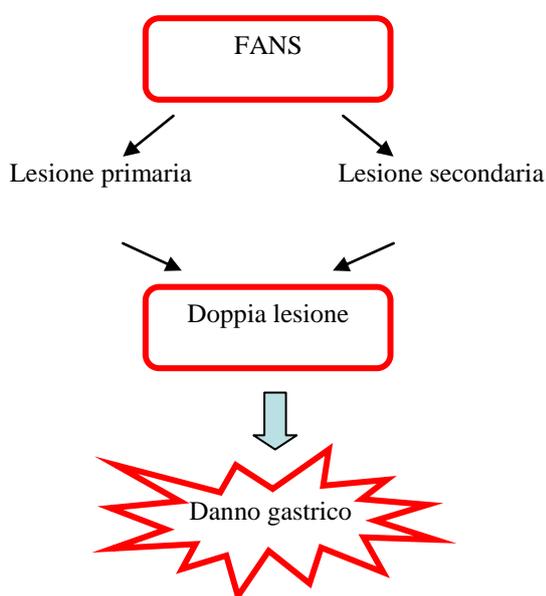
L'acido arachidonico una volta entrato all'interno del canale, si piega adattandosi alla curvatura; questo permette l'attivazione della reazione che fa acquisire due ossigeni ed eliminare un radicale libero. Questo dà origine al caratteristico anello a cinque atomi di carbonio delle prostaglandine.

Nella COX-2 il canale è di maggiori dimensioni dato che nella posizione 253 della catena amminoacidica è presente una isoleucina voluminosa al posto della valina che invece è presente nella stessa posizione nella COX-1. Su questa differenza si basa l'attività discriminatoria dei farmaci COX-2 selettivi. I FANS tradizionali bloccano entrambi gli enzimi a metà strada lungo il canale, formando un legame ad idrogeno con un'arginina polare in posizione 120. La maggior parte di essi ha un'azione reversibile poiché primariamente impedisce l'ingresso nel canale all'acido arachidonico, mentre l'Aspirina si lega alla serina in posizione 530 irreversibilmente acetilandola.

L'inibizione della COX-1, in generale, è istantanea e reversibile in modo competitivo (ad eccezione che per l'Aspirina). L'inibizione della COX-2 è

progressiva ed aumenta in maniera tempo dipendente (*Lemke T. S, 2010; Rang H.P., 2005*).

**Effetti indesiderati.** I FANS sono responsabili di numerosi effetti collaterali e compaiono anche nei referti di morte correlata all'uso di farmaci. Tra i più comuni effetti indesiderati associati all'uso di tali farmaci vi sono i disturbi gastrointestinali, quali dispepsia, diarrea (ma a volte costipazione), nausea e vomito e lesioni gastriche che possono evolvere fino al sanguinamento e in alcuni casi all'ulcerazione.



**Fig. 10** *Meccanismo gastrolesivo dei FANS*

Le lesioni gastriche prodotte dai FANS coinvolgono un doppio meccanismo di danno (**Fig. 10**).

La maggior parte dei FANS è costituita da composti acidi che producono una prima lesione per azione diretta dell'acido a livello della mucosa gastrica, un effetto indiretto di contatto, ed una retrodiffusione degli ioni idrogeno. Il danno secondario è dovuto principalmente all'inibizione della COX-1, enzima responsabile della sintesi delle prostaglandine responsabili della sintesi di prostaglandine che normalmente inibiscono la secrezione

acida e svolgono un'azione citoprotettiva e di conservazione dell'integrità sulla mucosa nel tratto gastrointestinale. Le PGE e la PGI<sub>2</sub> inibiscono la secrezione acida indotta da gastrina e istamina. La PGE<sub>1</sub> esercita un effetto protettivo sulla mucosa gastroduodenale stimolando la secrezione di un muco alcalino e di ioni bicarbonato, e mantenendo o aumentando il flusso sanguigno della mucosa. L'insieme dei due meccanismi provoca tali lesioni.

Altri effetti indesiderati associati all'uso dei FANS includono reazioni cutanee e effetti renali avversi (*Lemke T. S, 2010; Rang H.P., 2005*).

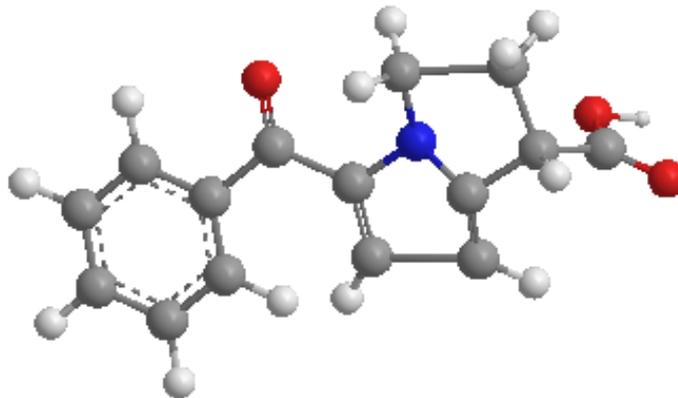
A causa di questi effetti collaterali gravi ne è limitato l'utilizzo clinico. Da uno studio effettuato su modelli sperimentali in vivo su ratti, i FANS determinano ulcere gastriche a livello antrale e molteplici erosioni intestinali (*Laudanno O.M., 2000*). Per questo motivo la nostra attenzione è stata rivolta verso Ketorolac, Flurbiprofene, Ketoprofene e Ibuprofene.

## *Ketorolac*

Il Ketorolac (acido 6-benzoil-pirrolidin-[1,2, $\alpha$ ]-pirrol-3- carbossilico) è un derivato pirrolico appartenente alla classe dei FANS.

Ha una potente attività analgesica ed è utilizzato per la terapia del dolore post operatorio e per patologie in cui altri FANS risultano poco efficaci (*Dula D.J., 2000*).

La principale azione del Ketorolac è dovuta alla sua attività analgesica a livello centrale, il cui meccanismo d'azione non è ancora stato del tutto chiarito.



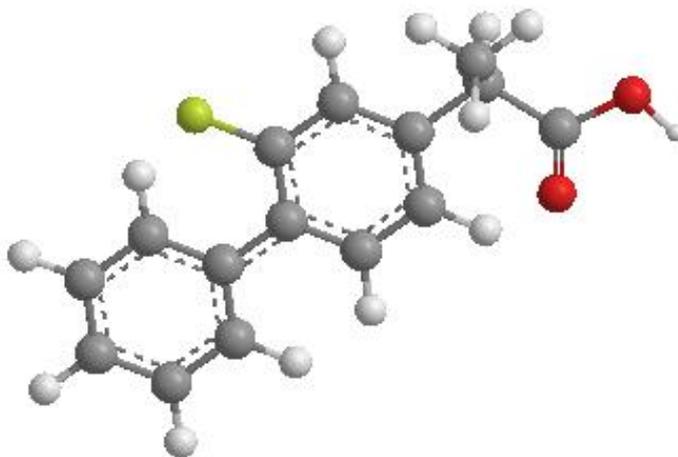
Studi effettuati hanno però evidenziato l'incapacità del Ketorolac di legarsi ai recettori oppioidi  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  nonostante abbia un effetto analgesico uguale o superiore a quello della morfina; nello stesso tempo però, anche se in piccola parte, causa il rilascio degli oppioidi endogeni (endorfine e encefaline). A differenza degli analgesici oppioidi, evita gli effetti di dipendenza, depressione respiratoria, abbassamento della pressione e bradicardia, tipici della morfina. L'attività analgesica può essere anche giustificata dall'azione inibitrice del Ketorolac sui recettori  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenergici a livello centrale oppure dall'inibizione dei recettori del glutammato e della sostanza P a livello spinale (*Wagner W., 2004*).

Per quanto riguarda la farmacocinetica, il Ketorolac ha una elevata capacità di legare le proteine plasmatiche, per cui ha un basso volume apparente di distribuzione (0,11 L/Kg). Viene metabolizzato per coniugazione con l'acido glucuronico ed è escreto principalmente per via renale. Ha quindi un'emivita bassa di circa 4-6 ore, per cui sono richieste più somministrazioni nell'arco di una giornata. E' necessario però, fare una distinzione tra le due forme enantiomeriche del farmaco; il Ketorolac, infatti, presenta in posizione 3 un carbonio chirale per cui esistono due enantiomeri S e R , di cui l'enantiomero S è stato valutato approssimativamente due volte più attivo della miscela racemica. A livello farmacocinetico però è stato constatato che il valore relativo dell'emivita della forma racemica (SR) è superiore a quello dell'enantiomero S , infatti:  $t_{1/2} (SR) = 4.2h$ ,  $t_{1/2} (S) = 2.5h$  (*Brocks D. R., 1992*).

Come per tutti i FANS l'effetto collaterale principale è l'ulcerogenicità del tratto gastrointestinale. La somministrazione per via orale del Ketorolac è causa di diversi disturbi, quali nausea, vomito, irritazione gastrica, ulcera peptica e sanguinamento, che ne limitano l'utilizzo clinico. Questi effetti sono dovuti sia alla inibizione della sintesi delle prostaglandine che ad una azione erosiva diretta provocata dalla funzione acida libera (*Cioli, V. 1979; Guidera, A.C., 2001; Rainsford, K. D., 1989; Hawkey, C., 2000*). Inoltre, studi di cinetica hanno dimostrato che la formazione di metaboliti può essere in parte responsabile di molti degli effetti collaterali del Ketorolac. Attualmente esso è indicato solo per trattamenti a breve termine per il dolore post-operatorio o provocato da coliche renali.

## *Flurbiprofene*

Il Flurbiprofene, o acido 2(3-fluoro-4-fenil-fenil)propionico, è un potente farmaco anti-infiammatorio non steroideo (FANS), con attività periferica.



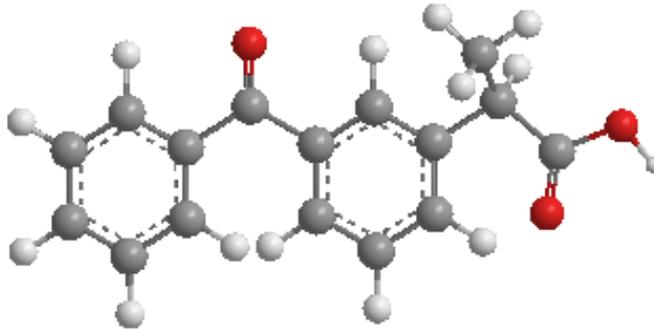
Come gli altri membri di questo gruppo (acidi aril- ed etero-aril-propionici), esso possiede attività analgesiche, anti-infiammatorie ed anti-piretiche. Il farmaco è ben assorbito dopo somministrazione orale con un picco di livello plasmatico di 1 ora, ed ha un'emivita plasmatica di circa 6 ore. Il Flurbiprofene subisce un rapido metabolismo di ossidazione ed è escreto principalmente nelle urine sia come derivato glucuronico che solfato per il 60-70%. Il restante 20-25% rimane immutato. Non sono conosciuti i suoi metaboliti attivi e non ci sono prove di eventuali alterazioni dose-dipendenti della sua farmacocinetica o di accumulo nel plasma in seguito a somministrazione multipla.

Il Flurbiprofene inibisce sia la COX-1 che la COX-2, con una tolleranza gastrointestinale migliore rispetto all'Aspirina e all'Indometacina, e paragonabile a quella dell'Ibuprofene e del Naprossene. Non ha mai mostrato effetti epatotossici, teratogenici o cancerogeni. Gli effetti renali ed ipertensivi sono quelli comuni a tutti gli altri FANS.

Il Flurbiprofene è disponibile sotto forma di cerotti transdermici, in compresse o capsule da 50, 100 o 200 mg, ed è indicato per i disturbi di artrite, per la spondilite anchilosante, per la dismenorrea e per il dolore post-operatorio. Benché non sia uno dei più comuni FANS utilizzati in terapia, i recenti problemi incontrati con l'uso clinico di inibitori COX-2 selettivi hanno lasciato spazio ad una sua scelta tra i farmaci analgesici (*Sultan, A., 2009*).

## *Ketoprofene*

Il Ketoprofene è un farmaco ad azione anti-infiammatoria, antipiretica e analgesica, derivato dall'acido arilpropionico.



È utilizzato nel trattamento sintomatico dell'artrite reumatoide e osteoartrite, nell'alleviare il dolore lieve e moderato e nel trattamento della dismenorrea. Possiede efficacia terapeutica anche nel trattamento della spondilite anchilosante, dell'artrite gottosa acuta, nelle borsiti e tendiniti e nella sindrome di Reiter.

Il principale meccanismo d'azione del farmaco è riconducibile all'inibizione della cicloossigenasi (COX) e al conseguente blocco della sintesi delle prostaglandine, responsabili del processo infiammatorio e del danno tissutale. E' probabile inoltre che il Ketoprofene espliciti la propria attività analgesica anche attraverso un meccanismo di tipo centrale, non oppioide, in cui sono coinvolte strutture sovraspinali quali i recettori glutammato tipo NMDA inducenti la sensibilizzazione centrale in cui sono implicati diversi mediatori biochimici, quali la sostanza P, la 5-HT, oltre alle stesse prostaglandine presenti a livello del SNC; questo spiegherebbe la rapidità dell'effetto antalgico del Ketoprofene. Inoltre, esso inibisce la sintesi dei leucotrieni, della bradichinina e stabilizza le membrane lisosomiali; è in grado di ridurre la sintesi di superossidi da parte dei

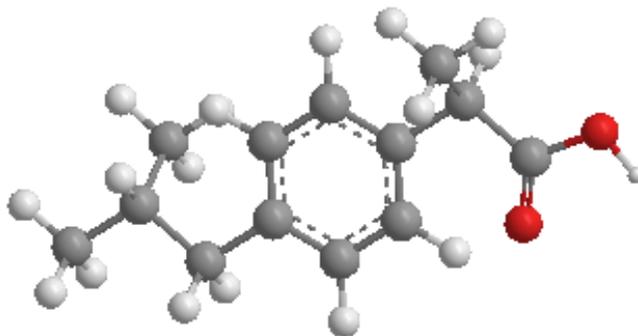
polimorfonucleati, bloccando il sistema NADPH-NADPH ossidasi diminuendone la liberazione nel sito di flogosi.

Il Ketoprofene è rapidamente assorbito dopo somministrazione orale, si lega ampiamente alle proteine plasmatiche (99%), ed ha un'emivita plasmatica di circa 2 ore. Nel fegato viene coniugato all'acido glucuronico per poi essere eliminato per via renale. Il Ketoprofene attraversa rapidamente la barriera emato-encefalica raggiungendo concentrazioni in equilibrio con quelle plasmatiche, già a 15 minuti dalla sua somministrazione per via intramuscolare alla dose di 100 mg (*Goodman and Gilman, 2000*).

E' disponibile in compresse o capsule da 50, 100 e 200 mg, spray orale, collutorio, gel, cerotti transdermici e supposte. Viene somministrato anche per via parenterale (EV e IM) come sale sodico.

## *Ibuprofene*

L'Ibuprofene è un derivato semplice dell'acido fenilpropionico. Questo farmaco presenta un legame farmaco-proteico superiore al 99%, viene rapidamente rimosso dal circolo e la sua emivita è di circa 1-2 ore.



L'ibuprofene è ampiamente metabolizzato nel fegato dal citocromo CYP2C8 E CYP2C9 ed è, in piccola parte, escreto inalterato.

L'ibuprofene *per os* è prescritto spesso a dosi più basse, alle quali ha effetto analgesico ma non antinfiammatorio. Si possono avere irritazione gastrointestinale ed emorragia, ma anche eruzione cutanee, prurito, acufeni, vertigini, cefalea (*Katsung B.G., 2003*).

Dei due enantiomeri, S (+) e R (-), il più attivo farmacologicamente è il primo. Il secondo contribuisce all'attività anti-infiammatoria del farmaco perché, in vivo, si verifica la conversione unidirezionale da R (-) a S (+).

Come inibitore della cicloossigenasi è meno potente di Ketoprofene e Naprossene (*Todd P. A., 1986*) ma è più attivo di Propossifene nel trattamento del dolore odontoiatrico (*Cooper S.A., 1984*) e della dismenorrea primaria.

Come anti-infiammatorio, è particolarmente efficace nei pazienti affetti da artrite reumatoide ed osteoartrite, nei quali riduce il gonfiore delle articolazioni e il dolore.

L'Ibuprofene presenta un rischio cardiovascolare basso, di poco superiore a quello del Naprossene (caratterizzato dal più basso rischio cardiovascolare fra tutti i FANS) che tende ad aumentare lievemente in caso di dosaggi elevati e trattamenti prolungati.

In associazione ad Acido Acetilsalicilico a basse dosi (antiaggregante piastrinico), l'Ibuprofene (400 mg) antagonizza l'azione antiaggregante piastrinica dell'ASA riducendone l'azione cardioprotettiva (*MacDonald T.M, 2003; Kimmel S.E., 2004; Patel, T.N., 2004*).

### 3.1.2 Profarmaci di anti-infiammatori

Gli anti-infiammatori non steroidei (FANS) sono ampiamente utilizzati in diverse terapie a partire dal trattamento dell'infiammazione e del dolore sino alle patologie cardiovascolari o genitourinarie. Negli ultimi anni un gran numero di nuovi FANS sono stati introdotti nella pratica clinica, con l'obiettivo di ottenere buoni risultati farmacologici limitando gli effetti collaterali. I disturbi gastro-intestinali rappresentano le reazioni avverse più comuni nell'uso dei FANS, e spesso provocano ulcere ed emorragie. Il danno prodotto dai FANS alla mucosa gastro-intestinale sembra essere provocato da due diversi meccanismi (Cioli V., 1979; Rainsford K. D.,1989). Il primo meccanismo è collegato ad un'azione locale del farmaco, che può essere sia di tipo diretto che indiretto. Nel primo caso, il danno è attribuito all'irritazione della mucosa gastrica da parte del gruppo carbossilico dell'anti-infiammatorio e dall'inibizione *in loco* della sintesi delle prostaglandine, direttamente nel tratto gastro-intestinale. L'effetto indiretto, invece, può essere attribuito ad un meccanismo di "ion trapping" da parte del farmaco, dal lume gastrico all'interno della mucosa. Il secondo meccanismo è basato sull'azione sistemica del farmaco, che avviene in seguito al suo assorbimento e che può essere dimostrata e quantizzata sfruttando una via di somministrazione parenterale. Tale danno è dovuto principalmente all'inibizione della ciclo-ossigenasi di tipo 1 (COX-1), enzima responsabile della sintesi delle prostaglandine, che normalmente inibiscono la secrezione acida e svolgono un'azione citoprotettiva e di conservazione dell'integrità della mucosa nel tratto gastro-intestinale.

Negli ultimi anni un gran numero di nuovi FANS sono stati introdotti nella pratica clinica, con l'obiettivo di ottenere buoni risultati farmacologici limitando gli effetti collaterali, in particolare sfruttando l'inibizione

selettiva della ciclo-ossigenasi di tipo 2 (COX-2). Molti di questi farmaci (COXIB) hanno mostrato grave tossicità a livello cardiaco ed il loro uso è stato limitato sino, in alcuni casi, al ritiro dal commercio.

Sulla base di queste premesse, recentemente una grande attenzione è stata rivolta allo sviluppo di nuovi profarmaci dei FANS con lo scopo di abolirne la tossicità gastro-intestinale, mantenendone l'attività farmacologica. L'approccio del profarmaco è comunemente utilizzato per superare le barriere di tipo farmacologico o farmacocinetico che può incontrare un farmaco nella pratica clinica, come la tossicità, l'instabilità chimica, il basso assorbimento e la mancanza di specificità d'azione. La differenza sostanziale tra analoghi di nuova sintesi ed i profarmaci è che i primi sono biologicamente attivi, mentre i secondi richiedono un'attivazione *in vivo* per espletare la propria attività biologica. Dato che non viene alterata la struttura primaria del farmaco, la sintesi di profarmaci è generalmente molto meno difficile della sintesi di nuovi analoghi, inoltre la probabilità che il profarmaco sia farmacologicamente attivo è maggiore. Per questi motivi, nell'ultimo decennio la tecnologia del profarmaco è stata ampiamente studiata e sfruttata dall'industria farmaceutica.

La letteratura mostra diversi tentativi di progettazione e sintesi di profarmaci di alcuni FANS con lo scopo di mascherare in maniera reversibile la loro funzione carbossilica in modo da ridurre o eliminare la tossicità gastro-intestinale locale. Per questo motivo, infatti, sono stati progettati e sintetizzati alcuni derivati esterei o amidici di alcuni FANS come il Ketorolac (*Mishra A., 2008*) o il Flurbiprofene (*Tsunematsu H., 1995*), oppure profarmaci polimerici (*Vyas S., 2007*) ottenendo buoni risultati.

In base a questi ottimi risultati il mio lavoro è stato quello di coniugare questi FANS con una molecola di galattosio.

La scelta dello zucchero nasce dal fatto che i carboidrati metabolizzabili, specialmente gli esosi, sono componenti del muco gastrico, per cui l'effetto anti-ulcerogenico è dovuto alla protezione causata sia dal profarmaco che dal rilascio dello zucchero.

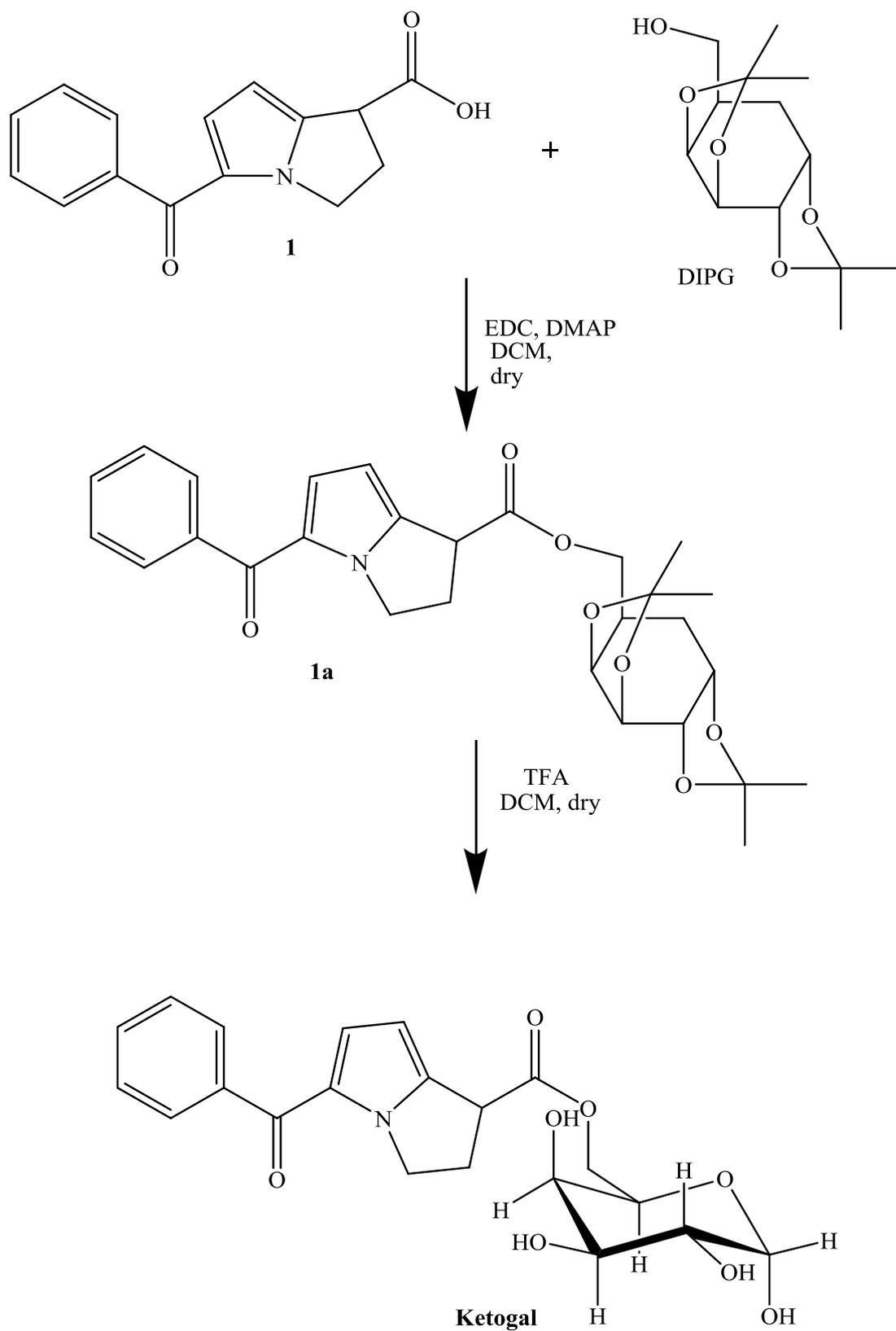
Con i profarmaci sintetizzati abbiamo verificato la validità di questo approccio, ottenendo profarmaci in grado di annullare gli effetti collaterali gastro-intestinali dei comuni FANS.

### 3.1.3 Ketogal

#### 3.1.3.1 Sintesi

Il Ketogal viene sintetizzato esterificando il gruppo carbossilico del Ketorolac con l'ossidrilico in posizione 6' del galattosio. A questo scopo viene utilizzato l'1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (DIPG), in cui le quattro funzioni ossidriliche non interessate alla reazione sono protette dai chetali. Il Ketorolac è disponibile commercialmente sotto forma di sale di Trometamina, per cui la funzione carbossilica viene inizialmente liberata in seguito ad acidificazione di una soluzione del sale di partenza ed estrazione del Ketorolac mediante un solvente organico.

La reazione di esterificazione tra il Ketorolac **1** e il DIPG viene condotta in presenza di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide cloridrato (EDC), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), come catalizzatore, in diclorometano anidro. Il coniugato protetto **1a** viene così ottenuto con una resa del 75%. I chetali vengono completamente rimossi mediante acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, in modo da ottenere il **Ketogal**, con una resa del 65% (**Schema 1**).



**Schema 1**

### 3.1.3.2 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, importante è che non sia troppo bassa perché in quel caso il profarmaco sarebbe troppo instabile ed incapace di arrivare al sito d'azione intatto e potrebbe inoltre 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 possibile conservarlo 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 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 all'HPLC con rivelatore a diodi. L'emivita chimica del profarmaco Ketogal è stata calcolata misurando la sua scomparsa dalla soluzione in esame ed è di circa 4 ore. La stabilità enzimatica è stata misurata incubando il Ketogal in plasma di ratto. Come per la stabilità chimica, ogni ora è stata prelevata un'aliquota ed analizzata mediante HPLC. L'emivita enzimatica del profarmaco è di circa 1.5 ore.

Nel caso del Ketogal è stata studiata anche la stabilità a pH 1 in quanto si vuole andare a verificare la possibilità di proteggere la funzione acida del farmaco per ridurre la sua azione tossica diretta. Tale studio è stato effettuato sciogliendo il profarmaco in una soluzione di HCl 0.1 N e seguendo la stessa metodica usata per la stabilità enzimatica. L'emivita a pH 1 risulta essere di circa 2 ore.

Dai risultati ottenuti, mostrati nella **Tabella 2**, si può prevedere per il Ketogal una buona stabilità, che ne permette anche la somministrazione per via orale. In questo modo il Ketorolac non sarà liberato velocemente a livello gastrico, causando i classici effetti collaterali, e potrà espletare la sua azione farmacologica una volta raggiunto il circolo sanguigno.

Composto	pH 7.4	pH 1	Plasma
	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)
<b>Ketogal</b>	> 4	2.1	1.5

**Tabella 2.** *Stabilità chimica ed enzimatica del Ketogal*

### 3.1.3.3 Ulcerogenicità

Le lesioni gastriche sono state valutate in topi maschi Swiss. Agli animali a digiuno (16-18 h) sono stati somministrati per via orale il Ketorolac (10 mg/Kg), il Ketogal (16.3 mg/Kg) o il veicolo. Dopo 4 ore, i topi sono stati sacrificati e lo stomaco prelevato, inciso lungo la grande curvatura, lavato con soluzione fisiologica e la mucosa esaminata per la valutazione della presenza di petecchie e/o lesioni gastriche. Alle petecchie è stato assegnato uno “score” di 1, ed alle lesioni, invece, è stato assegnato uno “score” in base al diametro (uno “score” di 5 per lesioni di diametro inferiore ad 1 mm; uno “score” di 10 per lesioni con diametro superiore ad 1 mm). Lo studio dell’attività ulcerogena ha mostrato per il Ketogal una netta diminuzione delle proprietà gastrolesive, in confronto al Ketorolac, in seguito a somministrazione equimolare dei due composti; infatti il Ketogal ha mostrato solo una lieve irritazione della mucosa gastrica, con una quasi totale assenza di ulcere (**Tabella 3**).

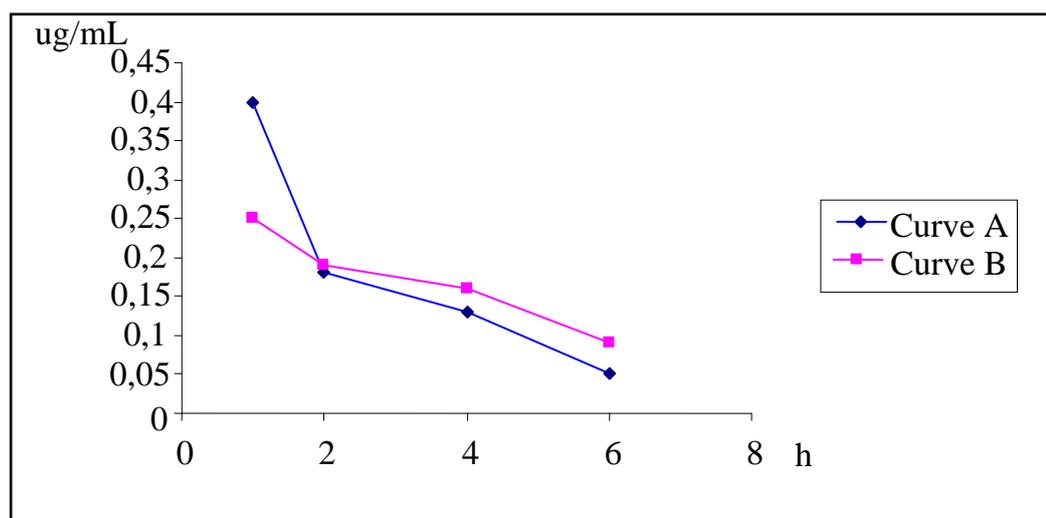
<b>Composto</b>	<b>Dose orale (mg/Kg)</b>	<b>Numero di ulcere</b>	<b>Grado di ulcerogenicità</b>
<b>Controllo (CMC 0.5%)</b>	—	0	—
<b>Ketorolac</b>	0.1	4±0.4	10
<b>Ketogal</b>	0.163	1±0.4	1

**Tabella 3.** *Ulcerogenicità*

### 3.1.3.4 Dati farmacocinetici

Il profilo farmacocinetico del Ketogal e del Ketorolac è stato valutato in ratti Wistar, misurando la concentrazione dei due composti nel plasma, nello stomaco, nel rene e nel fegato. Tali ratti hanno ricevuto per via orale Ketorolac (0.100 mg/Kg) o Ketogal (0.163 mg/Kg) e sono stati sacrificati dopo 2 h, 4 h e 6 h dalla somministrazione. I vari campioni sono stati trattati con acetonitrile e la sospensione è stata vortexata e centrifugata a 3000 RPM per 10 minuti. La fase organica è stata iniettata nello sistema di HPLC usato per i saggi di stabilità.

Dai risultati ottenuti si evince che l'introduzione del galattosio ha incrementato la disponibilità orale del Ketorolac.

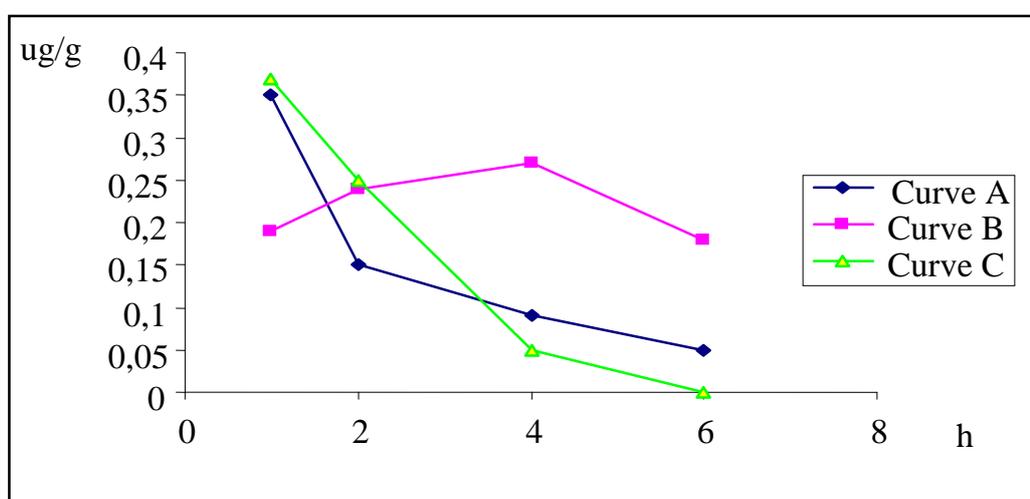


**Fig. 11** Livelli di farmaco nel sangue dopo somministrazione di Ketorolac (Curva A) e di Ketogal (Curva B).

Infatti i livelli plasmatici del farmaco, in seguito a somministrazione del Ketogal, risultano maggiori di quelli osservati in seguito a somministrazione del farmaco tal quale (**Fig. 11**). Nel plasma, inoltre, non

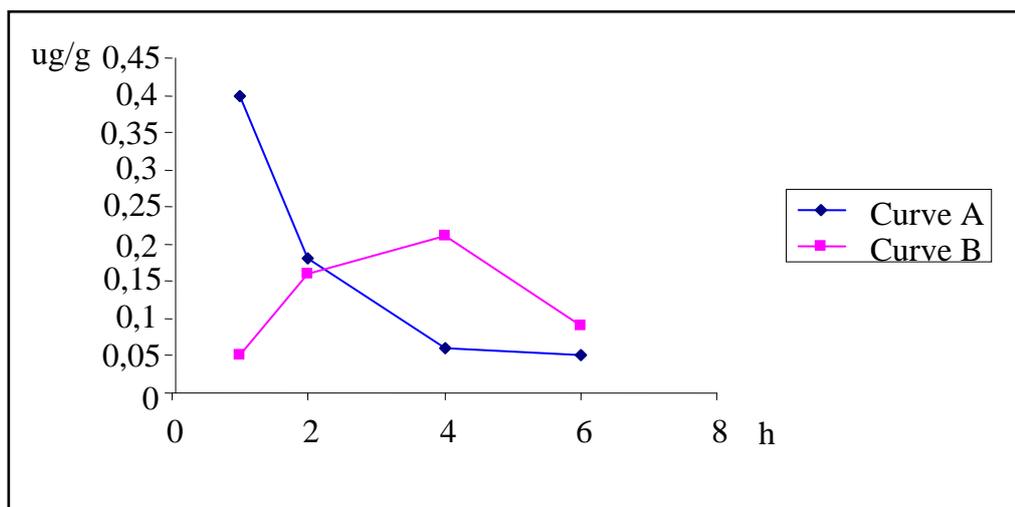
è presente il profarmaco, indice, probabilmente, del fatto che l'idrolisi avviene a livello gastrico e intestinale.

Nello stomaco, infatti, (**Fig. 12**) è evidente come il Ketogal (curva C) si idrolizza progressivamente, rilasciando il Ketorolac (curva B), la cui concentrazione resta all'incirca costante nel tempo e addirittura superiore, dopo 2 ore, a quella ottenuta in seguito alla somministrazione del farmaco tal quale (curva A).



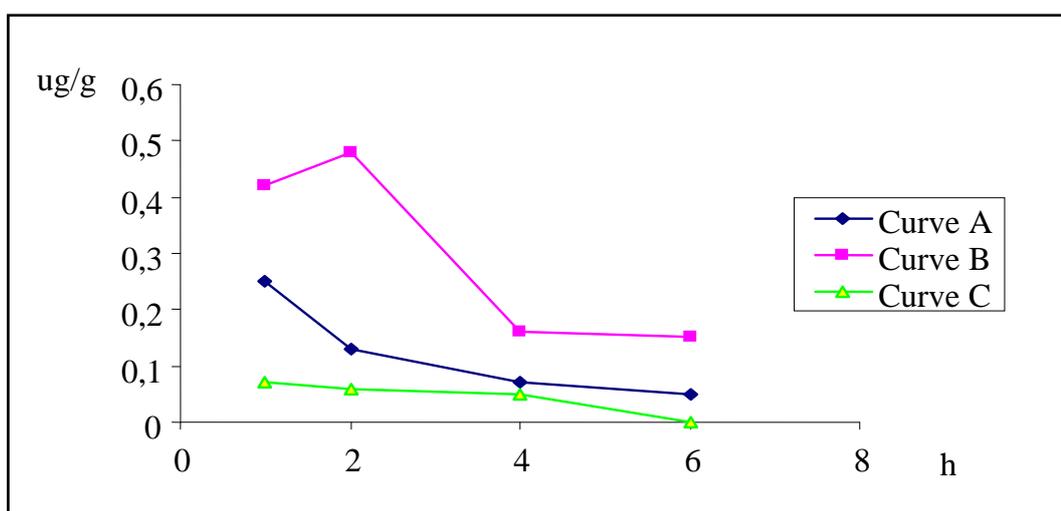
**Fig. 12** Livelli di farmaco nello stomaco dopo somministrazione di Ketorolac (Curva A) e di Ketogal (Curva B). Livelli di Ketogal (Curva C).

Il rene ha mostrato un profilo simile a quello dello stomaco, con la differenza che la maggiore concentrazione di Ketorolac, dopo la somministrazione di Ketogal, si ha dopo tre ore, rispetto alla somministrazione del farmaco tal quale (**Fig. 13**). Non ci sono, inoltre, tracce del profarmaco.



**Fig. 13** Livelli di farmaco nel rene dopo somministrazione di Ketorolac (Curva A) e di Ketogal (Curva B).

Invece, nel fegato (**Fig. 14**), il Ketogal riappare (Curva C) segno di un probabile riciclo entero-epatico del profarmaco, e la concentrazione di Ketorolac è sempre più alta in seguito a somministrazione del Ketogal (Curva B) rispetto a quella del farmaco da solo (Curva A).



**Fig. 14** Livelli di farmaco nel fegato dopo somministrazione di Ketorolac (Curva A) e di Ketogal (Curva B). Livelli di Ketogal (Curva C).

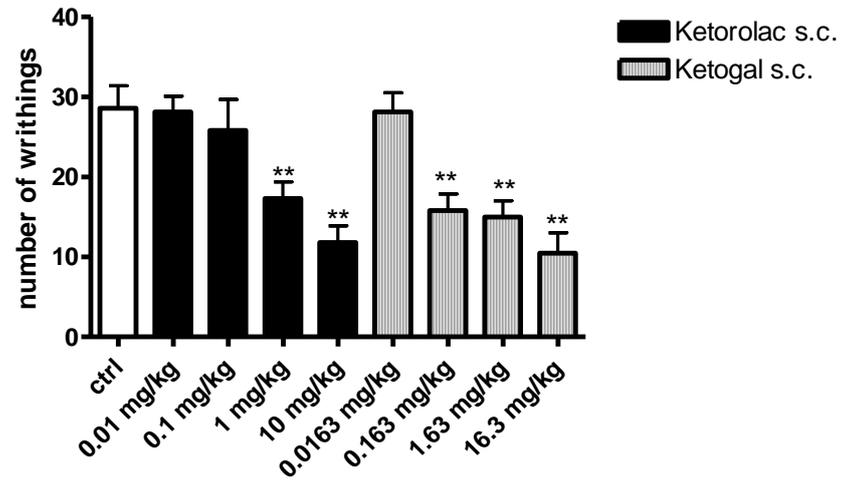
### 3.1.3.5 Attività analgesica

L'attività analgesica è stata studiata utilizzando il "writhing test" da acido acetico. Ai topi è somministrato per via intraperitoneale 1 mL di soluzione all'1% di acido acetico ed il numero di stiramenti è valutato per 20 min, dopo 5 minuti dalla somministrazione della soluzione di acido acetico. Uno stiramento è definito come una contrazione dei muscoli addominali accompagnata dall'allungamento del corpo e delle zampe posteriori. Il Ketorolac ed il Ketogal sono stati somministrati per via orale o per via sottocutanea 60 minuti prima della somministrazione della soluzione di acido acetico. L'effetto analgesico è espresso in numero di stiramenti rispetto al controllo.

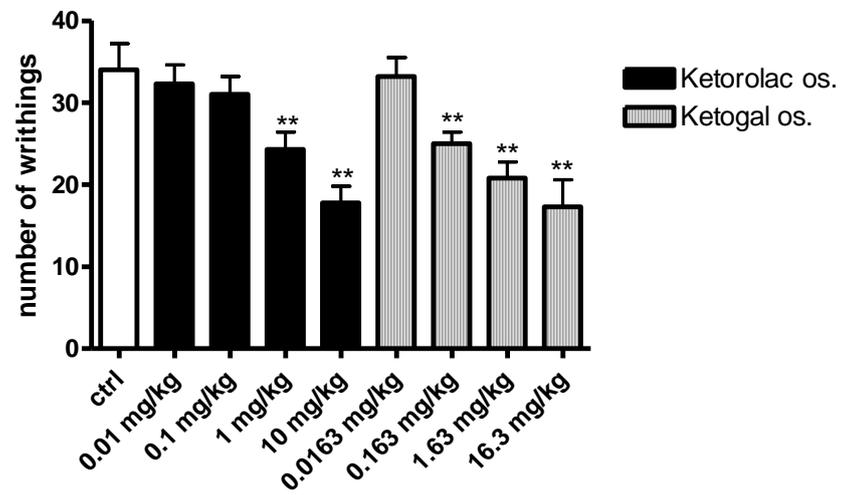
Il Ketorolac (0.01-10 mg/Kg, s.c. e os,) ha provocato un effetto analgesico dose-dipendente. In particolare l'effetto è significativo alle dosi di 1 e 10 mg/Kg ( $p < 0.01$ ). Il Ketogal, (0.0163-16.3 mg/Kg, s.c. e os) mostra un effetto analgesico dose dipendente maggiore già a 0.163 mg/Kg. **(Fig. 15A e 15B).**

## H-Ac writhing test

A



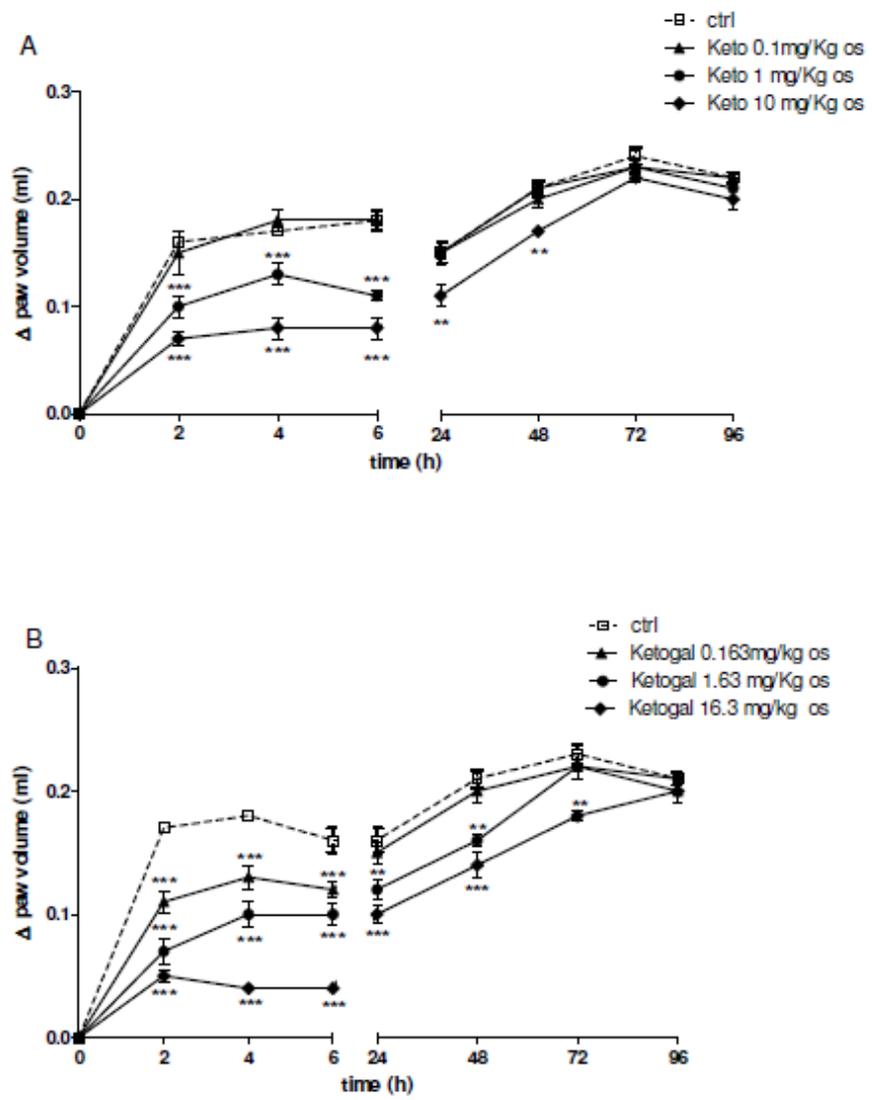
B



**Fig. 15** *Attività analgesica.*

### 3.1.3.6 Attività anti-infiammatoria

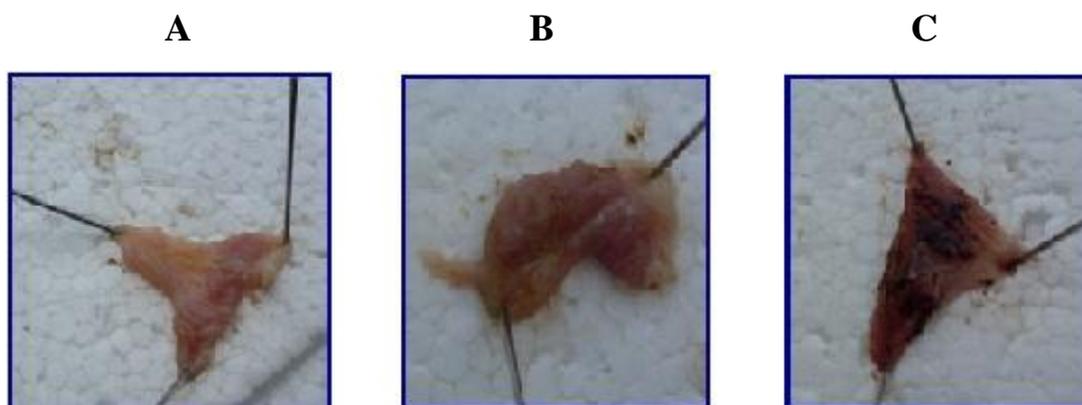
L'attività anti-infiammatoria è stata testata mediante il test dell'edema da carragenina. I topi sono stati divisi in gruppi da sei. I volumi iniziali della zampa di tutti gli animali sono stati misurati utilizzando uno pletismometro. L'edema viene indotto sulla zampa mediante iniezione sub plantare di 50 µl di soluzione salina contenente l'1% di carragenina. Il volume della zampa è stato misurato a diversi intervalli di tempo. In tale modello sperimentale si sviluppano due fasi: una prima fase acuta di 6 ore ed una seconda fase cronica, fino a 72 ore. Il trattamento con Ketogal (0.163-16.3 mg/Kg os), 1 h prima dell'iniezione di carragenina, riduce notevolmente l'edema della zampa in maniera tempo-dipendente. Anche in questo caso il Ketogal mostra un effetto anti-infiammatorio maggiore già a 0.163 mg/Kg. Durante la prima fase tutte le dosi testate inibiscono la formazione dell'edema, mentre la dose più bassa di Ketorolac non ha alcun effetto (0.1 mg/Kg). Infine, l'effetto del Ketogal continua anche nella seconda fase, dimostrando un effetto più prolungato da parte del profarmaco (**Fig. 16A e 16B**).



**Fig. 16** Attività anti-infiammatoria.

### 3.1.3.7 Tossicità stomaco, fegato e reni

Per verificare l'opportunità di una somministrazione di Ketogal a lungo termine, sono stati effettuati anche studi di tossicità. Esperimenti cronici e sub-cronici sono stati condotti trattando topi maschi Swiss con le dosi più elevate di Ketorolac (10 mg/Kg) e di Ketogal (16.3 mg/Kg), somministrati per via orale per 3, 5, 7 giorni. Gli animali sono stati sacrificati, sono stati prelevati stomaco, fegato e reni e analizzati istologicamente e chimicamente. Gli stomaci di topi trattati per 3 giorni con Ketorolac hanno presentato un alto grado di ulcerogenicità a differenza di quelli tratti con Ketogal, che risultano simili al controllo (**Fig. 17**).

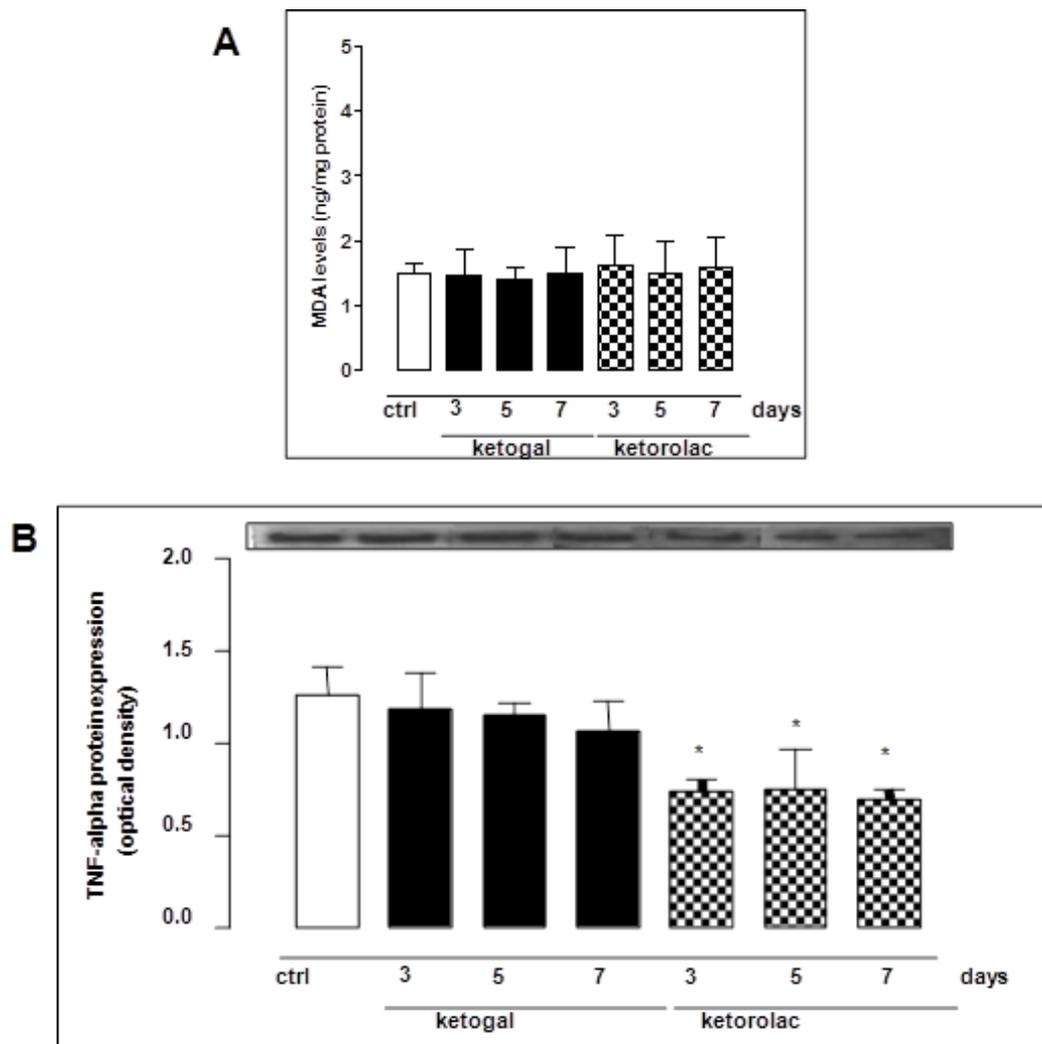


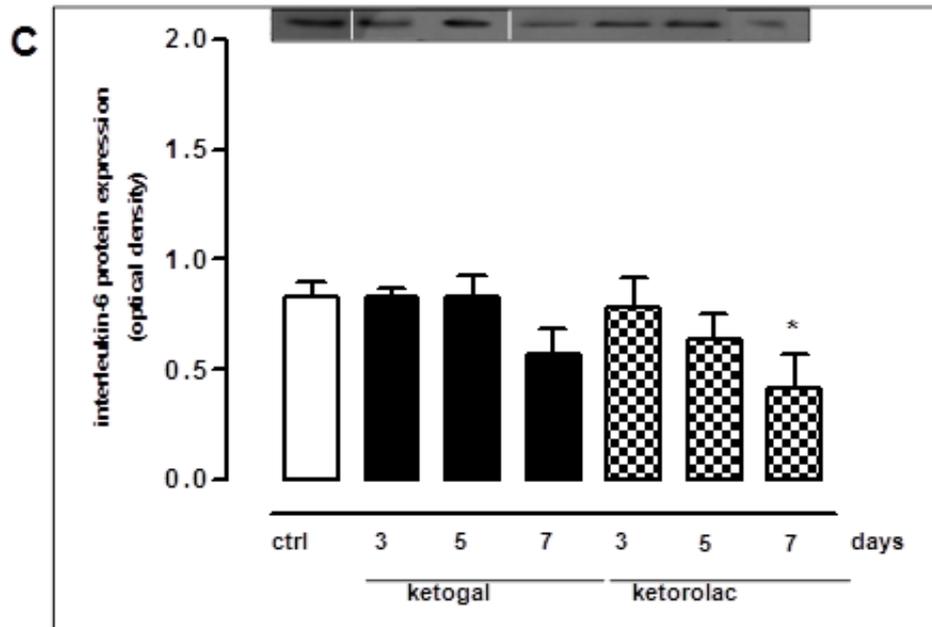
**Fig. 17** A: controllo; B:trattamento con Ketorolac; C: trattamento con Ketogal.

Campioni di fegati sono stati fissati in formalina tamponata al 10% ed inclusi in paraffina, tagliati e colorati con ematossilina e eosina (H & E) per la valutazione delle patologie del fegato. I topi trattati con Ketogal avevano un' istologia normale del fegato rispetto a quelli dei topi controllo: erano assenti aree necrotiche, infiammazioni, dilatazioni sinusoidale e congestioni. Per confermare i dati istologici, sono stati poi eseguiti sui lisati di fegato il test della malondialdeide, l'analisi Western Blot per il TNF-alfa, e per l'IL-6. Analisi biochimiche confermano che topi trattati

con Ketogal non avevano nessuna infiammazione epatica e/o danni, dal momento che il TNF-alfa, IL-6 e dei livelli di perossidazione lipidica non erano diversi rispetto ai topi controllo (**Fig. 18**).

I topi trattati sia con ketogal che con Ketorolac avevano un'istologia renale normale rispetto ai topi controllo, dopo 3, 5, 7 giorni.





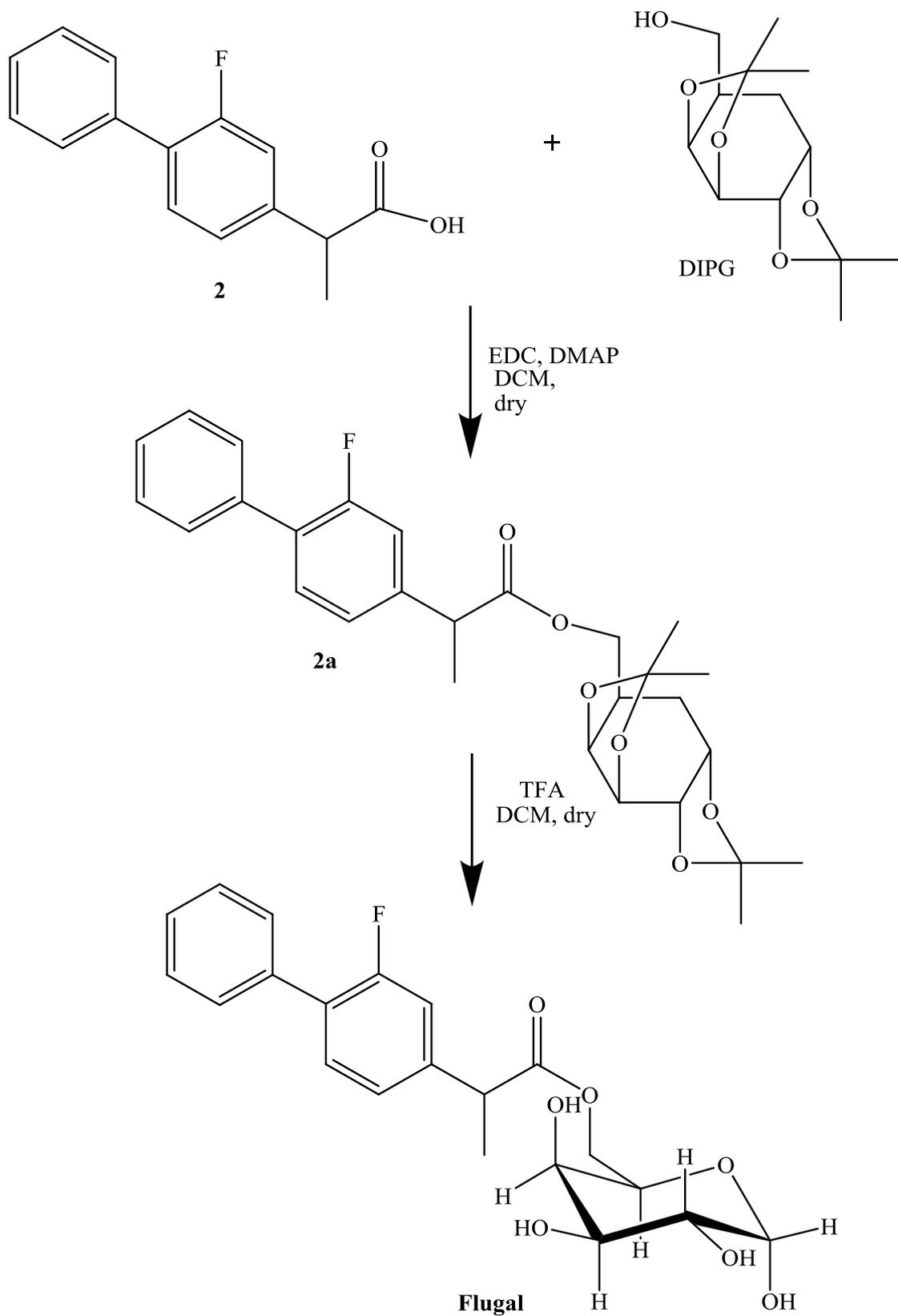
**Fig. 18** A: livelli di perossidazione lipidica; B: espressione del TNF-alpha; C: espressione dell' IL-6.

### 3.1.4 Flugal

#### 3.1.4.1 Sintesi

Il Flugal viene sintetizzato esterificando il gruppo carbossilico del Flurbiprofene con l'ossidrile in posizione 6' del galattosio. A questo scopo viene utilizzato l'1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (DIPG), in cui le quattro funzioni ossidriliche non interessate alla reazione sono protette dai chetali.

La reazione di esterificazione tra il Flurbiprofene **2** e il DIPG viene condotta in presenza di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide cloridrato (EDC), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), come catalizzatore, in diclorometano anidro. Il coniugato protetto **2a** viene così ottenuto con una resa del 61%. I chetali vengono completamente rimossi mediante acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, in modo da ottenere il **Flugal**, con una resa del 53% (**Schema 2**).



**Schema 2**

### 3.1.4.2 Stabilità chimica ed enzimatica

Gli studi stabilità sono stati eseguiti come precedentemente descritto per il Ketogal. Dai risultati ottenuti, mostrati in **Tabella 4**, si evince che la stabilità chimica a pH 7.4 è risultata maggiore di 8 ore, come anche quella a pH 1. L'emivita enzimatica del profarmaco, invece, è risultata di circa 1 ora.

In questo modo il Flurbiprofene non sarà liberato velocemente a livello gastrico, causando i classici effetti collaterali, e potrà espletare la sua azione farmacologica una volta raggiunto il circolo sanguigno.

Composto	pH 7.4	pH 1	Plasma
	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)
Flugal	> 8	>8	1

**Tabella 4.** *Stabilità chimica ed enzimatica del Flugal*

### 3.1.4.3 Ulcerogenicità

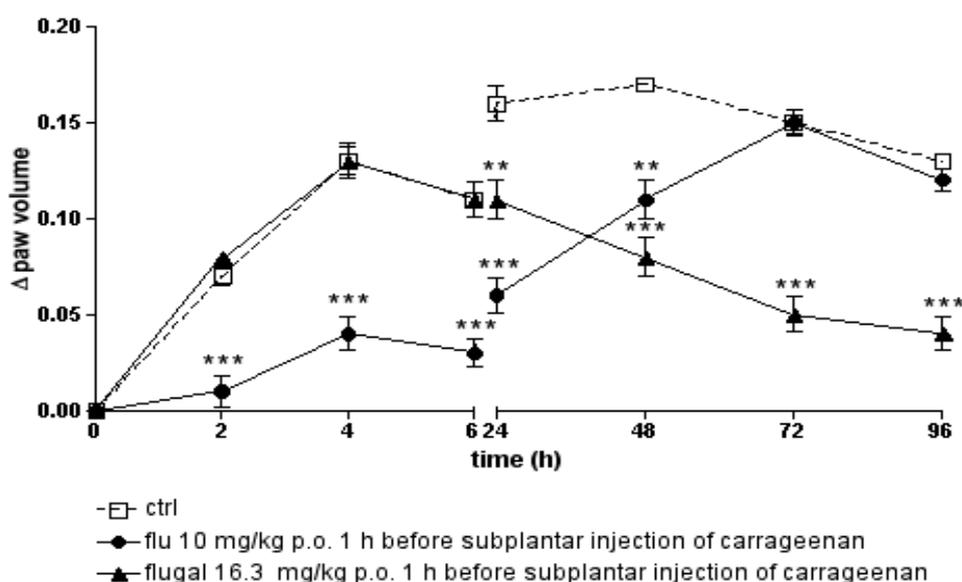
Lo studio dell'attività ulcerogena ha mostrato per il Flugal una netta diminuzione delle proprietà gastrolesive, in confronto al Flurbiprofene, in seguito a somministrazione equimolare dei due composti; infatti il Flugal ha mostrato solo una lieve irritazione della mucosa gastrica, con una quasi totale assenza di ulcere (**Tabella 5**).

<b>Composto</b>	<b>Dose orale (mg/Kg)</b>	<b>Numero di ulcere</b>	<b>Grado di ulcerogenicità</b>
<b>Controllo (CMC 0.5%)</b>	—	0	—
<b>Flurbiprofene</b>	10	3±1.5	2
<b>Flugal</b>	16.3	1±1	0

**Tabella 5.** *Ulcerogenicità*

### 3.1.4.4 Attività anti-infiammatoria

L'attività anti-infiammatoria è stata testata mediante il test dell'edema da carragenina. Il trattamento con Flurbiprofene (10 mg/Kg) ha inibito in modo significativo la formazione dell'edema entro le 48 h dopo l'iniezione di carragenina. La dose equimolare di Flugal (16.3 mg/Kg), invece, non provoca nessuna modifica sull'edema nella prima fase (0-6 h), mentre produce un significativo effetto anti-infiammatorio durante la seconda fase (24-96 h) (Fig. 19).



**Fig. 19** Attività anti-infiammatoria

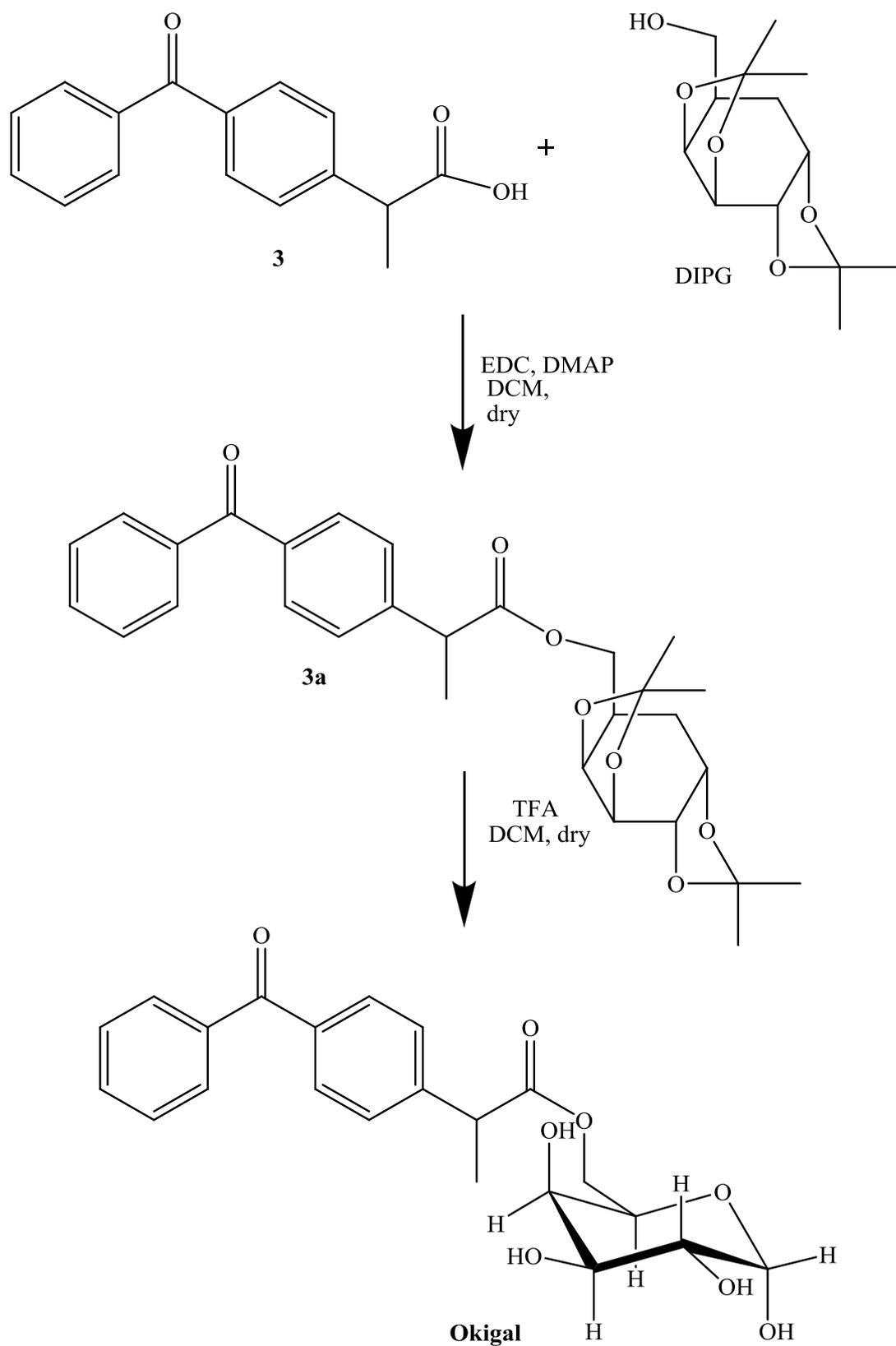
Il Flugal ha quindi dimostrato di non avere di per sé un'attività anti-infiammatoria, in quanto non agisce sulla prima fase, ma è in grado di rilasciare nel tempo il farmaco attivo, prolungandone la durata d'azione.

### 3.1.5 Okigal

#### 3.1.5.1 Sintesi

L'Okigal viene sintetizzato esterificando il gruppo carbossilico del Ketoprofene con l'ossidrile in posizione 6' del galattosio. A questo scopo viene utilizzato l'1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (DIPG), in cui le quattro funzioni ossidriliche non interessate alla reazione sono protette dai chetali.

La reazione di esterificazione tra il Ketoprofene **3** e il DIPG viene condotta in presenza di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide cloridrato (EDC), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), come catalizzatore, in diclorometano anidro. Il coniugato protetto **3a** viene così ottenuto con una resa del 51%. I chetali vengono completamente rimossi mediante acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, in modo da ottenere l'Okigal, con una resa del 55% (**Schema 3**).



**Schema 3**

### 3.1.5.2 Stabilità chimica ed enzimatica dell'Okigal

Con la stessa procedura utilizzata per il profarmaco Ketogal e Flugal, sono state studiate le stabilità chimica ed enzimatica del profarmaco Okigal.

Dai risultati ottenuti, mostrati nella **Tabella 6**, si può stabilire per l'Okigal, come per il Flugal, una buona stabilità chimica, che ne permette la somministrazione per via orale. In questo modo il Ketoprofene non sarà liberato velocemente a livello gastrico, causando i classici effetti collaterali, ma potrà espletare la sua azione farmacologica una volta raggiunto il circolo sanguigno. Inoltre, rispetto al Flugal, l'Okigal presenta un'emivita plasmatica maggiore, garantendone una maggiore durata d'azione.

Composto	pH 7.4	pH 1	Plasma
	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)
Okigal	>8	>8	4

**Tabella 6.** *Stabilità chimica ed enzimatica dell'Okigal*

### 3.1.5.3 Ulcerogenicità dell'Okigal

Gli esperimenti sono stati condotti come quelli descritti precedentemente per gli altri profarmaci. Sono stati somministrati per via orale il Ketoprofene (10 mg/Kg), l'Okigal (16.3 mg/Kg) o il veicolo (CMC, 0.5%).

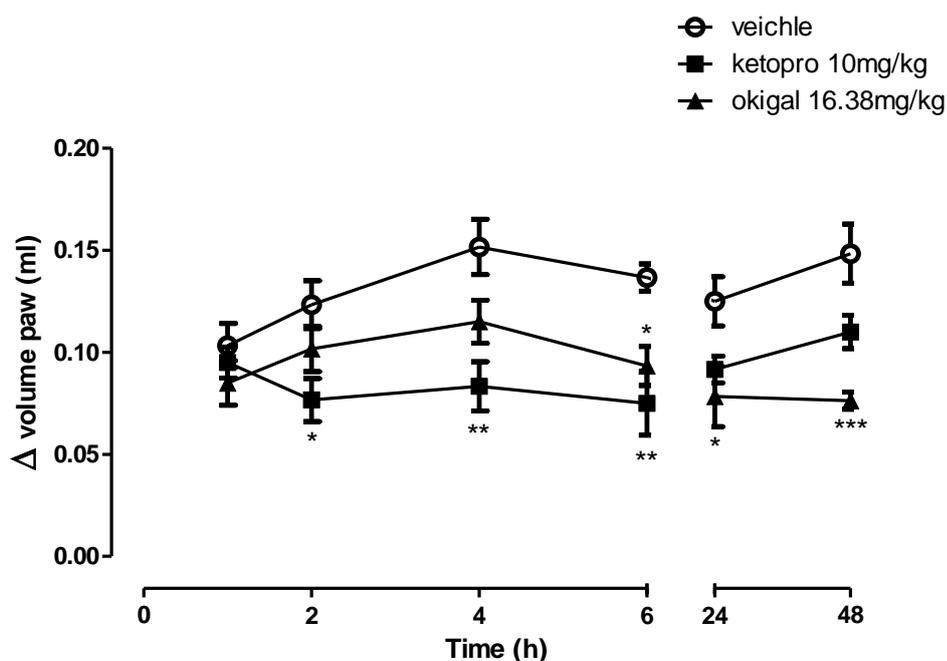
<b>Composto</b>	<b>Dose orale (mg/Kg)</b>	<b>Numero di ulcere</b>	<b>Grado di ulcerogenicità</b>
<b>Controllo (CMC 0.5%)</b>	—	0	—
<b>Ketoprofene</b>	10	6±1.1	2
<b>Okigal</b>	16.3	2±1.2	0

**Tabella 7.** *Ulcerogenicità dell'Okigal e del Ketoprofene*

Dai risultati descritti nella **Tabella 7** si evince come anche l'Okigal mostri una netta diminuzione delle proprietà gastrolesive, in confronto al Ketoprofene, in seguito a somministrazione equimolare dei due composti.

### 3.1.5.4 Attività anti-infiammatoria dell'Okigal

Anche l'attività anti-infiammatoria dell'Okigal è stata testata mediante il test dell'edema da carragenina, come descritto nel paragrafo 3.2.6. Il trattamento con Ketoprofene (10 mg/Kg) ha inibito in modo significativo la formazione dell'edema entro le 48 h dopo l'iniezione di carragenina. La dose equimolare di Okigal (16.3 mg/Kg), invece, ha solo una moderata azione sull'edema nella prima fase (0-6 h), mentre produce un significativo effetto anti-infiammatorio durante la seconda fase (24-96 h) (**Fig. 20**). Come per il Flugal, anche l'Okigal ha mostrato un effetto farmacologico a lungo termine.



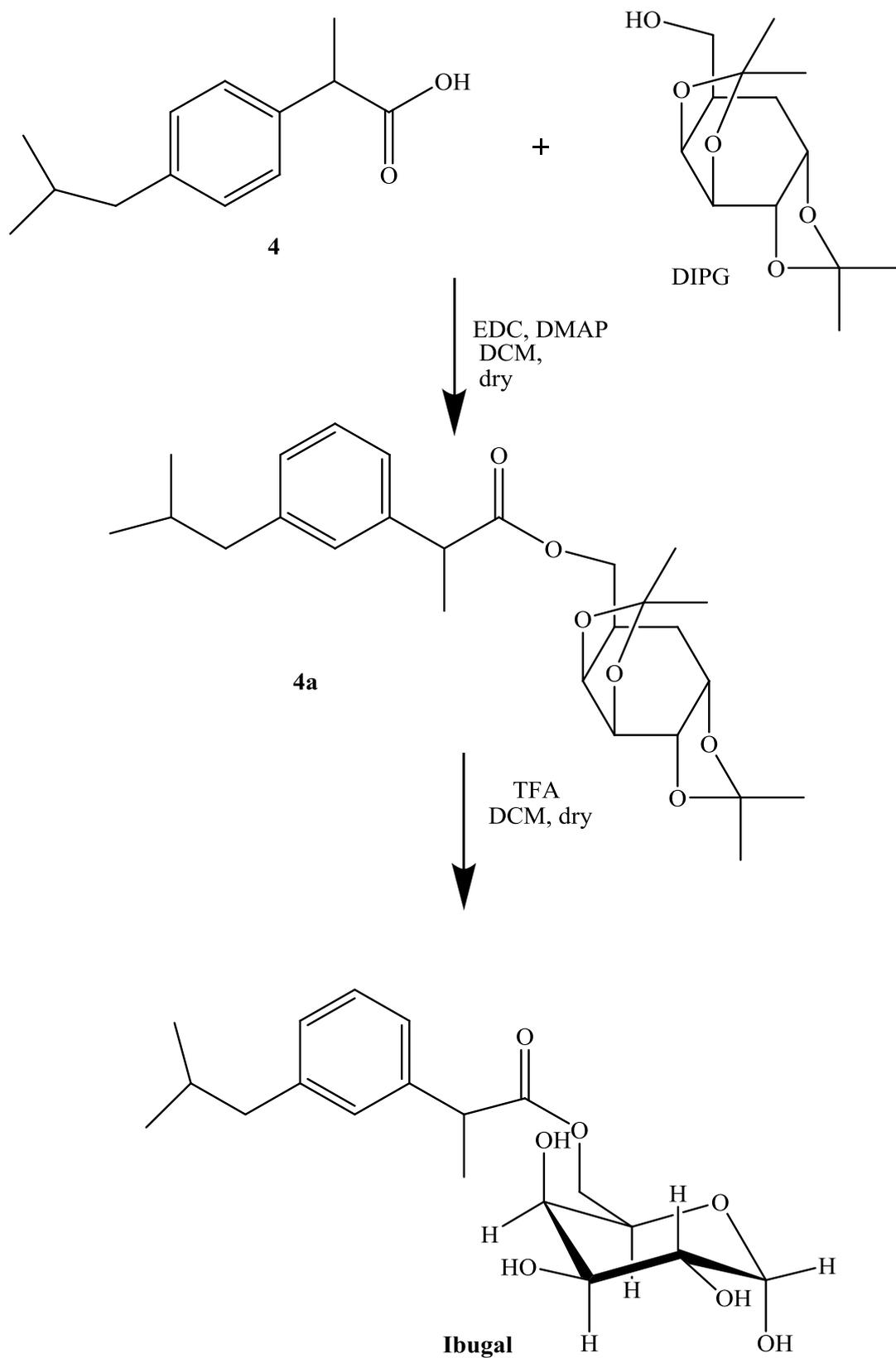
**Fig. 20** Attività anti-infiammatoria dell'Okigal.

## 3.1.6 Ibugal

### 3.1.6.1 Sintesi

L'Ibugal viene sintetizzato esterificando il gruppo carbossilico del Ibuprofene con l'ossidrile in posizione 6' del galattosio. Viene sempre utilizzato l'1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (DIPG), in cui le quattro funzioni ossidriliche non interessate alla reazione sono protette dai chetali.

La reazione di esterificazione tra l'Ibuprofene **4** e il DIPG viene condotta in presenza di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide cloridrato (EDC), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), come catalizzatore, in diclorometano anidro. Il coniugato protetto **4a** viene così ottenuto con una resa del 49%. I chetali vengono completamente rimossi mediante acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, in modo da ottenere l'**Ibugal**, con una resa del 53% (**Schema 4**).



**Schema 4**

### 3.1.6.2 Stabilità chimica ed enzimatica dell'Ibugal

Le stabilità chimica ed enzimatica sono state studiate anche per il profarmaco Ibugal.

I risultati ottenuti, mostrati nella **Tabella 8**, sono di un profarmaco molto stabile, con un'emivita sia chimica che enzimatica superiore alle 24 h.

Composto	pH 7.4	pH 1	Plasma
	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)
Ibugal	> 24	>24	>24

**Tabella 8.** *Stabilità chimica ed enzimatica dell'Ibugal*

Per questi motivi, non è stato possibile saggiare l'attività farmacologica dell'Ibugal. Attualmente la nostra attenzione è focalizzata verso l'attività antiproliferativa di questo profarmaco. Studi ancora in corso sembrano dimostrare che l'attività anti-proliferativa dell'Ibugal è superiore a quella dell'Ibuprofene, probabilmente per la sua maggiore capacità di penetrare le membrane cellulari tumorali, grazie alla iper-espressione dei GLUT1.

### 3.1.7 Conclusione sui profarmaci galattosilati dei FANS

La protezione del gruppo carbossilico con una molecola di galattosio permette la riduzione del carattere ulcerogenico dei farmaci.

Inoltre, la farmacocinetica di questi profarmaci, dopo somministrazione orale, li rende un dispositivo a rilascio controllato che evita l'accumulo di *parent drug* nello stomaco permettendo al farmaco di agire già a basse dosi, senza effetti tossici. Lo sviluppo dei parametri farmacocinetici ha portato ad un miglioramento dell'attività farmacologica, sia anti-infiammatoria che analgesica, maggiore per il Ketogal. La coniugazione del galattosio agli altri farmaci anti-infiammatori (Flurpiprofene, Ketoprofene) non ha portato agli stessi risultati. Tali profarmaci hanno mostrato, rispetto al Ketogal, una maggiore stabilità a pH acido, provocando un ritardo sull'attività, rispetto ai farmaci liberi, seguito però da un prolungamento dell'azione farmacologica. Gli esperimenti farmacologici sull'edema da carragenina, infatti, hanno dimostrato che il Flugal (16.3 mg/Kg) e l'Okigal (16.3 mg/Kg) sono più attivi rispettivamente del Flurbiprofene (10 mg/Kg) e del Ketoprofene (10 mg/Kg) nella seconda fase del test, confermando il concetto di profarmaco il quale di per sé è un composto inattivo in grado di mascherare gli effetti tossici del *parent drug* e di rilasciarlo nel tempo espletando la sua attività farmacologica. L'attività ulcerogenica è, invece, ugualmente diminuita.

Tali composti sono dotati di una buona stabilità sia chimica che enzimatica rendendoli non solo dei profarmaci efficaci e maneggevoli, ma anche somministrabili per via orale, data la loro resistenza a pH acido.

Questa loro caratteristica li rende capace di annullare quasi del tutto l'ulcerogenicità, non solo proteggendone la funzione carbossilica, ma anche rilasciando il farmaco in maniera progressiva nello stomaco e

favorendone il passaggio nel circolo sanguigno. I dati farmacocinetici per il Ketorolac, infatti, confermano un aumento della biodisponibilità orale in seguito alla somministrazione di Ketogal. La presenza del profarmaco nel fegato, inoltre, è indice di un riciclo entero-epatico che permette un rilascio continuo e costante nel tempo di Ketorolac, con il conseguente aumento della sua emivita. Inoltre, gli studi istologici su stomaco, fegato e reni, in seguito a somministrazione cronica dei due composti, hanno dimostrato il basso grado di tossicità e l'efficacia della strategia del profarmaco.

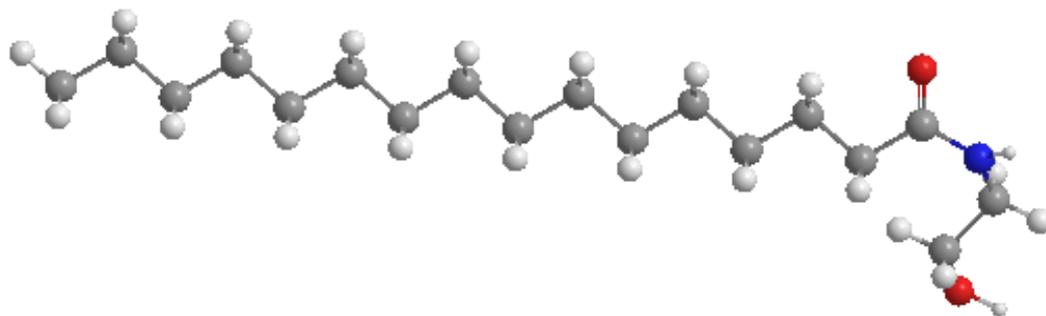
Il prossimo passo sarà quello di verificare, mediante saggi di *binding*, la possibilità di un'attività diretta sulle COX da parte del Ketogal. Inoltre, dato i buoni risultati ottenuti per il Ketogal saranno approfonditi anche gli studi per Flugal e Okigal. Saranno dosate, mediante opportune tecniche cromatografiche, la quantità di Flugal, di Okigal e dei farmaci corrispondenti, nei vari distretti anatomici: sangue, stomaco, fegato e reni, in modo da delineare un profilo farmacocinetico per ogni profarmaco sintetizzato. Infine, dato il progressivo utilizzo del Flurbiprofene e del Ketoprofene nella terapia del dolore, verranno eseguiti esperimenti farmacologici in grado di verificare anche l'attività analgesica dei profarmaci neo-sintetizzati.

## 3.2 Peagal

### 3.2.1 Introduzione : la Palmitoiletanolamide

Questa mia attività di ricerca è stata svolta presso i laboratori della Facoltà di *Farmácia* della “*Universidade Federal do Ceará*” di Fortaleza (Brasile), in quanto vincitrice di una borsa di studio Erasmus Mundus External Cooperation Window, dove sono stata ospitata presso i laboratori della prof.ssa Gilvandete Maria Pinheiro Santiago.

La palmitoiletanolamide (PEA) è un composto che viene proposto come agonista endogeno per il recettore nucleare PPAR- $\alpha$ . E' stata ampiamente studiata per le sue proprietà analgesiche ed anti-infiammatorie, entrambi dipendenti dall'espressione di questo recettore.



Questa molecola di natura lipidica ha un importante ruolo nel controllo della genesi del dolore in periferia (*Calignano A., 2001; Jaggar S.I., 1998*) e dei fenomeni infiammatori (*Aloe L., 1993*). La PEA, amide dell'acido palmitico e dell'etanolamina (*Kuehl F.A., 1957; Bachur N.R., 1965*) è un composto endogeno presente largamente negli organismi viventi animali e vegetali (*Di Marzo V., 1997*)

La PEA, biologicamente, può anche subire inattivazione attraverso un'idrolisi operata dalla “N-Acylethanolamine-hydrolyzing Acid Amidase” (NAAA) per formare l'acido palmitico e l'etanolamina (*Puffenbarger R.A., 2005*).

Oltre all'attività antiinfiammatoria, la PEA presenta tutta una serie di effetti farmacologici quali quelli antiepilettici e neuroprotettivi (*Franklin, A., 2003; Sheerin A.H., 2004; Skaper S.D., 1996*), inibisce la presa alimentare (*Rodriguez de Fonseca F., 2001*) riduce la motilità gastrointestinale (*Capasso R., 2001*), la proliferazione cellulare (*De Petrocellis L., 2002; Di Marzo V., 2001*) esplica un'attività di protezione dell'endotelio vascolare in caso di ischemia del miocardio (*Bouchard J.F., 2003*) e infine modula la trasmissione del dolore in periferia (*Calignano A., 1998; Jaggar S.I., 1998*).

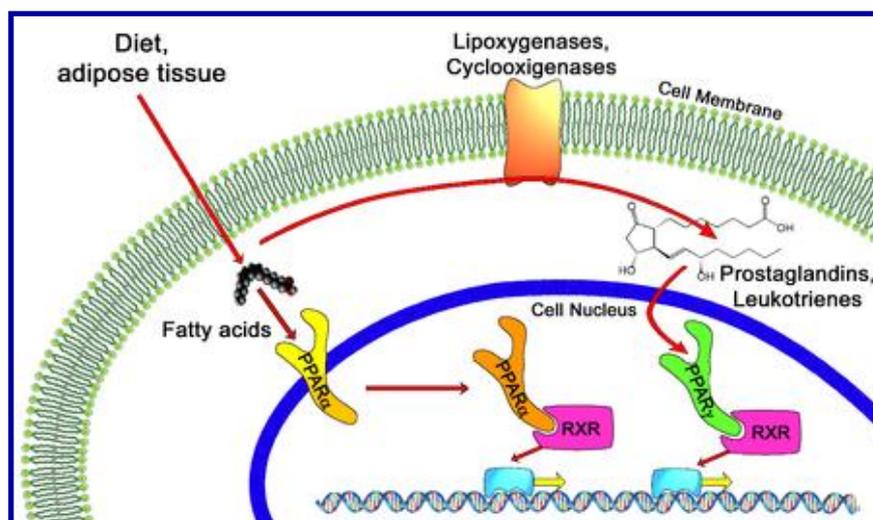
**Meccanismo d'azione.** Diverse proposte sono state avanzate relativamente al meccanismo d'azione della PEA. Alcuni studi hanno suggerito un meccanismo genomico simile a quello dei farmaci anti-infiammatori steroidei (*Costa B., 2002*); tuttavia diversi studi dimostrano che la PEA riduce l'infiammazione acuta in modo rapido (*Conti S., 2002; LoVerme J.L., 2005*). Poiché l'analgesia prodotta da questa aciletanolamide è veloce e precede l'azione di sostanze anti-infiammatorie, è stato ipotizzato che la PEA endogena in condizioni basali sarebbe coinvolta nella regolazione della sensibilità dolorifica (*Calignano A., 1998*). Meno note sono le sue funzioni a livello del sistema nervosa centrale (SNC), dove è presente ad alte concentrazioni. Nonostante il suo elevato potenziale clinico, il recettore responsabile delle proprietà analgesiche ed anti-infiammatorie, rimane sconosciuto.

Inoltre, è stato ampiamente dimostrato come il recettore PPAR- $\alpha$  sia indispensabile per gli effetti analgesici ed antinfiammatori della PEA, suggerendo che questo recettore nucleare sia coinvolto nella regolazione delle fasi iniziali dei fenomeni algesci (*LoVerme J.L., 2005; Isseman I., 1990*).

Inoltre i PPAR- $\alpha$  agonisti, compresa la PEA, eliminano il dolore indotto ai topi mediante sostanze chimiche, compressione dei nervi, o dolore di tipo infiammatorio.

Sia il PPAR- $\alpha$  che la PEA, si trovano nel sistema nervoso centrale (SNC), e possono essere modulati negli stati patologici, come il dolore neuropatico (*Mattace Raso G., 2011*).

**Recettori PPARs.** I recettori attivati dal proliferatore perossisomiale (PPARs) sono appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari (**Fig. 21**) e legano diverse molecole da cui sono attivati, quali, acidi grassi, eicosanoidi e numerose sostanze xenobiotiche strutturalmente diverse, collettivamente conosciute come attivatori perossisomiali.



**Fig. 21** Recettori nucleari PPAR.

Fino ad oggi sono stati identificati tre isotipi recettoriali relativi al gruppo dei recettori PPARs: PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta/\delta$ , PPAR- $\gamma$ .

I recettori PPAR- $\alpha$  sono particolarmente espressi nel tessuto adiposo bruno, nel muscolo scheletrico, nel fegato, nel cuore e nel rene. Recenti

lavori hanno messo in evidenza una scarsa, sebbene significativa, presenza di questi recettori anche a livello centrale.

Il tessuto dove il PPAR- $\gamma$  è principalmente espresso è il tessuto adiposo, ma è presente, sebbene a bassi livelli, anche in numerosi altri tessuti e tipi di cellule, come nella retina, il sistema immunitario, epitelio mammario e colon.

Sono stati trovati livelli del sottotipo recettoriale PPAR- $\delta$ , più elevati rispetto agli altri, in quasi tutti i tessuti presi in esame, ad eccezione del tessuto adiposo, ed è inoltre ampiamente espresso nel cervelletto, nel talamo e nella corteccia cerebellare del ratto.

Diversi dati sperimentali indicano che i sottotipi recettoriali PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  sono coinvolti nella modulazione della risposta infiammatoria sia in vitro che in vivo. La prima indicazione di un possibile ruolo dei PPARs nella modulazione dell'infiammazione, si è avuta con la dimostrazione che il leucotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), un potente eicosanoide pro- infiammatorio chemiotattico, lega il recettore PPAR- $\alpha$  attivando le vie della  $\omega$ - e  $\beta$ -ossidazione con la possibilità di catabolizzare l'LTB<sub>4</sub> stesso.

Topi PPAR- $\alpha$  knock-out (PPAR- $\alpha$ -/-) hanno mostrato risposte infiammatorie prolungate quando stimolati con LTB<sub>4</sub> o con un suo precursore, l'acido arachidonico, proprio per l'assenza di stimolazione su questi processi catabolici. Inoltre, il trattamento con sostanze in grado di legare il recettore PPAR- $\alpha$ , quali gli acidi grassi  $\omega$ -3 ed il clofibrato, ha fatto sì che si osservasse nei macrofagi, e nei granulociti, un incremento del catabolismo dell'LTB<sub>4</sub>.

Si può ritenere, pertanto, che l'attivazione del recettore PPAR- $\alpha$  da parte di agenti anti-infiammatori non steroidei contribuisca alle proprietà anti-infiammatorie, antipiretiche ed analgesiche di queste sostanze attraverso la stimolazione delle vie ossidative cataboliche, di cui, gli eicosanoidi sono

substrato. La riduzione della sintesi di molecole pro-infiammatorie, come l'interleuchina (IL-6) e le prostaglandine, sembra esser parte del controllo dell'infiammazione PPAR- $\alpha$  dipendente.

Recentemente è stata identificata un'azione anti-infiammatoria periferica degli agonisti del PPAR- $\alpha$ , tra cui la PEA, che si verifica a seguito della somministrazione intra-cerebro-ventricolare (i.c.v.) di queste sostanze, probabilmente mediata da un meccanismo spinale. Da qui la necessità di sintetizzare profarmaci in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) e di incrementare la concentrazione cerebrale di PEA, in seguito a somministrazione periferica.

### 3.2.2 Sintesi

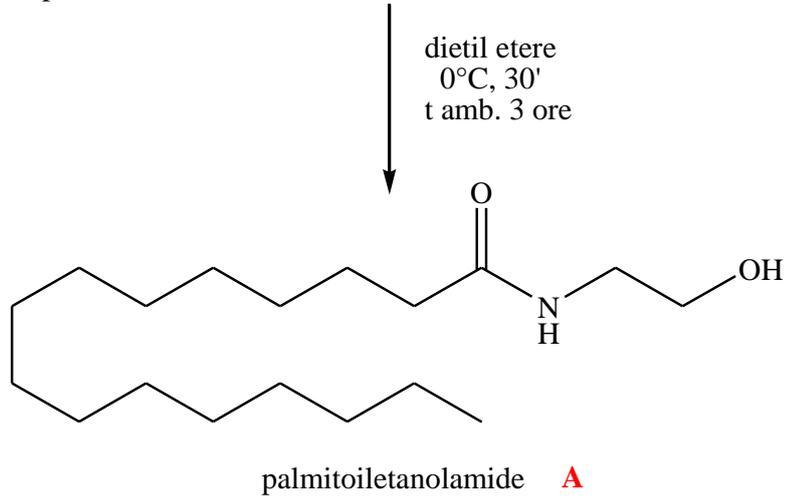
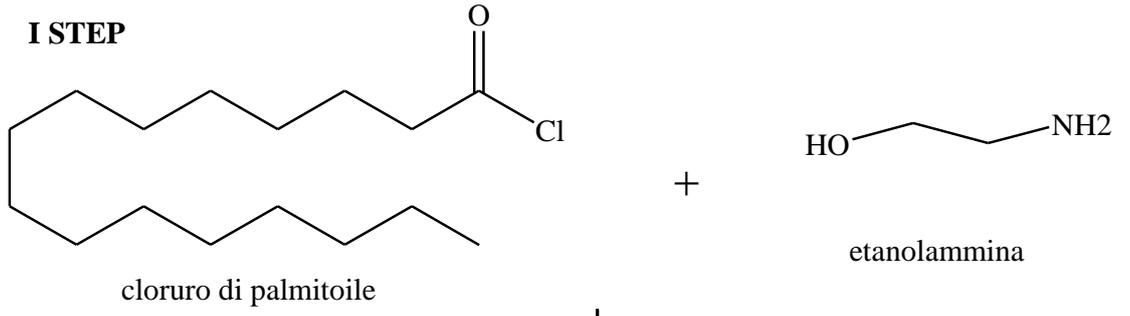
La sintesi della palmitoiletalamide galattosilata avviene in 3 step.

Il primo step di sintesi consiste nella preparazione della palmitoiletanolamide (PEA) **A** facendo reagire il cloruro di palmitoile con l'etanolammina, in etere etilico.

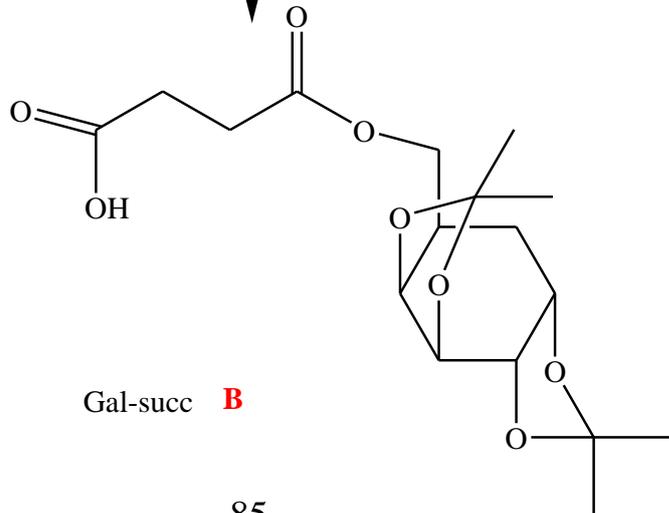
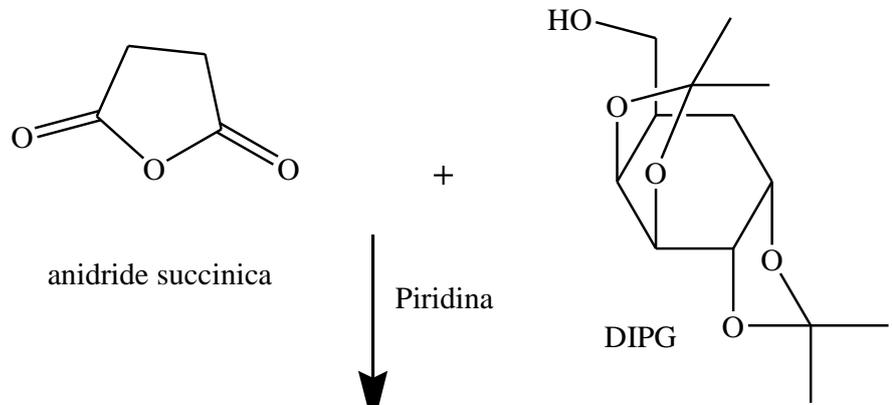
Il secondo step, invece, consiste nella succinazione dell' 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (DIPG) mediante anidride succinica, in piridina anidra, in modo da sintetizzare l'intermedio di reazione GAL-SUCC **B**.

La sintesi di Peagal viene effettuata esterificando il gruppo carbossilico del GAL-SUCC **B** con il gruppo ossidrilico della PEA **A**, ottenendo il coniugato protetto Peagalket. La reazione di esterificazione viene condotta in presenza di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide cloridrato (EDC), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), come catalizzatore, in diclorometano anidro. Il coniugato protetto viene così ottenuto con una resa del 68%. I chetali vengono completamente rimossi mediante acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, in modo da ottenere **Peagal**, con una resa del 52% (**Schema 5**).

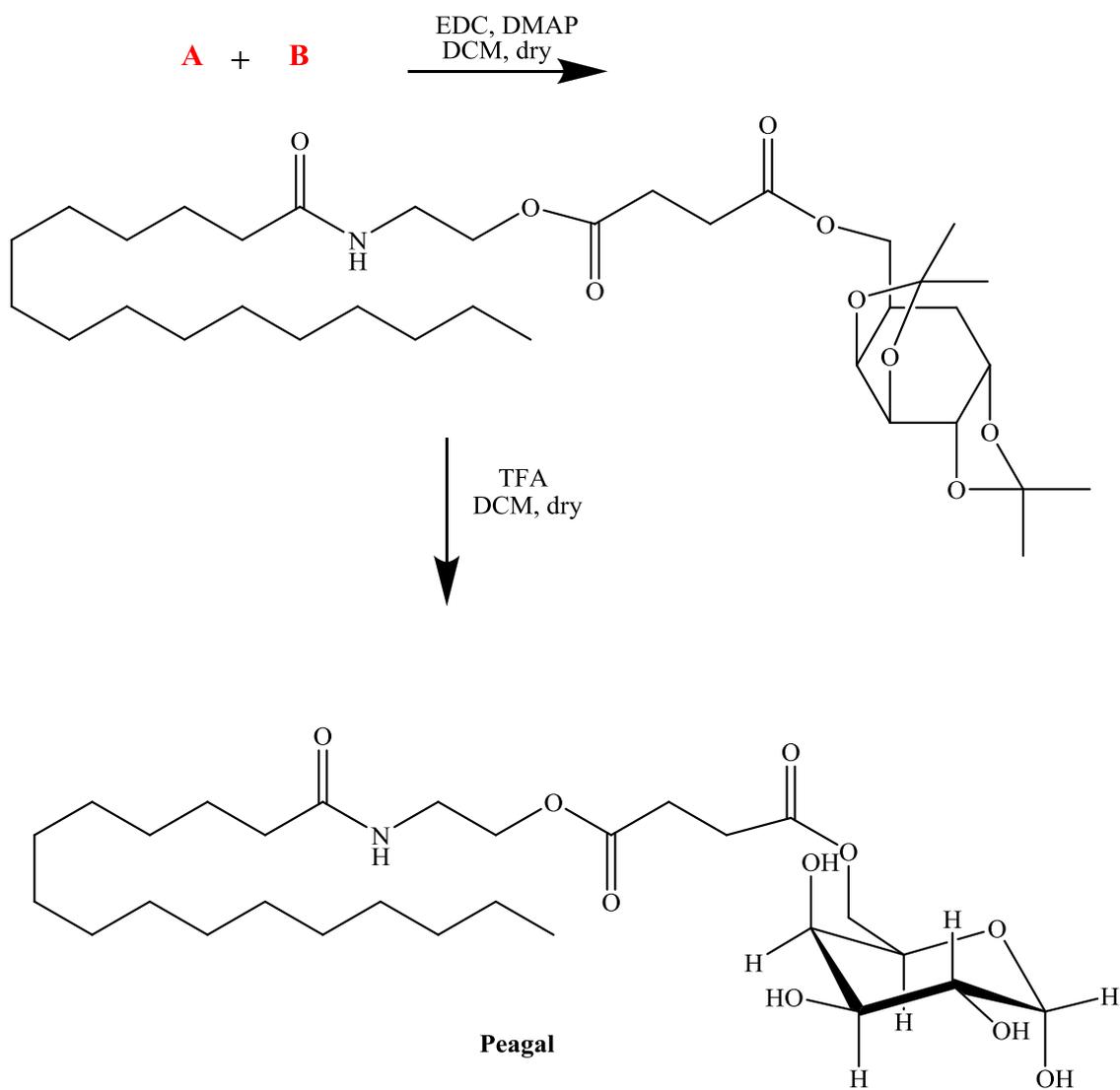
**I STEP**



**II STEP**



### III STEP



**Schema 5**

### 3.2.3 Stabilità chimica ed enzimatica di Peagal

Gli studi di stabilità sono stati effettuati allo stesso modo di come precedentemente descritto per i profarmaci galattosilati dei FANS. In questo caso, però, le aliquote prelevate ogni ora sono state analizzate all'HPLC con rivelatore di massa (LC-MS-MS). L'emivita chimica di Peagal è stata circa di 20 ore. L'emivita enzimatica del profarmaco è di circa 15 minuti. È stata studiata anche la stabilità a pH 1, per poter ipotizzare un'eventuale somministrazione per via orale. L'emivita a pH 1 risulta essere di circa 5 ore.

I risultati degli esperimenti sulla stabilità di Peagal sono riportati in **Tabella 9**.

Composto	pH 7.4	pH 1	Plasma
	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)
Peagal	20	5	0,25

**Tabella 9.** *Stabilità chimica ed enzimatica di Peagal.*

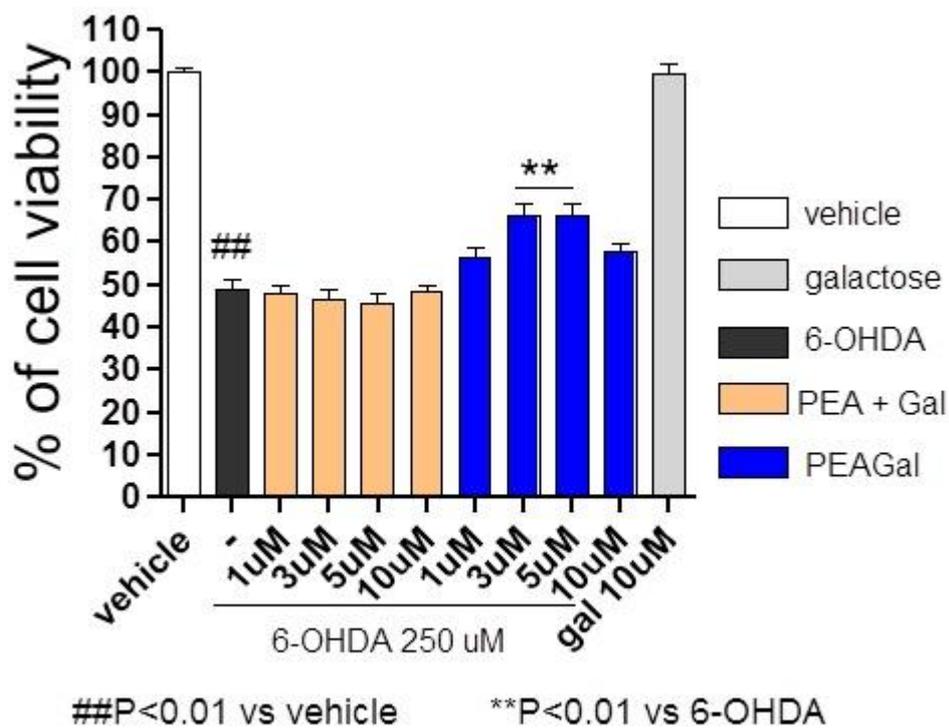
### 3.2.4 Attività citoprotettiva di Peagal

Per l'analisi dell'attività citoprotettiva sono state utilizzate delle cellule di glioma di ratto C6, e cellule di neuroblastoma SH-SY5Y.

Le cellule C6 di glioma di ratto sono state trattate con PEA e Peagal, un'ora prima del trattamento con 6-idrossidopamina (6-OHDA), utilizzata per provocare stress ossidativo. L'incubazione con 6-OHDA è stata protratta per 24 ore. Nelle cellule trattate con PEA è stato aggiunto anche il galattosio, in concentrazioni equimolari rispetto a Peagal. La concentrazione più alta di galattosio (10  $\mu$ M) è stata anche testata da sola, per dimostrare l'assenza di attività dello zucchero tal quale e, quindi, verificare la necessità del legame estereo e la validità dell'approccio del profarmaco.

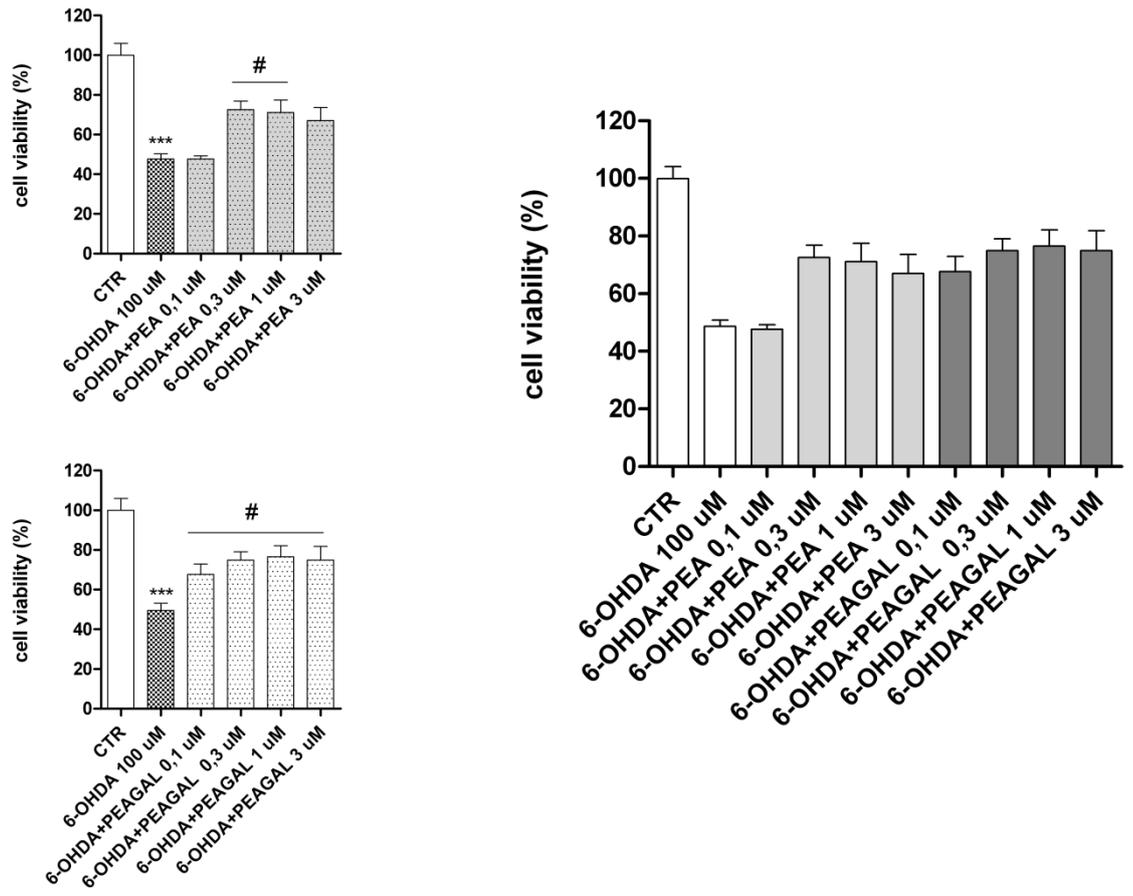
Dopo il trattamento delle cellule C6 con 6-OHDA (250  $\mu$ M), in presenza o in assenza degli altri reattivi, è stata aggiunta una soluzione di MTT [bromuro di 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolo] con una successiva incubazione di 2 ore. In presenza di cellule metabolicamente attive la deidrogenasi mitocondriale è in grado di trasformare l'MTT in derivati formazani colorati, la cui quantificazione viene effettuata misurando la densità ottica a 540 nm. L'attività ottica sarà quindi proporzionale alla vitalità cellulare.

La **Fig. 22** mostra l'attività dose-dipendente della Peagal, e la totale assenza di attività da parte della PEA sulle cellule C6. In questo esperimento è stata anche valutata l'attività del galattosio tal quale per dimostrare che l'attività non fosse dovuta allo zucchero bensì alla strategia del profarmaco.



**Fig. 22** Attività citoprotettiva di PEA e Peagal su cellule C6.

La stessa procedura è stata utilizzata anche per le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y. Dalla **Fig. 23** si evince, invece, l'attività citoprotettiva sia di PEA che di Peagal. Sulle cellule neuronali, infatti, è possibile vedere anche l'attività della PEA.



**Fig. 23** Attività citoprotettiva di PEA e Peagal su cellule neuronali SH-SY5Y.

### 3.2.5 Conclusioni sulla Peagal

La Peagal è un composto dotato di una buona stabilità sia chimica che enzimatica, tale da essere un profarmaco efficace e maneggevole, ma anche somministrabile per via orale, data la sua resistenza a pH acido.

La sua attività citoprotettiva dose-dipendente, superiore a quella della PEA, dimostra la sua maggiore capacità di attraversare le membrane cellulari e di accumulare il farmaco attivo all'interno della cellula e soprattutto questa attività risulta maggiore sulle cellule neuronali.

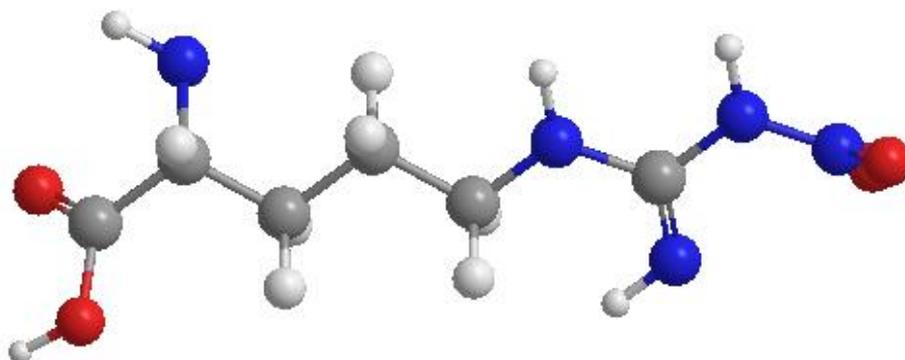
Il prossimo passo sarà quello di eseguire esperimenti *in vivo*, su modelli animali, in modo da confrontare l'attività sia anti-infiammatoria che analgesica di PEA e di Peagal. Inoltre, poiché la PEA, biologicamente, può anche subire inattivazione attraverso un'idrolisi operata dalla NAAA per formare l'acido palmitico e l'etanolamina, si andrà ad investigare se l'utilizzo del galattosio possa interferire con l'attività di questo inibitore.

Infine, per confermare che la maggiore attività di questo profarmaco è legata alla presenza dei GLUT1 presenti sulla membrana citoplasmatica delle cellule, si andrà a bloccare tale passaggio con la citocalasina B che inibisce fortemente i GLUT1, per verificare che questo aumento dell'attività è legato proprio alla presenza di questi trasportatori.

## 3.3 Nagal

### 3.3.1 Introduzione: Nitro-arginina

Fino a non molto tempo fa, si riteneva che la produzione endogena di ossidi dell'azoto-sotto forma di ione nitrato- avvenisse solo nei macrofagi per il ruolo da essi svolgono nel sistema di difesa contro le infezioni da parassiti e batteri. Il monossido d'azoto era considerato solo un gas tossico, presente nello smog. Recenti evidenze hanno, comunque, mostrato che numerose cellule sintetizzano monossido d'azoto e che questa molecola elementare è coinvolta nella regolazione dei sistemi cardiovascolare, immune e nervoso.



Il monossido d'azoto, NO, è un gas stabile, altamente diffusibile, composto da un atomo di azoto ed uno di ossigeno. Esso è sintetizzato da una famiglia di enzimi denominati collettivamente monossido d'azoto sintetasi, NOS.

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  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente, regolato dalle variazioni della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  citosolico, che fa legare la

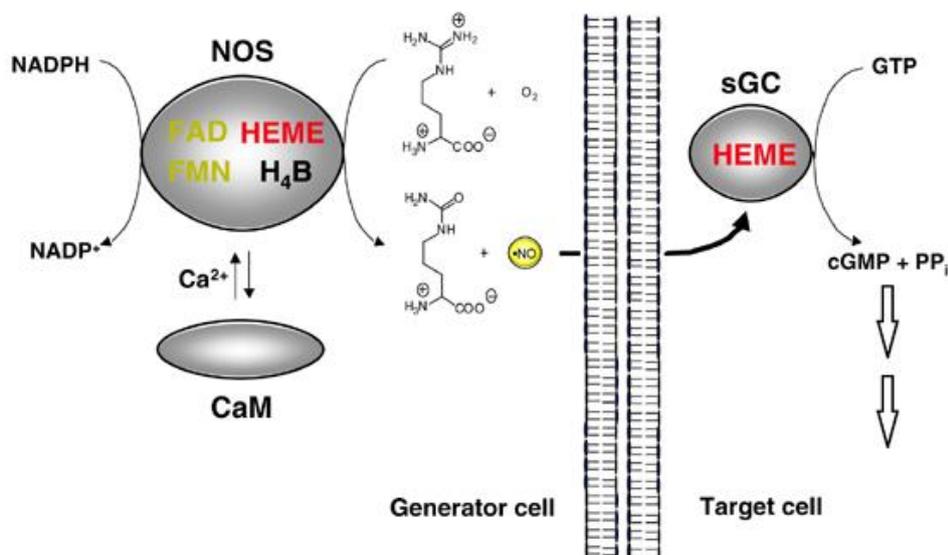
calmodulina, necessaria per l'attivazione di questa isoforma della NOS.

- **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  $\text{Ca}^{2+}$ /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  $\text{Ca}^{2+}$  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 (*Katsung, 2003; Hobbs A.J., 1999; Clementi F. e Fumagalli G., 2004*). Queste tre isoforme sono flavoproteine contenenti gruppi eme, utilizzano L-Arginina come substrato e richiedono come cofattori NADPH, flavin adenin di nucleotide e tetraidrobiopterina.

La formazione di monossido d'azoto dalla L-Arginina e da numerosi donatori è mostrata in **Fig. 24**.



**Fig. 24** *Meccanismo enzimatico della formazione di NO e di azione dell'NO sulla cellula bersaglio.*

L'attivazione della NOS, che si verifica in seguito ad ingresso di calcio extracellulare come nel caso dell'enzima costitutivo, o successivamente all'azione di citochine sulla NOS inducibile, si conclude con la metabolizzazione della L-Arginina in L-Citrullina e monossido d'azoto. La trasformazione di L-Arginina a NO ed L-Citrullina è inibita da molti competitori dell'Arginina come la N-monometil-L-Arginina (L-NMMA).

Una volta generato, l'NO interagisce con il gruppo eme della guanilato ciclasti solubile. Ciò da origine ad una trasformazione allosterica che attiva l'enzima con formazione di GMPC a partire da GTP. L'attivazione della guanilato ciclasti solubile dall'NO può essere inibita dal blu di metilene. L'affinità del monossido d'azoto per il ferro è anche responsabile del suo effetto inibitorio su numerosi enzimi, a causa dell'interazione con i centri ferro-zolfo di questi ultimi. L'inibizione di enzimi come il citocromo P450 da parte del monossido d'azoto è problema principale che si verifica nel

corso delle malattie infiammatorie del fegato e può essere evitato dalla somministrazione da inibitori della NO sintetasi.

L'NO va incontro a reazioni di ossidazione e di riduzione, dando origine a molti ossidi dell'azoto. Fino a non molto tempo fa veniva unanimemente accettato che l'NO fosse generato nei tessuti esclusivamente durante il metabolismo della L-Arginina. Nuove evidenze mostrano come l'NO sia anche generato non-enzimaticamente per reazioni dirette di disproporzione o riduzione dello ione nitrato a NO. Questo avviene in condizioni di reazioni acide o riducenti, ad esempio come avviene successivamente ad ischemia.

L'NO inibisce l'attività enzimatica di alcune emoproteine ed è inattivato dal radicale libero superossido. Pertanto, i bloccanti dell'anione superossido, come la superossido dismutasi, possono proteggere il monossido d'azoto aumentandone la potenza e prolungandone la durata d'azione. Al contrario, l'interazione dell'NO con il superossido può dare origine al derivato perossi-nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), molto tossico per i tessuti, che ha un'elevata affinità per i gruppi sulfidrilici e quindi inattiva molti enzimi chiave dotati di centri ferro-zolfo. Tale effetto del perossi-nitrito è regolato dal contenuto cellulare di glutatione. Poiché il glutatione è il maggior componente solubile intracellulare contenete gruppi sulfidrilici, fattori che regolano la biosintesi ed il catabolismo del glutatione possono avere importanti conseguenze. Il glutatione interagisce con il monossido d'azoto anche in condizioni fisiologiche e genera S-nitrosoglutatione, una forma più stabile dell'NO. Il nitroso-glutatione può funzionare come un addotto dell'NO con emivita più lunga o come un suo trasportatore. Il glutatione presente nei vasi è ridotto in caso di diabete mellito e aterosclerosi, e ciò può spiegare l'aumentata incidenza di complicanze cardiovascolari in queste condizioni. L'ischemia seguita da riperfusione è un'altra situazione

in cui la funzione endoteliale è compromessa dando origine ad aumentata produzione di radicali liberi, cui segue ridotta formazione di monossido d'azoto.

**Effetti dell' NO.** Il monossido d'azoto media molteplici funzioni:

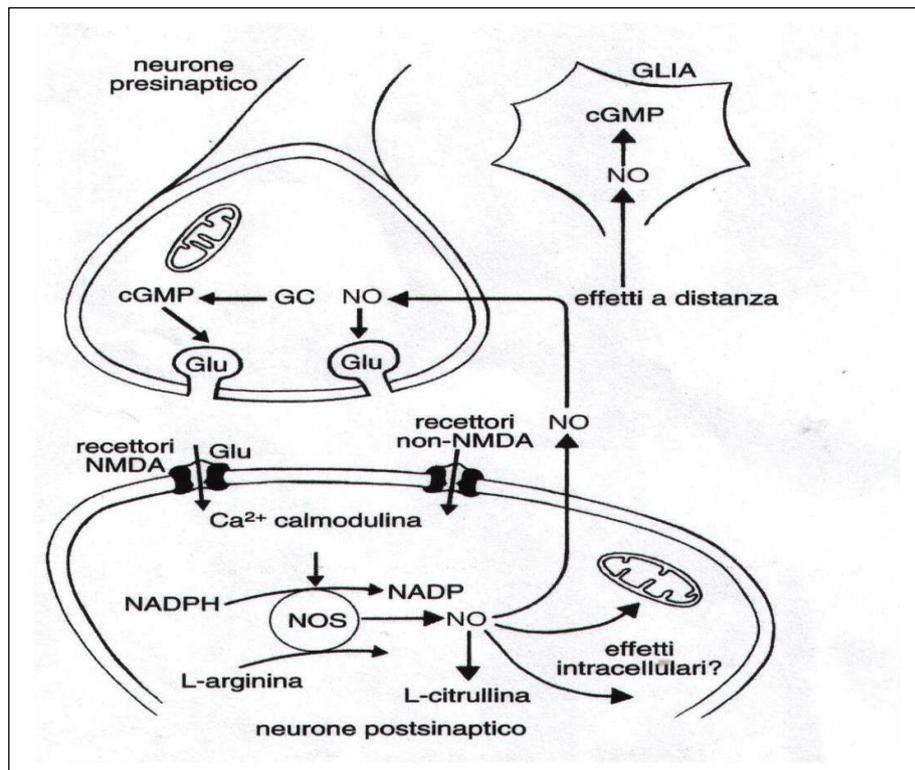
- *Vasodilatazione:* in seguito a stimolazione con Acetilcolina e altri vasodilatatori endogeni, si ha un aumento di  $Ca^{2+}$  intracellulare che porta all'attivazione della eNOS e ad un'aumentata sintesi di NO, questo, a sua volta, attiva la guanilato ciclasi con aumento della formazione di cGMP. 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 neutrofili 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 neutrofili 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.

- *Neurotrasmettitore nel SNC nei terminali nervosi pre- e post-sinaptici*: come schematizzato in **Fig. 25**, 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  $\text{Na}^+$ . Inoltre la depolarizzazione consente l'ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  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 ciclasi 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. 25** 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  $\text{Ca}^{2+}$  che può attivare eccessivamente la nNOS con elevata formazione di NO e conseguente aumento di radicali liberi e di perossi-nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). L'NO, infatti, interagisce col radicale libero superossido ( $\text{O}_2^-$ ) con formazione del radicale perossi-nitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) 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  $\text{Ca}^{2+}$ , 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.

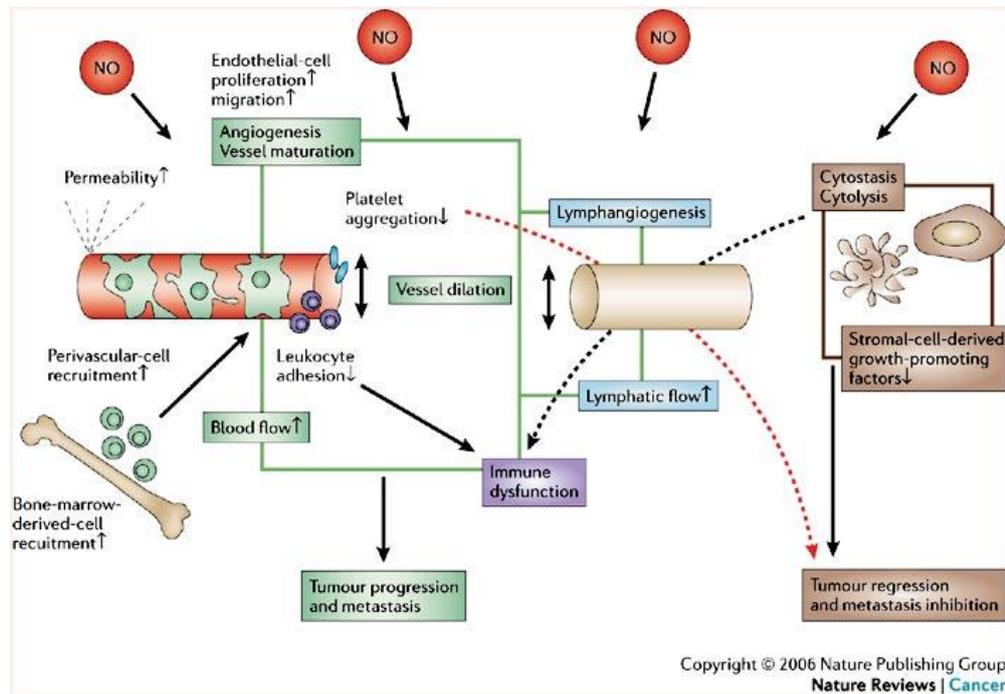
I bloccanti del radicale superossido come la superossido dismutasi (SOD) aumentano la potenza e la durata d'azione dell'NO. Anche il glutatione regola la quantità di NO libero o presente come perossi-nitrito, in quanto si lega all'NO, formando l'S-nitrosoglutatione, che può funzionare come un addotto 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. 26**). 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., 1997*).

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



**Fig. 26** Coinvolgimento dell'NO nel tumore.

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  $\mu\text{M}$ , 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., 2007; Xu W., 2002; Tozer G.M., 1997; Sagar S.M., 1995*).

- *Mediatore dell'infiammazione sia acuta che cronica:* Il monossido d'azoto è coinvolto nell'infiammazione sia acuta che cronica. In modelli sperimentali di infiammazione acuta, gli inibitori della NOS svolgono un effetto protettivo dose-dipendente, suggerendo che l'NO favorisce l'edema e la permeabilità capillare. L'NO ha anche un effetto dannoso in modelli cronici di artrite, l'integrazione dietetica con L-Arginina peggiora il quadro artrite mentre un miglioramento si ottiene con gli inibitori della NOS. Il liquido sinoviale di pazienti artritici contiene notevole quantità di prodotti di ossidazione del monossido d'azoto, in particolare perossi-nitrito. Recenti studi hanno mostrato che l'NO stimola la sintesi di prostaglandine infiammatorie per l'attivazione dell'isoenzima II della ciclossigenasi (COX-2). Pertanto, l'inibizione del sistema dell'NO può avere un effetto benefico sulle patologie infiammatorie, incluse quelle articolari. L'NO svolge un ruolo significativo nell'infiammazione. Studi condotti utilizzando gli inibitori dell'isoforma II della NOS, come l'amminoguanidina, hanno mostrato come l'NO sia necessario per mantenere l'espressione genica della COX-2. Altri studi hanno mostrato come i prodotti della cascata dell'acido arachidonico regolano in difetto la NO sintetasi. L'NO è stato identificato come neurotrasmettitore e come molecola di segnalazione intracellulare in grado di modulare il rilascio del neurotrasmettitore, la plasticità sinaptica, la neuroprotezione, l'apoptosi e la trasmissione del dolore (*Meller S.T., 1993; Prast H., 2001; Satakel K.,*

2000; Snyder S.H., 1992). Tutte e tre le isoforme di monossido d'azoto sintasi (NOS), cioè, neuronale (nNOS), endoteliale (eNOS) e NOS inducibile (iNOS), sono up-regolati nel sistema nervoso sotto diverse condizioni patologiche tra cui il dolore neuropatico (Chu Y.C., 2005.; Kishi T., 2003.; Meller S.T., 1993; Tang Q., 2007). È stato recentemente dimostrato che la nNOS è iper-espressa solo in piccoli neuroni o fibre del ganglio della radice dorsale (DRG), ma non nella colonna vertebrale di topi neuropatici (Martucci C., 2008). Al contrario, la iNOS è iper-espressa sia nella DRG che nel midollo spinale in condizioni di dolore neuropatico (Martucci C., 2008). Tuttavia, anche se gli inibitori della nNOS hanno dimostrato di ridurre allodinia ed iperalgesia (Hao J.X., 1996; Khalil Z., 2001; Meller S.T., 1992; Yamamoto T., 1995; Yoon Y.W., 1998) il ruolo esatto di nNOS e iNOS nel dolore neuropatico rimane ancora poco chiaro.

Il dolore neuropatico è associata con sensibilizzazione neuronale (Chen S.R., 2009). Astrociti e microglia sono criticamente coinvolte nel dolore in quanto direttamente modulano lo stato funzionale delle sinapsi e la loro eccitabilità sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Clark A.K., 2007.; Fischer H.S., 2002.; Ren K., 2008; Romero-Sandoval E.A., 2008). Così, le cellule della microglia sembrano mediare processi neuroinfiammatori che portano allo sviluppo di dolore cronico o il mantenimento dopo formalina (Fu K.J., 1999), danni al nervo sciatico (Coyle D., 1998), e infiammazione del nervo (Ledeboer A., 2005), come in un modello di malattia autoimmune (Luongo L., 2008; Scholz J., 2007). Inoltre, diverse manipolazioni farmacologiche in grado di ridurre l'attivazione della microglia hanno dimostrato di promuovere la normalizzazione di percorsi pro-infiammatori in microglia (Milligan E.D., 2009), tra cui la maggiore espressione della iNOS (Chang

L.C., 2008; Racz I., 2008; Yang H.Y., 2007). Purtroppo, anche se l'inibitore della NOS N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina metilestere (L-NAME) esercita effetti anti-nocicettivi, la sua somministrazione porta effetti indesiderati cardiovascolari (Avontuur J.A., 1998). Inibitori selettivi della iNOS verso la glia attivata impedirebbero gli effetti collaterali cardiovascolari, ma, purtroppo, non sono attualmente disponibili.

Da qui la necessità di una nuova strategia che direzioni il farmaco maggiormente nelle cellule neuronali. La sintesi della Nitro-arginina galattosilata (Nagal) costituisce un approccio utile ad aumentare l'attività del farmaco, aumentandone la penetrazione nelle cellule, e a diminuire gli effetti collaterali provocati dalla liberazione di N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NA) nel sangue. Rispetto all'L-NAME, la sostituzione del metile con una molecola di galattosio, permette al profarmaco di penetrare le membrane delle cellule sfruttando il trasportatore per gli esosi, GLUT1, e di liberare, all'interno delle cellule, L-NA in seguito ad idrolisi chimica ed enzimatica. La coniugazione del gruppo carbossilico di N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina con il gruppo ossidrilico del D-galattosio ha permesso di ottenere il derivato galattosiltransferasi N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (Nagal). Esso conserva la sua efficacia farmacologica senza produrre effetti tossici comunemente associati con gli inibitori della NOS, come L-NAME (Melisi D., 2009, Patent: NA2009A000027). I profarmaci galattosilati, come il Nagal, grazie al vettore D-galattosio hanno un'elevata affinità per il GLUT3, l'isoforma principale di trasportatore degli esosi espresso in mammiferi (Bonina F.P., 2003; Melisi D., 2006; Melisi D. 2009) e migliorano la permeabilità delle cellule.

Inoltre, il metabolita attivo del Nagal, è strategicamente spinto verso la glia attivata, dove c'è una maggiore espressione di GLUT3 (Taberner A., 2006), evitando così l'accumulo del farmaco in organi come lo stomaco,

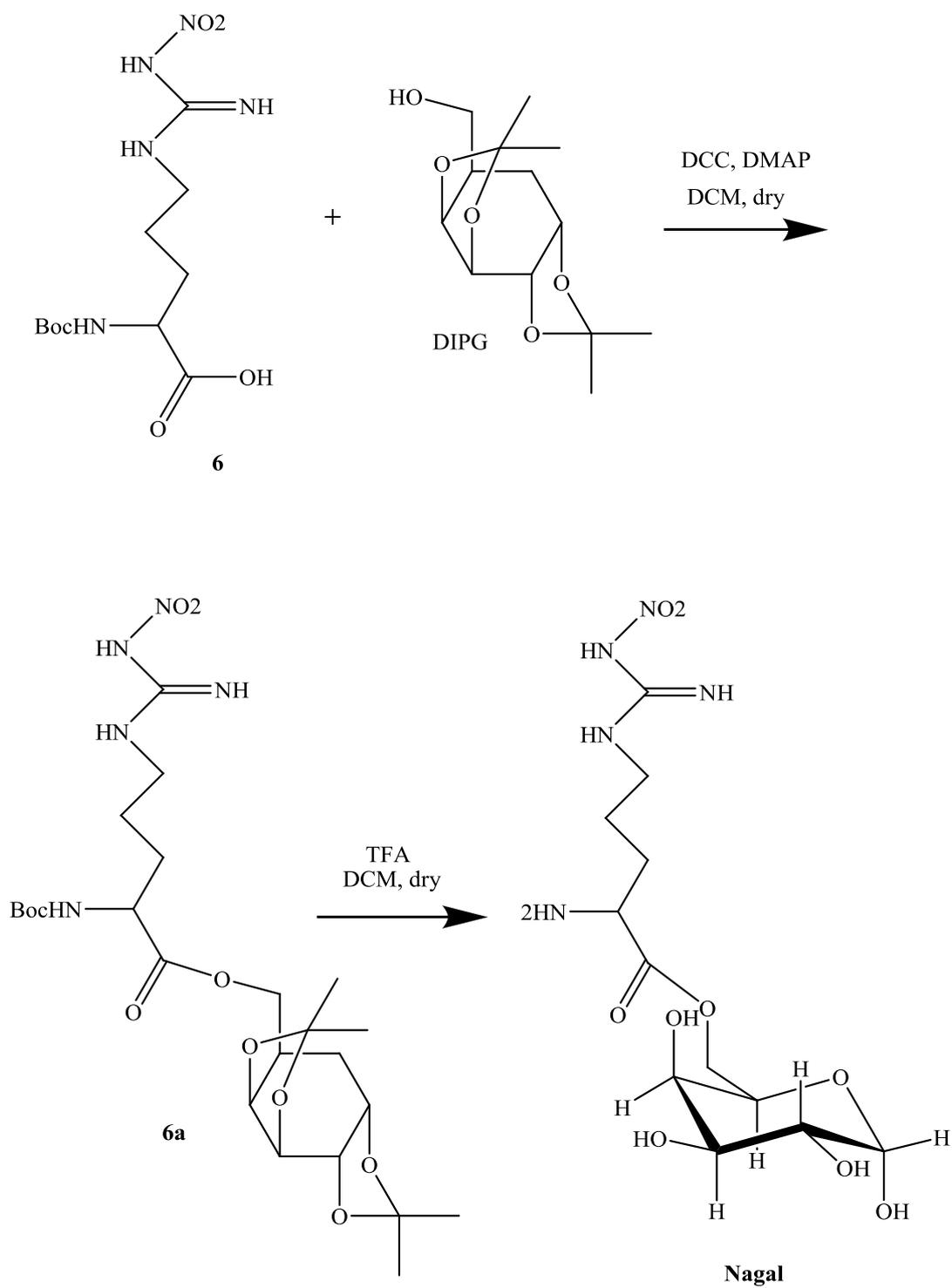
rene, pancreas o intestino tenue, dove sono localizzate altre isoforme di GLUTs (*Baldwin, S.A., 1993*).

Il profarmaco Nagal è stato progettato e confrontato con L-NAME, due inibitori della NOS, nella riduzione dell'attività analgesica e dell'allodinia meccanica. Inoltre, sono state studiate alcuni sintomi della neuropatia indotta da parziale legatura del nervo sciatico al fine di fornire possibili obiettivi cellulari dell'effetto analgesico del Nagal.

### 3.3.2 Sintesi

Il profarmaco Nitroarginina-Galattosio (Nagal), è stato preparato per esterificazione della Nitroarginina con lo zucchero D-Galattosio.

La N-(terz-butossicarbonile)-N<sup>o</sup>-(NO<sub>2</sub>)-Arginina **6** è stata trattata con l'1,2,3,4-di-O-isopropylidene- $\alpha$ -D-galattopiranosio in piridina anidra, in presenza di dicicloesilcarbodiimmide (DCC) come agente condensante e di dimetilamminopiridina (DMAP) come catalizzatore, per ottenere un estere **6a** che per deprotezione con acido trifluoroacetico (TFA) in diclorometano anidro da origine alla 6'-O-N<sup>o</sup>-(NO<sub>2</sub>)-Arginina-galattopiranoside (**Nagal**).  
(**Schema 6**)



**Schema 6**

### 3.3.3. Stabilità in vitro

Come è stato fatto per gli altri profarmaci, anche per il Nagal sono state misurate la stabilità chimica e quella enzimatica in vitro, per poter confermare l' idoneità della molecola prescelta all' utilizzo come profarmaco. Per valutare la stabilità chimica, una quantità nota di Nagal è stata solubilizzata in una soluzione tampone  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  a pH 7,4 e tenuta in ambiente termostato a  $37^\circ\text{C}$  sotto costante agitazione, in modo da riprodurre una situazione tanto più simile a quella fisiologica. In tal modo sono state determinate, a intervalli di tempo stabiliti, le concentrazioni di profarmaco e farmaco. Le concentrazioni in termini di *recovery* percentuale sono state lette in elettroforesi capillare con un rivelatore a serie di diodi (CE-DAD). Per valutare la stabilità chimica, ad intervalli di tempo stabiliti sono state determinate le concentrazioni di profarmaco e farmaco, tramite elettroforesi capillare. I risultati ottenuti sono mostrati nella **Tabella 10**, 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  $37^\circ\text{C}$ . Ad intervalli prefissati, 1 mL di questi campioni viene estratto con 2 mL di acetonitrile. Le rispettive soluzioni sono state 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-DAD. (**Tabella 10**).

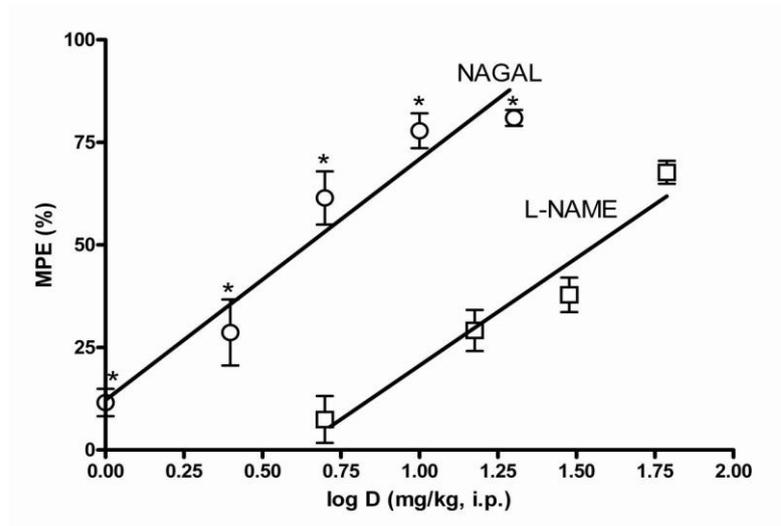
Composto	pH 7.4	Plasma
	t <sub>1/2</sub> (ore)	t <sub>1/2</sub> (ore)
Nagal	2	2

**Tabella 10.** *Stabilità chimica ed enzimatica di Peagal.*

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.

### 3.3.4 Attività analgesica

L'attività analgesica è stata studiata utilizzando il "writhing test" da acido acetico. Le curve dose/risposta del Nagal e dell' L-NAME sono descritte nella **Fig. 27**. Il valore dell' ED<sub>50</sub> per L-NAME è di 36.75 mg/Kg, mentre per il Nagal è di 3.82 mg/Kg.

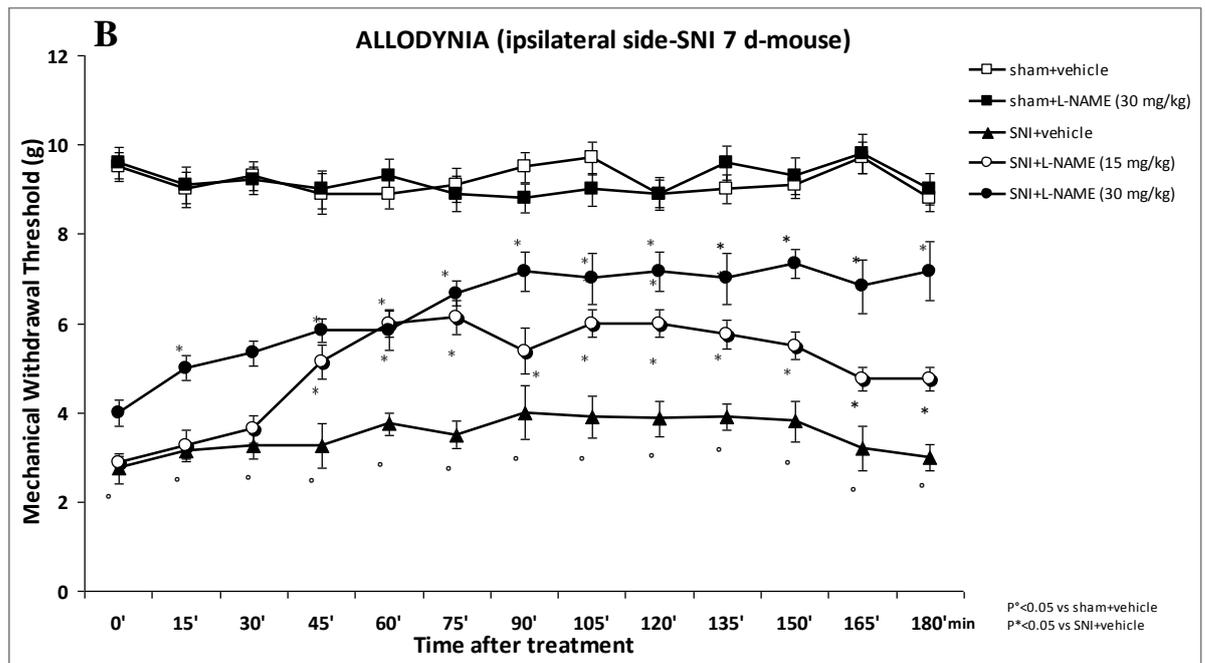
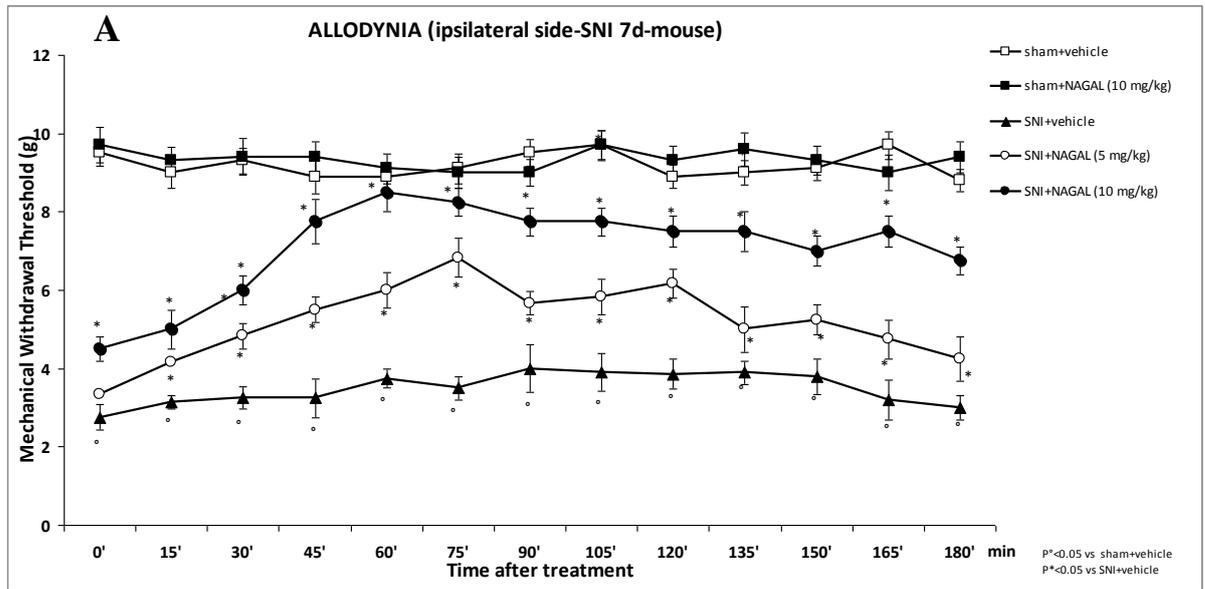


**Fig. 27** Valori dell'ED<sub>50</sub> dell'L-NAME e del Nagal nel writhing test.

### 3.3.5 Allodinia meccanica

In questa serie di esperimenti è stato valutato, in topi con neuropatia periferica indotta da taglio parziale del nervo sciatico (Spared Nerve Injury, SNI), il grado di iperalgesia termica e allodinia meccanica. In particolare, tali valutazioni eseguite a 7 giorni dalla legatura del nervo sciatico in gruppi di topi trattati o meno con: L-NAME (15 mg/Kg i.p o 30 mg/Kg/day i.p.), Nagal (5 mg/Kg, i.p. o 10 mg/Kg/day, i.p.), e rispettivo veicolo. La valutazione è riscontrabile solo ipsolateralmente alla lesione, il monitoraggio della zampa contro laterale non induce alcun effetto significativo. L'iperalgesia termica è stata valutata calcolando il tempo di latenza (in secondi) ad uno stimolo termico (calore radiante) applicato alla zampa ipsolaterale alla lesione del nervo sciatico. L'allodinia meccanica, è stata monitorata attraverso la risposta alla stimolazione tattica esercitata da un'asticella meccanica applicata sulla superficie plantare della zampa a forza crescente in grammi.

Dalla **Fig. 28** si vede come il trattamento con Nagal (5-10 mg/Kg i.p.) (A) o L-NAME (15-30 mg/Kg i.p.) (B) induce, rispetto al veicolo (1mL/Kg i.p. 0.9% NaCl), inibizione dell'allodinia meccanica in animali SNI.



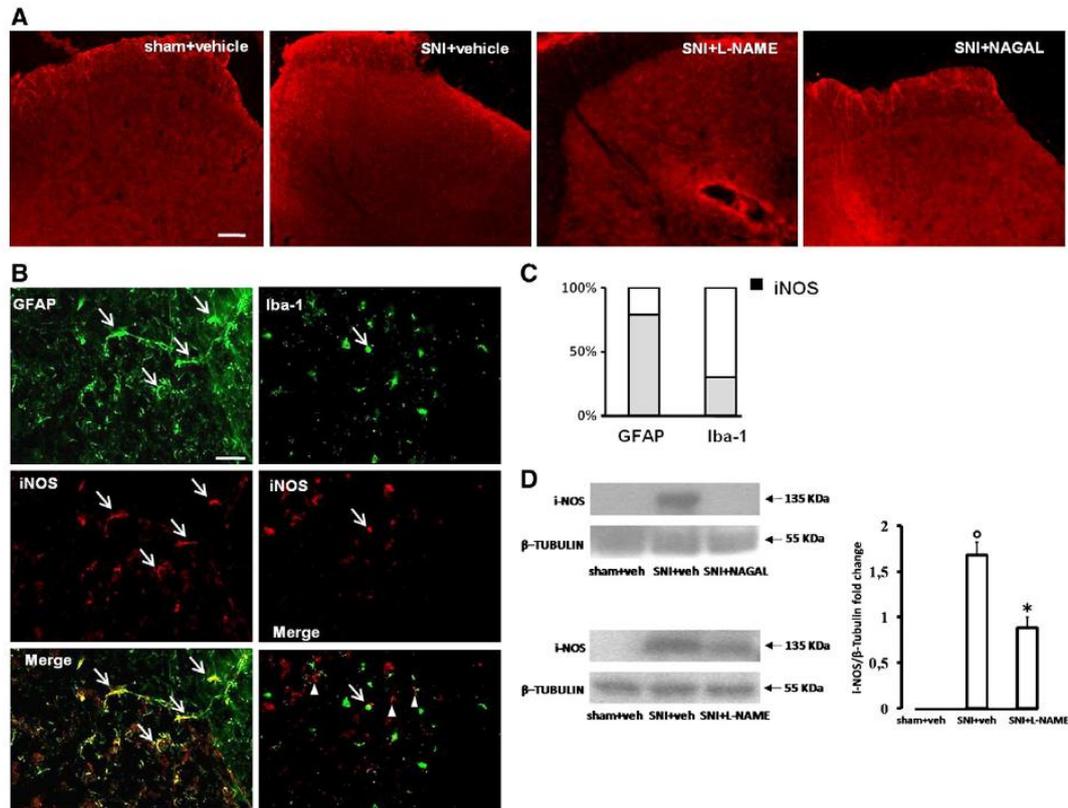
**Fig. 28** Effetto inibitorio del Nagal (5-10 mg/Kg i.p.) (A) e del L-NAME (15-30 mg/Kg i.p.) (B) sull'allodinia meccanica in animali SNI.

### **3.3.6 Effetto anti-nocicettivo del Nagal associato alla presenza del trasportatore GLUT3**

Gli animali sono stati perfusi con una soluzione salina al 4% di paraformaldeide in tampone fosfato 0,1 M. Il midollo spinale lombare (L4-L6) è stato asportato, fissato per 4 ore nel fissativo perfusione, crioprotetti per 72 ore in 20% saccarosio in tampone fosfato 0,1 M e congelato. Sono state tagliate sezioni trasversali (20 µm) usando un criostato e le fettine sono state montate su lastre di vetro. I vetrini sono stati incubati tutta la notte con una soluzione di anticorpo primario per il marcatore delle cellule della microglia Iba-1 o anticorpi policlonali per la proteina acida fibrillare anti-glia (GFAP) e per la iNOS o per il GLUT3.

Successivamente, le sezioni sono state lavate e incubate per 3 ore con una soluzione secondaria di anticorpi IgG-coniugati Alexa Fluor™ 488 e 568. I vetrini sono stati lavati e visualizzati con un 2 microscopio a fluorescenza Zeiss Axioplan.

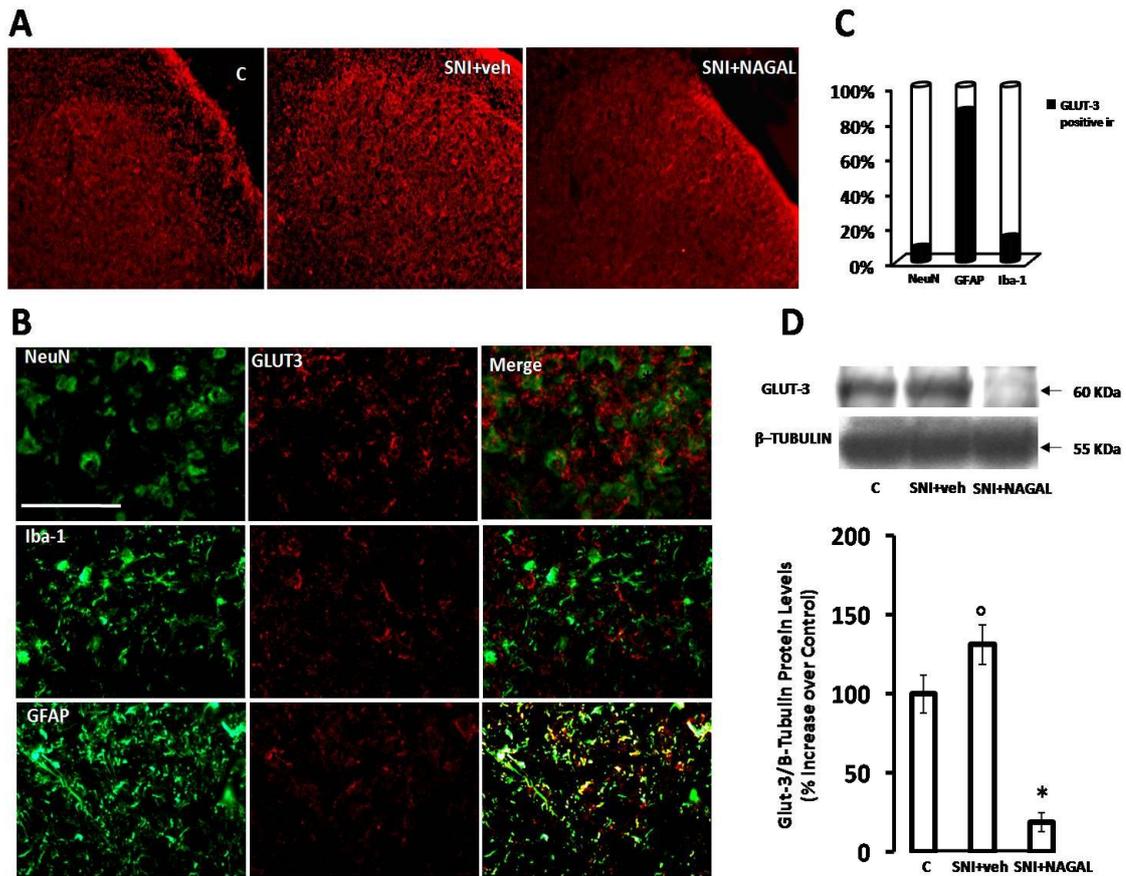
È stata riscontrata una iper regolazione di iNOS (**Fig. 29A**), che era iper-espressa negli astrociti (76%), 7 giorni dopo la legatura del nervo sciatico (**Fig. 29B e C**).



**Fig. 29** Studi di immunohistochemica sull'espressione delle iNOS.

Il Nagal, ma non L-NAME, riduce il segnale positivo alla iNOS (**Fig. 29A**). L'analisi Western blot ha mostrato livelli non rilevabili di proteine iNOS in topi normali trattati con il veicolo, così come in topi SNI trattati con Nagal, mentre le iNOS sono rivelabili in topi SNI trattati con il veicolo (**Fig. 29D**). Il trattamento con L-NAME è stato in grado di diminuire solo parzialmente la iper produzione di iNOS in topi SNI (**Fig. 29D**).

Inoltre, per stabilire il meccanismo di trasporto del Nagal sono stati eseguiti esperimenti nei confronti del trasportatore GLUT3, l'isoforma dei trasportatori per gli esosi maggiormente espressa nei neuroni e con un'alta affinità nei confronti del galattosio.



**Fig. 30** Studi di immunoistochimica sull'espressione dei GLUT3.

Gli esperimenti hanno dimostrato che nei topi con dolore neuropatico (SNI) vi è un significativo aumento dell'espressione dei GLUT3 (**Fig. 30A e 30B**). Questa iper-espressione, inoltre, è localizzata maggiormente negli astrociti (80%), e nelle cellule della microglia (17%), mentre non vi è un elevato livello per il marker neuronale NeuN (**Fig. 30B e 30C**).

Infine, analisi di Western blot hanno rivelato che vi è una riduzione dei livelli delle proteine GLUT3 nei topi SNI trattati con il Nagal, rispetto ai topi SNI trattati con il veicolo, dimostrazione dell'ipotesi iniziale che il Nagal penetra a livello della glia mediante il trasportatore degli zuccheri (**Fig. 30D**).

### 3.3.7 Conclusioni sul Nagal

Il profarmaco galattosilato della N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina (Nagal), inibitore non-selettivo delle NOS, aumenta l'attività anti-nocicettiva nel writhing test.

Purtroppo, la frequenza degli stiramenti diminuisce nel tempo (*Le Bars D., 2001*) a tal punto che è impossibile valutare la durata d'azione dell'analgésico per studiare qualsiasi tipo di cambiamento morfologico e/o biomolecolare del dolore indotto. L'effetto analgesico del Nagal è risultato circa 9 volte superiore rispetto a quello dell' L-NAME, come dimostra la curva dose-risposta. Inoltre, l'allodinia meccanica nei topi SNI trattati con Nagal viene ridotta a dosi inferiori rispetto a quello necessario per L-NAME per indurre lo stesso effetto anti-allodinia.

Dagli esperimenti biochimici e immunoistologici abbiamo osservato che il Nagal è stato in grado di normalizzare sia la iper-espressione GLUT3 nelle cellule gliali che ridurre il dolore neuropatico. Questo può forse spiegare la maggiore potenza del Nagal, grazie alla sua capacità di penetrare negli astrociti più facilmente rispetto all'L-NAME, causando in tal modo una maggiore disponibilità di N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina. Il Nagal potrebbe essere un prototipo di molecola avente le caratteristiche di un profarmaco avente come target preferenziale la glia attivata.

Quindi, questo studio supporta il concetto che il D-galattosio permette alla N<sup>0</sup>-nitro-L-arginina di avere come target le cellule gliali, mediante l'utilizzo di uno specifico trasportatore, così da incrementare l'effetto centrale del *parent drug* e utilizzare quindi il Nagal nel dolore neuropatico. Inoltre, il Nagal è risultato essere meno tossico e quindi potrebbe superare la tossicità legata ad un prolungato uso di inibitori non specifici delle NOS.

## 4. CONCLUSIONI

In conclusione, ho voluto dimostrare l'utilità del D-Galattosio in differenti campi. Dagli studi svolti, con questa strategia è stato possibile ottenere un più selettivo target farmacologico.

Abbiamo visto come questi profarmaci determinano un aumento della permeabilità cellulare, sfruttando il *carrier* GLUT1, presente ubiquitariamente sulle membrane cellulari ed ottenere un direccionamento del farmaco attivo.

Il miglioramento delle caratteristiche farmacocinetiche di diversi farmaci riduce notevolmente l'insorgenza di effetti avversi, preservando l'efficacia dei *parent drugs*.

Inoltre, è stato possibile sfruttare la selettività verso tipi di cellule, grazie ad esempio, alla presenza dei GLUT3 a livello neuronale, che permette un incremento dell'attività farmacologica del farmaco di partenza e una riduzione degli effetti collaterali.

Tutte le sintesi progettate sono il risultato di un lavoro di perfezionamento dei vari *steps* di reazione. Ogni reazione ha mostrato una buona resa 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. 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, ovvero che la

molecola in questione risponde a tutte le caratteristiche necessarie per essere definita “profarmaco”.

In conclusione, il D-galattosio deve essere considerato un valido vettore adatto per progettazione futura di profarmaci.

## 5. MATERIALI E METODI

### *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  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  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 del Diacetone 6'-O-Ketorolac-D-galattopiranoside (1a)*

1g di Ketorolac **1** (3.9 mmol), [presente commercialmente come Ketorolac tris salt deve essere disciolto in acqua, la fase acquosa è stata acidificata con HCl diluito fino a pH 4.5 ed estratta con CHCl<sub>3</sub>; la fase organica è stata anidrificata con solfato di sodio anidro e portata a secco sotto vuoto per ottenere il Ketorolac **1** in forma acida], 1.015 g di 1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (**DIPG**) (3.9 mmol), 748 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide HCl (EDC) (3.9 mmol) e 24 mg di 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0.19 mmol) vengono sciolti in diclorometano anidro (10 mL). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 12 ore. La fase organica viene estratta diverse volte con acqua e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Il grezzo di reazione viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice, usando come eluente CHCl<sub>3</sub>, ottenendo 1.45 g di **1a** come solido bianco (resa 75 %).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.30, 1.31, 1.40, 1.41 (4s, 12H, chetali); 2.80, 2.90 (m, 2H, 2-H); 3.30 (m, 1H, 1-H); 4.05 (m, 1H, 4'-H); 4.15 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 4.60 (m, 2H, 3-H); 5.35 (m, 1H, 1'-H); 5.90 (d, 1H, 7-H); 6.80 (d, 1H, 6-H); 7.45 (m, 2H, 2,6-Ph); 7.55 (m, 1H, 4-Ph); 7.85 (m, 2H, 3,5-Ph). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  20 e 22 (4CH<sub>3</sub>-chetali); 30 (C-2); 44 (C-3); 48 (C-1); 65 (C-6'); 66.7 (C-4'); 71 (C-5'); 71.5 (C-2'); 72 (C-3'); 97 (C-1'); 105 (C-7); 109 e 111 (C-chetali); 125 (C-6); 127 (C-5); 129 (3,5-Ph); 130 (2,6-Ph); 133 (4-Ph); 140 (C-8); 142 (1-Ph); 175 (CO chetonico); 185 (CO estereo). m/z: 498 (M + H)<sup>+</sup>.

### *Sintesi del Ketorolac-D-galactos-6'-il estere (Ketogal)*

Ad una soluzione di **1a** (1.45 g; 2.9 mmol) in diclorometano anidro (10 mL) vengono aggiunti 2 mL di acido trifluoroacetico (TFA), e la miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 48 ore. Svaporando il solvente si ottiene un residuo che viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice, usando come eluente CHCl<sub>3</sub> in gradiente di CH<sub>3</sub>OH, ottenendo 800 mg di **Ketogal** come solido bianco (resa 65 %). mp: 195 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 2.85 (m, 2H, 2-H); 3.50 (m, 1H, 1-H); 3.75 (m, 1H, 4'-H); 3.85 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.30 (m, 1H, 2'-H); 4.35 (m, 1H, 3'-H); 4.50 (m, 2H, 3-H); 5.15 (m, 1H, 1'-H); 6.15 (d, 1H, 7-H); 6.80 (d, 1H, 6-H); 7.45 (m, 2H, 2,6-Ph); 7.55 (m, 1H, 4-Ph); 7.75 (m, 2H, 3,5-Ph). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 30 (C-2); 44 (C-3); 48 (C-1); 65.5 (C-6'); 68 (C-4'); 70 (C-5'); 73.1 (C-2'); 74.9 (C-3'); 94 e 99 (C-1'); 105 (C-7); 125 (C-6); 127 (C-5); 129 (3,5-Ph); 130 (2,6-Ph); 133 (4-Ph); 140 (C-8); 142 (1-Ph); 175 (CO chetonico); 185 (CO estereo). m/z: 418 (M + H)<sup>+</sup>.

❖ *Sintesi del Diacetone 6'-O-Flurbiprofene-D-galattopiranoside (2a)*

1 g di Flurbiprofene **2** (4.1 mmol), 1.067 g di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (4.1 mmol), 786 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide HCl (EDC) (4.1 mmol) e 25.2 mg di 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0.205 mmol) vengono sciolti in diclorometano anidro (10 mL). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 12 ore. La fase organica viene estratta diverse volte con acqua e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Il grezzo di reazione viene purificato su colonna cromatografia con gel di silice, usando come eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ottenendo 1.21 g di **2a** come solido bianco (resa 61%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.30, 1.31, 1.40, 1.41 (4s, 12H, chetali); 1.5 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3.70 (m, 1H, -CH); 4.05 (m, 1H, 4'-H); 4.15 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 5.35 (m, 1H, 1'-H); 7.17 (m, 2H, 6,5-Biph); 7.36 (m, 1H, 3-Biph); 7.43 (m, 3-H, 9,10,12-Biph); 7.52 (m, 2-H, 8,12-Biph). <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  18 (CH<sub>3</sub>); 20 e 22 (4CH<sub>3</sub>-chetali); 45 (CH); 65 (C-6'); 66.7 (C-4'); 71 (C-5'); 71.5 (C-2'); 72 (C-3'); 97 (C-1'); 109 e 111 (C-chetali); 115 (3-Biph); 124 (5-Biph); 127 (10-Biph); 128 (8,12-Biph); 129 (9,11-Biph); 131 (6-Biph); 135 (4-Biph); 142 (7-Biph); 159 (1-Biph); 160 (2-Biph); 174 (CO estereo). m/z: 487 (M + H)<sup>+</sup>.

*Sintesi del Flurbiprofene-D-galactos-6'-il estere (Flugal)*

Ad una soluzione di **1a** (1.21 g; 2.5 mmol) in diclorometano anidro (10 mL) vengono aggiunti 2 mL di acido trifluoroacetico (TFA), e la miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente

per 48 ore. Svaporando il solvente si ottiene un residuo che viene purificato su colonna cromatografia con gel di silice, usando come eluente  $\text{CHCl}_3$  in gradiente di  $\text{CH}_3\text{OH}$ , ottenendo 538 mg di **Flugal** come solido bianco (resa 53 %).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.5 (d, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 3.45 (m, 1H, 4'-H); 3.70 (m, 1H, -CH); 3.8 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.30 (m, 1H, 2'-H); 4.40 (m, 1H, 3'-H); 5.15 (m, 1H, 1'-H); 7.17 (m, 2H, 6,5-Biph); 7.36 (m, 1H, 3-Biph); 7.43 (m, 3-H, 9,10,12-Biph); 7.52 (m, 2-H, 8,12-Biph).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  18 ( $\text{CH}_3$ ); 45 (CH); 64 (C-6'); 68 (C-4'); 70 (C-5'); 73 (C-2'); 74 (C-3'); 93 e 98 (C-1'); 115 (3-Biph); 124 (5-Biph); 127 (10-Biph); 128 (8,12-Biph); 129 (9,11-Biph); 131 (6-Biph); 135 (4-Biph); 142 (7-Biph); 159 (1-Biph); 160 (2-Biph); 174 (CO estereo). m/z: 407 (M + H)<sup>+</sup>.

❖ ***Sintesi del Diacetone 6'-O-Ketoprofene-D-galattopiranoside (3a)***

1 g di Ketoprofene **3** (3.9 mmol), 1.014 g di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (3.9 mmol), 747 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide HCl (EDC) (3.9 mmol) e 24 mg di 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0.195 mmol) vengono sciolti in diclorometano anidro (10 mL). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 12 ore. La fase organica viene estratta diverse volte con acqua e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Il grezzo di reazione viene purificato su colonna cromatografia con gel di silice, usando come eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ottenendo 990 mg di **3a** come solido bianco (resa 51%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.30, 1.31, 1.40, 1.41 (4s, 12H, chetali); 1.5 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>); 3.70 (m, 1H, -CH); 4.05 (m, 1H, 4'-H); 4.15 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 5.35 (m, 1H, 1'-H); 7.31 (m, 2H, 5''-H and 6''-H); 7.36 (m, 2H, 3'''-H and 5'''-H); 7.45 (m, 1H, 3-H, 4'''-H); 7.56 (s, 1-H, 2''-H); 7.7 (m, 2-H, 2'''-H and 6'''-H).  
<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  17 (CH<sub>3</sub>); 20 e 22 (4CH<sub>3</sub>-chetali); 40 (CH); 65 (C-6'); 66.7 (C-4'); 71 (C-5'); 71.5 (C-2'); 72 (C-3'); 97 (C-1'); 109 e 111 (C-chetali); 128 (C-3''' and C-5'''); 129 (C-4'' and C-5''); 130 (C-2''' and C-6'''); 131 (C-2''); 132 (C-4'''); 133 (C-6''); 135 (C-1''); 139 (C-1'''); 140 (C-3''); 174 (CO-ester); 196 (CO-chetone). m/z: 497 (M + H)<sup>+</sup>.

***Sintesi del Ketoprofene-D-galactos-6'-il estere (Okigal)***

Ad una soluzione di **3a** (0.99 g; 2.4 mmol) in diclorometano anidro (10 mL) vengono aggiunti 2 mL di acido trifluoroacetico (TFA), e la miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 48 ore. Saporando il solvente si ottiene un residuo che viene purificato

su colonna cromatografia con gel di silice, usando come eluente  $\text{CHCl}_3$  in gradiente di  $\text{CH}_3\text{OH}$ , ottenendo 550 mg di **Okigal** come solido bianco (resa 55 %).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.5 (d, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 3.45 (m, 1H, 4'-H); 3.70 (m, 1H, -CH); 3.8 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.30 (m, 1H, 2'-H); 4.40 (m, 1H, 3'-H); 5.15 (m, 1H, 1'-H); 7.31 (m, 2H, 5''-H and 6''-H); 7.36 (m, 2H, 3'''-H and 5'''-H); 7.45 (m, 1H, 3-H, 4'''-H); 7.56 (s, 1-H, 2''-H); 7.7 (m, 2-H, 2'''-H and 6'''-H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  17 ( $\text{CH}_3$ ); 40 (CH); 64 (C-6'); 68 (C-4'); 70 (C-5'); 73 (C-2'); 74 (C-3'); 93 and 98 (C-1'); 128 (C-3''' and C-5'''); 129 (C-4'' and C-5''); 130 (C-2''' and C-6'''); 131 (C-2''); 132 (C-4'''); 133 (C-6''); 135 (C-1''); 139 (C-1'''); 140 (C-3''); 174 (CO-ester); 196 (CO-chetone).  $m/z$ : 417 ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>.

❖ *Sintesi del Diacetone 6'-O-Ibuprofene-D-galattopiranoside (4a)*

1 g di Ibuprofene **4** (4.85 mmol), 1.26 g di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- $\alpha$ -galattopiranosio (4.85 mmol), 747 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide HCl (EDC) (4.85 mmol) e 29.6 mg di 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0.2425 mmol) vengono sciolti in diclorometano anidro (10 mL). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 12 ore. La fase organica viene estratta diverse volte con acqua e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Il grezzo di reazione viene purificato su colonna cromatografia con gel di silice, usando come eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ottenendo 990 mg di **4a** come solido bianco (resa 53%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.01 (2s, 6H, -CH<sub>3</sub> ibu); 1.30, 1.31, 1.40, 1.41 (4s, 12H, chetali); 1.5 (d, 3H, -CH<sub>3</sub>); 2.22 (m, 1H, -CH ibu); 2.51 (d, 2H, -CH<sub>2</sub> ibu); 3.78 (m, 1H, -CH); 4.05 (m, 1H, 4'-H); 4.15 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 5.35 (m, 1H, 1'-H); 7.1 (2d, 4-H, ph).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  13 (CH<sub>3</sub>); 20 e 22 (4CH<sub>3</sub>-chetali); 23 (2CH<sub>3</sub> ibu); 29 (CH ibu), 40 (CH); 44.5 (CH<sub>2</sub> ibu); 65 (C-6'); 66.7 (C-4'); 71 (C-5'); 71.5 (C-2'); 72 (C-3'); 97 (C-1'); 109 e 111 (C-chetali); 128 (C-2 ph e C-6 ph); 129 (C-3 ph and C-5 ph); 132 (C-1 ph); 140 (C-1 ph); 174 (CO-ester).  
m/z: 448 (M + H)<sup>+</sup>.

*Sintesi del Ibuprofene-D-galactos-6'-il estere (Okigal)*

Ad una soluzione di **4a** (0.99 g; 2.2 mmol) in diclorometano anidro (10 mL) vengono aggiunti 2 mL di acido trifluoroacetico (TFA), e la miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 48 ore. Saporando il solvente si ottiene un residuo che viene purificato

su colonna cromatografia con gel di silice, usando come eluente  $\text{CHCl}_3$  in gradiente di  $\text{CH}_3\text{OH}$ , ottenendo 550 mg di **Ibugal** come solido bianco (resa 55 %).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.01 (2s, 6H,  $-\text{CH}_3$  ibu); 1.5 (d, 3H,  $-\text{CH}_3$ ); 2.0 (m, 1H,  $-\text{CH}$  ibu); 2.51 (d, 2H,  $-\text{CH}_2$  ibu); 3.78 (m, 1H,  $-\text{CH}$ ); 3.45 (m, 1H, 4'-H); 3.5 (m, 1H, 5'-H); 3.8 (m, 2H, 6'-H); 4.20 (m, 1H, 2'-H); 4.40 (m, 1H, 3'-H); 5.15 (m, 1H, 1'-H); 7.1 (2d, 4-H, ph).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  13 ( $\text{CH}_3$ ); 23 ( $2\text{CH}_3$  ibu); 29 (CH ibu), 40 (CH); 44.5 ( $\text{CH}_2$  ibu); 64 (C-6'); 68 (C-4'); 70 (C-5'); 73 (C-2'); 74 (C-3'); 93 and 98 (C-1'); 128 (C-2 ph e C-6 ph); 129 (C-3 ph and C-5 ph); 132 (C-1 ph); 140 (C-1 ph); 174 (CO-ester). m/z: 368 ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup>.

### ❖ *Sintesi della Palmitoiletanolamide (A)*

2 mL di cloruro di palmitoile (6.59 mmol) vengono sciolti in dietiletere (20 mL). Vengono aggiunti goccia a goccia 2.03 mL (6.59 mmol) di etanolamina, sciolti in 10 mL di dietiletere, mantenendo la reazione a 0°C per 30 minuti. La reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per altre 3 ore. La palmitoiletanolamide (**A**) precipita come solido biancastro. Viene effettuata una filtrazione sotto vuoto e lasciata essiccare per tutta la notte. Si ottengono 1.405 g di **A** come solido bianco (resa 65%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.90 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1.3 (m, 24H, 2-12-CH<sub>2</sub>); 1.6 (m, 2H, 14-CH<sub>2</sub>); 2.2 (t, 2H, 15-CH<sub>2</sub>); 3.29 (t, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-); 3.58 (t, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 14.6 (-CH<sub>3</sub>); 23.9 (2-CH<sub>2</sub>); 27.1 (14-CH<sub>2</sub>); 30.4 (13-CH<sub>2</sub>); 30.8 (4-11-CH<sub>2</sub>); 33.25 (3-CH<sub>2</sub>); 37.27 (15-CH<sub>2</sub>); 43.06 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-); 61.7 (HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-); 174.1 (CO).

### *Sintesi dell'1,2,3,4-di-O-isopropiliden-D-galattopiranosio-6-succinil estere (B)*

Ad una soluzione di DIPG (1g; 3.94 mmol) in piridina anidra (10 mL) è stata aggiunta DMAP (30 mg; 0.25 mmol) e anidride succinica (800 mg; 8 mmol).

La miscela è stata tenuta sotto agitazione elettromagnetica per 12 ore, a temperatura ambiente. Dopo evaporazione sottovuoto 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 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrata ed evaporata sotto vuoto, ottenendo 1.4 g del prodotto **B**, con una resa del 98%.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.50-1.45-1.26-1.25 (4s, 12H, chetali); 2.65 (m, 4H, -COCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CO-); 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).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 25.3, 26.2, 26.71, 26.8 (4CH<sub>3</sub>-chetali); 28.8 (-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-); 29.9 (-COCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO-); 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 (2CO).

### *Sintesi del Diacetone 6'-O-Palmitoiletanolamide-succinil-D-galattopiranoside (Peagalket)*

1 g di Palmitoiletanolamide **A** (3.34 mmol), 1.203 g di 1,2,3,4-di-O-isopropiliden-D-galattopiranosio-6-succinil estere **B** (3.34 mmol), 960 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide HCl (EDC) (5.01 mmol) e 40.8 mg di 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0.223 mmol) vengono sciolti in diclorometano anidro (15 mL). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 12 ore. La fase organica viene estratta diverse volte con acqua e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Il grezzo di reazione viene purificato su colonna cromatografia con gel di silice, usando come eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ottenendo 1.46 g di **Peagalket** come solido bianco (resa 68%).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 0.90 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>); 1.3 (m, 24H, 2-12-CH<sub>2</sub>); 1.50-1.45-1.26-1.25 (4s, 12H, chetali) 1.6 (m, 2H, 14-CH<sub>2</sub>); 2.2 (t, 2H, 15-CH<sub>2</sub>); 2.65 (m, 4H, -COCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>CO-); 3.49 (t, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-); 4.34 (t, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-); 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).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.6(- $\text{CH}_3$ ); 23.9 (2- $\text{CH}_2$ ); 25.3, 26.2, 26.71, 26.8 (4 $\text{CH}_3$ -chetali); 27.1 ( 14- $\text{CH}_2$ ); 28.8 (- $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ ); 29.9 (- $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ ); 30.4( 13- $\text{CH}_2$ ); 30.8 (4-11- $\text{CH}_2$ ); 33.25 (3- $\text{CH}_2$ ); 37.27 (15- $\text{CH}_2$ ); 43.06 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ); 61.7 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ); 63.4 ( $\text{C6}'$ ); 66.3 ( $\text{C4}'$ ); 70.6 ( $\text{C5}'$ ); 71.0 ( $\text{C2}'$ ); 71.3 ( $\text{C3}'$ ); 96.2 ( $\text{C1}'$ ); 109.4, 112.4 (2C- chetali); 174.1 (CO -amidico); 171.0, 175.0 (2CO -esterei).

*Sintesi della Palmitoiletanolamide-succinil-D-galactos-6'-il estere (Peagal)*

Ad una soluzione di **Peagalket** (1.46 g; 2.27 mmol) in diclorometano anidro (10 mL) vengono aggiunti 2 mL di acido trifluoroacetico (TFA), e la miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 48 ore. Dopo aver svaporato il solvente, si ottiene un residuo che viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice, usando come eluente  $\text{CHCl}_3$ , in gradiente di  $\text{CH}_3\text{OH}$ , ottenendo 665 mg di **Peagal** come solido bianco (resa 52 %).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  0.90 (t, 3H, - $\text{CH}_3$ ); 1.3 (m, 24H, 2-12- $\text{CH}_2$ ); 1.6 (m, 2H, 14- $\text{CH}_2$ ); 2.2 (t, 2H, 15- $\text{CH}_2$ ); 2.65 (m, 4H, - $\text{COCH}_2\text{-CH}_2\text{CO}$ ); 3.4 (m, 1H, 4-H); 3.49 (t, 2H,  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ); 3.5 (m, 2H, 2-H e 3-H); 4.3 (m, 2H, 5-H e 6-H); 4.34 (t, 2H,  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ); 5.4 (d, 1H, 1-H).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  14.6(- $\text{CH}_3$ ); 23.9 (2- $\text{CH}_2$ ); 27.1 ( 14- $\text{CH}_2$ ); 28.8 (- $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ ); 29.9 (- $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO-}$ ); 30.4( 13- $\text{CH}_2$ ); 30.8 (4-11- $\text{CH}_2$ ); 33.25 (3- $\text{CH}_2$ ); 37.27 (15- $\text{CH}_2$ ); 43.06 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ); 61.7 ( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$ ); 63.4 ( $\text{C6}'$ ); 71.7 ( $\text{C4}'$ ); 72.8 ( $\text{C3}'$ ); 74.1 ( $\text{C5}'$ ); 76 ( $\text{C2}'$ ); 94.4 ( $\text{C1}'$ ); 174.1 (CO -amidico); 171.0, 175.0 (2CO -esterei).

❖ *Diacetone 6'-O- [N-(terz-butossicarbonile)-N<sup>ω</sup>-(NO<sub>2</sub>)-Arginina]- α,β-D- Galattopiranoside (6a)*

La N- (terz- butossicarbonile)- N<sup>ω</sup>-(NO<sub>2</sub>)- Arginina (1 g; 3.13 mmol) **6** viene attivata in presenza di DMAP (0.02 g; 0.16 mmol) e DCC (1g; 4.46 mmol) per 15 minuti, in 10 mL di piridina anidra. Viene poi aggiunto l'1,2,3,4-di-O-isopropylidene-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 di piridina viene quindi portata a secco sottovuoto. Il residuo viene ripreso con acetato, in modo tale da far precipitare la DCC come DCU, che viene quindi allontanata per filtrazione e successiva estrazione con H<sub>2</sub>O. La fase organica viene anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrata ed evaporata sotto vuoto. Il residuo ottenuto viene purificato con una cromatografia flash su gel di silice usando come eluente il CHCl<sub>3</sub>; si ottengono 1.25 g di prodotto **6a** puro come solido bianco, con una resa del 69% .

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 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).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 13.5 (2CH<sub>3</sub>-2''); 18 and 20 (4CH<sub>3</sub>-Ketals); 25 (CH<sub>3</sub>-6''); 25.4 (CH<sub>3</sub>-7''); 25.5 (CH<sub>3</sub>-4''); 26.6 (C-4); 28.9 (3CH<sub>3</sub>-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<sup>o</sup>-NO<sub>2</sub>-Arginina-D- Galatto-6'-il estere (Nagal)*

Il prodotto **6a** (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 sotto cappa e si porta a secco sottovuoto. Sul residuo vengono effettuati lavaggi con etere e diclorometano ottenendo così 0.62 g di **Nagal** puro, come solido bianco, con una resa del 75 %.

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): 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).

<sup>13</sup>C-NMR (D<sub>2</sub>O): 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).

## ***Stabilità chimica ed enzimatica***

### ***❖ Prove di stabilità dei profarmaci galattosilati dei FANS***

Per lo studio della stabilità le soluzioni di profarmaco sono state preparate sciogliendo un'aliquota di Ketogal o di Flugal o di Okigal o di Ibugal in un tampone fosfato a pH 7.4, oppure in una soluzione di HCl 0.1 N (pH 1), per quanto riguarda la stabilità chimica, oppure in un campione di plasma, per la stabilità enzimatica. Le soluzioni sono state mantenute al buio, alla temperatura di 37°C, per 24 ore. Ogni ora è stata prelevata un'aliquota di campione. Nel caso del plasma tale aliquota è stata precedentemente estratta con acetonitrile (1:2), vortexata e centrifugata a 3000 RPM per 10 minuti. Il surnatante è stato prelevato ed usato per l'analisi all'HPLC con rivelatore a diodi. Le emivite per le stabilità chimiche ed enzimatica sono state calcolate quantizzando, nel tempo, la percentuale di profarmaco rimasto in soluzione.

### ***❖ Sistema HPLC***

Per le separazioni cromatografiche è stato utilizzato un 1090L HPLC (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) accoppiato ad un rivelatore a diodi HP 1040A. E' stata utilizzata una colonna Phenomenex Luna C 18 (250 x 4.6 mm, 5 µm). La lunghezza d'onda utilizzata è 313 nm.

La fase mobile è costituita da acetonitrile ed una soluzione acquosa di acido fosforico 1 mM (pH 3) nel rapporto di 68:32. Il flusso è di 1 mL/min, con un volume di iniezione di 20 µL. Tutti i reattivi e i solventi utilizzati sono di grado analitico. L'acqua distillata e demonizzata è stata purificata mediante un Milli Q system (Millipore).

I tempi di ritenzione dei composti sono: Ketorolac (6.7 min), Ketogal (3.8 min), Flurbiprofene (11 min), Flugal (6 min); Ketoprofene (7 min), Okigal (9 min) , Ibuprofene (7 min) e Ibugal (16 min). La retta di calibrazione per la quantificazione dei composti è stata costruita utilizzando soluzioni standard di concentrazione tra 0.1 e 100 µg/mL. La linearità è stata ottenuta con un coefficiente di regressione ( $R^2$ ) di circa 0.998.

❖ *Prove di stabilità della Peagal*

Per lo studio della stabilità è stato utilizzato uno strumento cromatografico LC-MS-MS, accoppiato ad una colonna Polaris C 18 (100 x 2.0 mm, 3 µm). Gli eluenti sono stati utilizzati in gradiente secondo la tabella:

Tempo (min)	%A (HCOOH 0.1%, H <sub>2</sub> O)	%B (HCOOH 0.1%, CH <sub>3</sub> OH)
0	20	80
10	2	98
12	20	80
16	20	80

Il flusso è stato di 0.2 mL/min, con un volume di iniezione di 20 µL. Tutti i reattivi e i solventi utilizzati sono di grado analitico. L'acqua distillata e demonizzata è stata purificata mediante un Milli Q system (Millipore).

I tempi di ritenzione dei composti sono: PEA (5 min), Peagal (7 min).

### ❖ *Prove di stabilità del Nagal*

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.

Le soluzioni standard del Nagal e del rispettivo *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.

Le soluzioni del profarmaco 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.

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.

## ***Animali***

Gli animali utilizzati per lo studio della gastrolesività e per gli esperimenti di attività farmacologica, per i profarmaci galattosilati dei FANS e della Peagal, sono topi maschi Swiss di 20-25 g di peso, acquistati presso Harlan Italy (San Pietro al Natisone, UD, Italy). Vengono tenuti in gabbia (24×72×12 cm), in gruppi di 5-6, con cibo e acqua. Le condizioni ambientali vengono mantenute a temperatura costante di circa 24°C, con un valore di umidità del 65%, e con cicli di luce/buio di 12 ore.

Gli animali utilizzati per gli esperimenti di attività farmacologica per il profarmaco Nagal sono topi maschi C57BL/6N (35-40 g), disposti 3 per gabbia sotto il controllo di una lampada (cicli di 12 ore luce/buio, luce ogni 6 ore) e a determinate condizioni ambientali (temperatura di 20–22 °C, umidità 55-60%) almeno per 1 settimana prima di cominciare gli esperimenti.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti rispettando le linee guida italiane (D.L. no.116 del 27 Gennaio, 1992) e della Comunità Europea (Direttiva di 24 Novembre, 1986, 86/609/ECC) sull'uso e la protezione degli animali per la sperimentazione preclinica. Tutte le procedure chirurgiche sono state approvate dal Ministero della Ricerca Scientifica e sono conformi all'“International Association for the Study of Pain” (IASP).

### ***Studi farmacocinetici***

L'analisi farmacocinetica di Ketorolac e Ketogal è stata effettuata utilizzando dei ratti maschi Wistar ( $200\pm 20$  g, Harlan, Correzzana, Milan), allevati in gabbia, in un ambiente termostato a  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con cicli luce/buio di 12 ore. I ratti hanno ricevuto per via orale Ketorolac ( $0.100\text{ mg/Kg}$ ) o Ketogal ( $0.163\text{ mg/Kg}$ ) e sono stati sacrificati dopo 2 h, 4 h e 6 h dalla somministrazione. Ogni campione è stato preparato in triplicato.

Il plasma, lo stomaco, i reni e il fegato di ogni animale è stato raccolto in tubi di vetro e conservati a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Aliquote di tutte le matrici biologiche sono state deproteinizzate con acetonitrile; la sospensione è stata vortexata e centrifugata a 3000 RPM per 10 minuti. La fase organica è stata iniettata nel sistema di HPLC. I limiti di rivelabilità per il Ketogal è di  $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ , mentre per il Ketorolac è di  $0.05\text{ }\mu\text{g/mL}$ .

### ***Test di vitalità cellulare***

Le cellule C6 di glioma di ratto sono state cresciute in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) e supplementate con il 10% di FBS, penicillina (100 unità/mL), e streptomina (0.1 mg/mL) in un incubatore umidificato con il 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C.

Le cellule SH-SY5Y di neuroblastoma umano sono state anch'esse cresciute in DMEM e Ham's F-12 e supplementate con 2 mM L-glutammina, penicillina (100 unità/mL), streptomina (5 µg/mL), and 10% (v/v) di siero fetale bovino (Invitrogen, Carlsbad, CA). Le cellule sono state umidificate in un incubatore a 37 °C con il 5% CO<sub>2</sub>. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni due giorni.

Le cellule sono state trattate con PEA e Peagal, un'ora prima del trattamento con 6-idrossidopamina (6-OHDA), utilizzata per provocare stress ossidativo. L'incubazione con 6-OHDA è stata protratta per 24 ore. Nelle cellule trattate con PEA è stato aggiunto anche il galattosio, in concentrazioni equimolari rispetto a Peagal. La concentrazione più alta di galattosio (10 µM) è stata anche testata da sola.

Le cellule sono state piastrate ad una densità di  $5 \times 10^4$  cellule/300µL in "96-well plates" e la vitalità cellulare è stata misurata mediante l'MTT test.

Dopo il trattamento delle cellule C6 e SH-SY5Y con 6-OHDA (100 and 250µM, rispettivamente), in presenza o in assenza di altri reagenti, è stata addizionata la soluzione di MTT e successivamente incubata per 2 ore. La densità ottica a 540 nm è stata misurata usando un lettore di micropiastre. I dati sono stati espressi in percentuale di riduzione da MTT rispetto alle cellule controllo, trattate con il veicolo.

### ***Analisi Western blotting***

Per l'estrazione delle proteine, il midollo spinale è stato prima tritato in piccoli pezzi, e poi sospeso in un *buffer* di lisina (4% SDS, 20% glicerolo, 10% mercaptoetanolo, 0.004% blu-bromofenolo, Tris-HCl, pH 6.8, contenente urea 6M, 50  $\mu$ M PMSF, Sigma Chemical Co., st. Louis, MO). È stata determinata la concentrazione totale di proteine.

Ogni campione è stato caricato su un gel di poliacrilammide.

Per rilevare la i-NOS e il GLUT3 è stato utilizzato un anticorpo policlonale primario di coniglio. I livelli di proteine sono state normalizzate rispetto al segnale ottenuto con l'anticorpo monoclonale  $\beta$ -tubulina.

## BIBLIOGRAFIA

- Aloe, L.; Leon, A.; Levi-Montalcini, R. “*A proposed autacoid mechanism controlling mastocyte behavior*”. *Agents Actions*. **1993**, 39, C145- 7.
- Amidon e Sadée “*Membrane transporters as Drug Targets*”. **1999**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Avontuur, J.A.; Buijk, S.L.; Bruining, H.A. “*Distribution and metabolism of N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in patients with septic shock*”. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1998**, 54, 627–631.
- Bachur, N.R.; Masek, K.; Mehnnon, K.L.; Udenfriend, S. “*Fatty acid amides of ethanolamine in mammalian tissues*”. *J Biol Chem.* **1965**, 240, 1019-1024.
- Baldwin, S.A. “*Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins*”. *Biochim Biophys Acta* **1993**, 1154, 17-49.
- Baldwin, S.A. “*Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins*”. *Biochim. Biophys. Acta.* **1993**, 1154, 17–49.
- Battaglia, G.; La Russa, M.; Bruno, V.; Arenare, L.; Ippolito, R.; Copani, A.; Bonina, F. P.; Nicoletti, F. “*Systemically administered D-glucose conjugates of 7-chlorokynurenic acid are centrally available and exert anticonvulsant activity in rodents*”. *Brain Res.* **2000**, 860, 149-156.
- Bonina, F.P.; Arenare, L.; Palagiano, F.; Saija, A.; Nava, F.; Trombetta, D.; de Caprariis, P.; “*Synthesis, stability and pharmacological evaluation of nipecotic acid prodrugs*”. *J Pharm Sci*, **1999**, 88, 561-567.
- Bonina, F.P.; Puglia, C.; Rimoli, M.G.; Melisi, D.; Boatto, G.; Nieddu, M.; Calignano, A.; La Rana, G.; 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**, 1,25-36.
- Bouchard, J.F.; Lepicier, P.; Lamontagne, D. "Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart". *Life Sciences*. **2003**, 72 (16), 1859–1870.
- Brennan, P.A.; Moncada, S. "From pollutant gas to biological messenger: the diverse actions of nitric oxide in cancer". *Ann R Coll Surg Engl*. **2002**, 84(2), 75-78.
- Brocks, D. R.and Jamali, F. "Pharmacokinetics of ketorolac tromethamine". *Clin. Pharmacokin*. **1992**, 23, 415–427.
- Calignano, A.; La Rana, G.; Giuffrida, A.; Piomelli, D. "Control of pain initiation by endogenous cannabinoids". *Nature*. **1998**, 394, 277-281.
- Calignano, A.; La Rana, G.; Piomelli, D. "Antinociceptive activity of the endogenous fatty acid amide, palmitylethanolamide". *Eur J Pharmacol*. **2001** 419, 191-8.
- Capasso, R.; Izzo, A.A.; Fezza, F.; Pinto, A.; Capasso, F.; Mascolo, N.; Di Marzo, V. "Inhibitory effect of palmitoylethanolamide on gastrointestinal motility in mice". *British Journal of Pharmacology*. **2001**, 134 (5), 945–950.
- Chang, L.C.; Tsao, L.T., Chang, C.S.; Chen, C.J., Huang; L.J., Kuo, S.C., Lin, R.H., Wang, J.P. "Inhibition of nitric oxide production by the carbazole compound LCY-2-CHO via blockade of activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein activation in microglia". *Biochem. Pharmacol*. **2008**, 76, 507–519.
- Chen, S.R.; Cai, Y.Q.; Pan, H.L "Plasticity and emerging role of BKCa channels in nociceptive control in neuropathic pain". *J. Neurochem*. **2009**, 110, 352–362.
- Chu, Y.C.; Guan, Y.; Skinner, J.; Raja, S.N., Johns, R.A.; Tao, Y.X. "Effect of genetic knockout or pharmacologic inhibition of neuronal nitric oxide synthase on complete Freund's adjuvant induced persistent pain". *Pain*. **2005**. 119, 113–123.

- Cioli, V.; Putzolu, S.; Rossi, V.; Barcellona, P. S.; Corradino, C. “*The role of direct tissue contact in the production of gastro-intestinal ulcers by anti-inflammatory drugs in rats*”. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1979, 50, 283–289.
- Clark, A.K.; Yip, P.K., Grist, J., Gentry, C., Staniland, A.A., Marchand, F., Dehvari, M.; Wotherspoon, G.; Winter, J., Ullah, J., Bevan, S.; Malcangio, M. “*Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain*”. *Proc. Natl Acad. Sci.* **2007**, USA, 104, 10655–10660.
- Clementi, F. e ,Fumagalli, G. “*Farmacologia generale e molecolare*”. III ed., **2004**, UTET, Torino.
- Conti, S.; Costa, B.; Colleoni, M.; Parolaro, D.; Giagnoni, G. “*Antiinflammatory action of endocannabinoidi palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. British Journal of Pharmacology.* 2002, 135 (1), 181–187.
- Cooper, S.A. “Five studies on ibuprofen for postsurgical dental pain”. *Am J Med.* 1984, 77(1A), 70-7.
- Costa, B.; Conti, S.; Giagnoni, G., Colleoni, M. “*Therapeutic effect of the endogenous fatty acid amide, palmitoylethanolamide, in rat acute inflammation: inhibition of nitric oxide and cyclo-oxygenase systems*”. *British Journal of Pharmacology.* **2002**, 137 (4), 413–420.
- Coyle, D.E. “*Partial peripheral nerve injury leads to activation of astroglia and microglia which parallels the development of allodynic behavior*”. *Glia.* **1998**, 23, 75–83.
- Curcio, A.; Sasso, O.; Melisi, D.; Nieddu, M., La Rana, G.; Russo, R.; Gavini, E.; Boatto, G.; Abignente, E.; Calignano. A.; Rimoli, M.G. “*Galactosyl Prodrug of Ketorolac: Synthesis, Stability, and Pharmacological and Pharmacokinetic Evaluations*”. *J. Med. Chem.* **2009**, 52(12), 3794-3800.
- De Petrocellis, L.; Bisogno, T.; Ligresti, A., Bifulco, M.; Melck, D.; Di Marzo, V. “*Effect on cancer cell proliferation of palmitoylethanolamide, a fatty acid amide*

*interacting with both the cannabinoid and vanilloid signalling systems*". *Fundamental & Clinical Pharmacology*. **2002**, 16 (4), 297–302.

Di Marzo, V.; De Petrocellis; L. "*The endogenous cannabonoid signalling system: chemistry, biochemistry and physiology*". *Internet Journal of Science* **1997**.

Di Marzo, V.; Melck, D.; Orlando, P.; Bisogno, T., Zagoory, O.; Bifulco, M.; Vogel, Z., De Petrocellis, L. "*Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells*". *Biochemical Journal*. **2001**, 358 (Pt. 1), 249–255.

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

Dula, D.J.; Anderson, R.; Wood, G.C. "*A prospective study comparing i.m. ketorolac with i.m. meperidine in the treatment of acute biliary colic*". *J. Emerg. Med*. **2000**, 20, 121-124.

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

Fischer, H.S.; Zernig, G.; Hauser, K.F.; Gerard, C.; Hersh, L.B.; Saria, A. "*Neutral endopeptidase knockout induces hyperalgesia in a model of visceral pain, an effect related to bradykinin and nitric oxide*". *J. Mol. Neurosci*. **2002**. 18, 129–134.

Franklin, A.; Parmentier-Batteur, S.; Walter, L.; Greenberg, D.A.; Stella, N. "*Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility*". *Journal of Neuroscience*. **2003**, 23 (21), 7767–7775.

Fu, K.Y.; Light, A.R.; Matsushima, G.K.; Maixner, W. "*Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind paw*". *Brain Res*. **1999**, 825, 59–67.

- Fukumura, D.; Yuan, F.; Endo, M.; Jain, R.K. “*Role of Nitric Oxide in tumor microcirculation*”. *Am J Pathol.* **1997**, 150, 713-725.
- Giordano, C.; Siniscalco, D.; Melisi, D.; Luongo L., Curcio A.; Soukupova, M.; Palazzo, E.; Marabese, I., De Chiaro M.; Rimoli, M.G.; Rossi, F.; Maione, S.; De novellis, V. “*The galactosylation of N( $\omega$ )-nitro-L-arginine enhances its anti-nocifensive or anti-allodynic effects by targeting glia in healthy and neuropathic mice.*”. *Eur J Pharmacol.* **2011**, 656(1-3), 52-62.
- Goodman and Gilman “*Le Basi Farmacologiche della Terapia*”. IX Edizione. McGraw-Hill, **2000**.
- Guidera, A.C.; Luchs, J.I.; Undell, I.J. “*Keratitis, ulceration and perforation associated with topical nonsteroidal and anti-inflammatory drugs*”. *Ophthalmology.* **2001**, 108, 936-944.
- Hao, J.X.; Xu, X.J. “*Treatment of a chronic allodynia-like response in spinally injured rats: effects of systemically administered nitric oxide synthase inhibitors*”. *Pain* **1996**. 66, 313–319.
- Hawkey, C.; Laine, L.; Simon, T.; Beaulieu, A.; Maldonado-Cocco, J.; Acevedo, E.; Shahane, A.; Quan, H.; Bolognese, J. and Mortensen, E. “*Comparison of the effect of rofecoxib, ibuprofen and placebo on the gastroduodenal mucosa of patients with osteoarthritis: A randomized, double blind, placebo-controlled trial*”. *Arthritis Rheum.* **2000**, 433, 70–377.
- Hirst, D.; Robson, T. “*Targeting nitric oxide for cancer therapy*”. *J Pharm Pharmacol,* **2007**, 59, 3-13.
- Hobbs, A.J.; Higgs, A.; Moncada S. “*Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target*”. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **1999**, 39, 191-220.
- Isseman, I.; Green, S. “*Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators*”. *Nature.* **1990**, 347(6294), 645-650.

- Jaggar, S.I.; Hasnie, F.S.; Sellaturay, S.; Rice, A.S. “*The anti-hyperalgesic actions of the cannabinoid anandamide and the putative CB2 receptor agonist palmitoylethanolamide in visceral and somatic inflammatory pain*”. *Pain*. **1998**, 76, 189- 99.
- Katsung, B.G. “*Farmacologia generale e clinica*”. V Edizione italiana sulla VIII di lingua inglese. 2003, PICCIN, Padova.
- Khalil, Z.; Khodr, B. “*A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury*”. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, 31, 430–439.
- Kimmel, S.E.; Berlin, J.A.; Reilly, M.; Jaskowiak, J.; Kishel, L.; Chittams, J.; Strom, B.L. “*The effects of nonselective non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory medications on the risk of nonfatal myocardial infarction and their interaction with aspirin*”. *J Am Coll Cardiol.* **2004**, 43(6), 985-90.
- Kishi, T.; Hirooka, Y.; Mukai, Y.; Shimokawa, H.; Takeshita, A. “*Atorvastatin causes depressor and sympatho-inhibitory effects with upregulation of nitric oxide synthases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*”. *J. Hypertens.* **2003**, 21, 379–386.
- Kuehl, F.A.; Jacob, T.A.; Ganley, O.H.; Onnond, R.E; Meisinger, M.A.P. “*The identification of N-(2-hydroxyethyl)-palmitamide as a naturally occurring anti-inflammatory agent*”. *J Am.Chem. Soc.* **1957**, 79, 5577 - 5578.
- Laudanno, O.M.; Cesolari, J.A.; Esnarriaga, J.; San Miguel, P.; Bedini, O.A.”*In vivo selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal ulcers in rat*”. *Dig Dis Sci.* **2000**, 45(7),1359-6.
- Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. “*Animal models of nociception. Pharmacol*”. *Rev.* **2001**, 53, 597–652.
- Ledeboer, A.; Sloane, E.M.; Milligan, E.D.; Frank, M.G.; Mahony, J.H.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. “*Minocycline attenuates mechanical allodynia and*

*proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation*". *Pain*. **2005**, 115, 71–83.

Lemke T. S.; Williams, D. A. “*Foye’s Principi di Chimica Faemaceutic*”. V Edizione italiana condotta sulla VI americana a cura di F. Dall’Acqua e S. Cafieri. **2010**, PICCIN, Padova.

LoVerme, J.L. Fu, J.; Astarita, G.; La Rana, G.; Russo, R.; Calignano, A., Piomelli, D. “*The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  mediates the anti-inflammatory actions of palmitoylethanolamide*”. *Molecular Pharmacology*. **2005**, 67 (1), 15–19.

Luongo, L.; Sajic, M.; Grist, J.; Clark, A.K., Maione, S.; Malcangio, M. “*Spinal changes associated with mechanical hypersensitivity in a model of Guillain–Barré syndrome*”. *Neurosci Lett*. **2008**, 437, 98–102.

MacDonald, T.M.; Wei, L. “*Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin*”. *Lancet*. **2003**, 361(9357), 573-4.

Martucci, C.; Trovato, A.E.; Costa, B.; Borsani, E.; Franchi, S.; Magnaghi, V.; Panerai, A.E., Rodella, L.F.; Valsecchi, A.E.; Sacerdote, P., Colleoni, M. “*The purinergic antagonist PPADS reduces pain related behaviours and interleukin-1beta, interleukin-6, iNOS and nNOS overproduction in central and peripheral nervous system after peripheral neuropathy in mice*”. *Pain*. **2008**, 137, 81–95.

Mattace Raso, G.; Esposito, E.; Vitiello, S.; Iacono, A.; Santoro, A.; D’Agostino, G.; Sasso, O.; Russo, R.; Piazza P.V.; Calignano, A.; Meli, R. “*Palmitoylethanolamide stimulation induces allopregnanolone synthesis in C6 Cells and primary astrocytes: involvement of peroxisome-proliferator activated receptor- $\alpha$* ”. *J Neuroendocrinol*. **2011** 23(7), 591-600.

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

Melisi, D.; Curcio, A.; **Luongo, E.**; Morelli, E.; Rimoli, M.G. “*D-Galactose as a Vector for Prodrug Design*.” *Curr. Top. Med. Chem*. **2011**, 11, 2288-2298.

- Melisi, D.; Rosso, F.; Curcio, A.; Tortora, C.; Nieddu, M.; Marino, G.; Lettieri, M.; Grimaldo, A.; **Luongo, E.**; Romano, S.; Romano, M. F.; Boatto, G.; Abignente E.; Barbarisi A.; Rimoli M.G. “*Galactosyl Derivative of N $\omega$ -Nitro-L-Arginine: Study of Antiproliferative Activity on Human Thyroid Follicular Carcinoma Cells*”. *J. Cell. Physiol.* **2009**, 221, 440-447.
- Melisi, D.; Secondo, A.; Montoro, P.; Piacente, S.; Rimoli, M.G.; Minale, M.; de Caprariis, P.; Annunziato, L. “*Galactosyl derivatives of L-arginine and D-arginine: synthesis, stability, cell permeation, and nitric oxide production in pituitary GH3 cells*”. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4826–4833.
- Meller, S.T.; Gebhart, G.F. “*Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord*”. *Pain.* **1993**, 52, 127–136.
- Meller, S.T.; Pechman, P.S.; Gebhart, G.F.; Maves, T.J.; “*Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat*”. *Neuroscience.* **1992**, 50, 7–10.
- Milligan, E.D.; Watkins, L.R. “*Pathological and protective roles of glia in chronic Pain*”. *Nat. Rev. Neurosci.* **2009**, 10, 23–36.
- Mishra, A.; Veerasamy, R.; Jain, P.K.; Dixit, V.K.; Agrawal, R.K. “*Synthesis, characterization and pharmacological evaluation of amide prodrugs of ketorolac*”. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2008**, 43(11), 2464-2472.
- Mueckler, M. “*Facilitative glucose transporters*”. *Eur J Bioche.* **1994**, 219, 713-725.
- Patel, T.N.; Goldberg, K.C. “*Use of aspirin and ibuprofen compared with aspirin alone and the risk of myocardial infarction.* *Arch Intern Med.* **2004**, 164(8), 852-6.
- Patent: NA2009A000027; depositato il 11 giugno 2009. Titolo: “*Profarmaco galattosilato della N $\omega$ -Nitro-L-Arginina ad uso analgesico ed antinfiammatorio con migliori caratteristiche farmacocinetiche e di tollerabilità del farmaco di partenza*”. Titolari: Rimoli M.G. e Seconda Università di Napoli, Dipartimento di Medicina Sperimentale. Inventori: Abignente E., Curcio A., De Novellis V.,

**Luongo E.**, Maione S., Marabese I., Melisi D., Palazzo E., Rimoli M.G., Rossi F., Rossi F.

Patent: US 2011212904. International Publication Date: 01/09/2011. “*Galactosylated prodrugs of non-steroidal anti-inflammatories with improved pharmacokinetic characteristics and reduced toxicity of the starting drug*”. Applicants: Rimoli M.G., Stewart Italia s.r.l., Calignano A., Cuomo R., Boatto G. Inventors: Abignente E., Boatto G., Calignano A., Curcio A., De Lucia S., La Rana G., Melisi D., Nieddu M., Rimoli M.G., Sasso O., Cuomo R., **Luongo E.**, Sarnelli G., Russo R., Cirillo C.

Patent: WO 2010/013279A2. International Publication Date: 04/02/2010. “*Galactosylated prodrugs of non-steroidal anti-inflammatories with improved pharmacokinetic characteristics and reduced toxicity of the starting drug*”. Applicants: Rimoli M.G., Stewart Italia s.r.l., Calignano A., Cuomo R., Boatto G. Inventors: Abignente E., Boatto G., Calignano A., Curcio A., De Lucia S., La Rana G., Melisi D., Nieddu M., Rimoli M.G., Sasso O., Cuomo R., **Luongo E.**, Sarnelli G., Russo R., Cirillo C.

Prast, H.; Philippu, A. “*Nitric oxide as modulator of neuronal function*”. *Prog. Neurobiol.* **2001**, 64, 51–68.

Puffenbarger, R.A. “*Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids*”. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* **2005**, 4(6), 625-31.

Racz, I.; Nadal, X.; Alferink, J., Baños, J.E.; Rehnelt, J.; Martín, M.; Pintado, B.; Gutierrez-Adan, A.; Sanguino, E.; Bellora, N.; Manzanares, J.; Zimmer, A.; Maldonado, R. “*Interferon-gamma is a critical modulator of CB(2) cannabinoid receptor signaling during neuropathic pain*”. *J. Neurosci.* 2008, 28, 12136–12145.

Rainsford, K. D. “*Mechanisms of gastrointestinal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs*”. *Scand. J. Gastroenterol.* **1989**, Suppl. 163, 9–16.

- Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. “*Farmacologia*”. III edizione. Edizione italiana a cura di Alfredo Gorio e Annamaria Di Giulio. **2005**
- Ren, K.; Dubner, R. “*Neuron–glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity*”. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **2008**, 21, 570–579.
- Rodriguez de Fonseca, F.; Navarro, M.; Gomez, R.; Escuredo, L.; Nava, F.; Fu, J.; Murillo-Rodriguez, E.; Giuffrida, A.; LoVerme, J.; Gaetani, S.; Kathuria, S.; Gall, C.; Piomelli D. “*An anorexic lipid mediator regulated by feeding*”. *Nature.* **2001**, 414(6860), 209-12.
- Romero-Sandoval, E.A.; Horvath, R.J., DeLeo, J.A. “*Neuroimmune interactions and pain: focus on glial-modulating targets*”. *Curr. Opin. Investig. Drug.* **2008**, 9, 726–734.
- Sagar, S.M.; Singh, G.; Hodson, I.D.; Whitton, A.C. “*Nitric oxide and anti-cancer therapy*”. *Cancer Treat Rev.* **1995**, 21, 159-181.
- Satake, K.; Matsuyama, Y.; Kamiya, M.; Kawakami, H.; Iwata, H.; Adachi, K.; Kiuchi, K. “*Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury*”. *Mol. Brain Res.* **2000**. 85, 114–122.
- Scholz, J.; Woolf, C.J. “*The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia*”. *Nat. Neurosci.* **2007**, 10, 1361–1368.
- Sheerin, A.H.; Zhang, X.; Saucier, D.M.; Corcoran, M.E. “*Selective antiepileptic effects of N-palmitoylethanolamide, a putative endocannabinoid*”. *Epilepsia* **2004**, 45 (10), 1184–1188.
- Skaper, S.D.; Buriani, A.; Dal Toso, R.; Petrelli, L.; Romanello, S.; Facci, L.; Leon, A. “*The aliamide palmitoylethanolamide and cannabinoids, but not anandamide, are protective in a delayed postglutamate paradigm of excitotoxic death in cerebellar granule neurons*”. *82 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **1996**, 93 (9), 3984–3989.

- Smith T.A. “Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue”, *Br J Biomed Sci.* **1999**, 56(4), 285-292.
- Snyder, S.H. “Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters”. *Science* **1992**. 257, 494–496.
- Stanczak, A.; Ferrá, A.; “Prodrugs and soft drugs”. *Pharmacol Rep.* **2006**, 58, 599-613.
- Stella, V.J.; Borchardt, R.T.; Hageman, M.J.; Oliyai R.; Maag, H.; Tilley J.W. “Prodrugs: Challenges and Rewards”. I Edizione, **2007**, Springer, USA.
- Sultan, A.; McQuay, H.J.; Moore, R.A.; Derry, S. “Single dose oral flurbiprofen for acute postoperative pain in adults”. *The Cochrane Database System Review.* **2009**, 3, CD007358.
- Tabertero, A.; Medina, J.M.; Giaume, C. “Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions”. *J. Neurochem.* **2006**, 99, 1049–1061.
- Tang, Q.; Svensson, C.I.; Fitzsimmons, B.; Webb, M.; Yaksh, T.L.; Hua, X.Y. “Inhibition of spinal constitutive NOS-2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation-induced hyperalgesia and spinal p38 activation”. *Eur. J. Neurosci.* **2007**, 25, I2964–I2972.
- Todd, P. A.; Brogden, R. N. “Oxaprozin. A Preliminary Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy”. *Drugs.* **1986**, 32(4), 291-312.
- Tozer, G.M.; Everett, S.A. “Nitric oxide in tumour biology and cancer therapy. Part 2: therapeutic implications”. *Clin Oncol*, **1997**, 9, 357-364.
- Tsunematsu, H.; Yoshida, S.; Horie, K.; Yamamoto M. “Synthesis and stereoselective enzymatic hydrolysis of flurbiprofen-basic amino acid ethyl esters”. *J. Drug Target.* **1995**, 2(6), 517-525.

- Uhrig, R.K.; Picard, M.A.; Beyreuther, K.; Wiessler, M., “*Synthesis of antioxidative and anti-inflammatory drugs glucoconjugates*”. *Carbohydr Res.* **2000**, 325, 72-80.
- Vyas, S.; Trivedi, P.; Chaturvedi S. C. “*Ketorolac-dextran conjugates: Synthesis, in vitro and in vivo evaluation*”. *Acta Pharm.* **2007**, 57, 441–450.
- Wagner, W.; Khanna, P.; Furst, D.E. “*Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Disease-modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics and Drugs Used in Gout*”. In *Basic and Clinical Pharmacology*, 9th ed.; Katzung, B. G.; McGraw-Hill: New York, **2004**; pp. 586.
- Wermuth C.G. “*Le applicazioni della chimica farmaceutica*”.**2000**, EdiSES, Napoli.
- Wolfe S.L., “*Introduzione alla biologia cellulare e molecolare*”, IX ed., **2000**, EdiSES, Napoli.
- XU, W.; Liu, L.Z.; Loizidou, M.; Ahmed, M.; Charles, I.G. “*The role of nitric oxide in cancer*”. *Cell Res.* **2002**, 12(5-6), 311-320.
- Yamamoto, T.; Shimoyama, N. “*Role of nitric oxide in the development of thermal hyperesthesia induced by sciatic nerve constriction injury in the rat*”. *Anesthesiology.* **1995**, 82, 1266–1273.
- Yang, H.Y.; Chang, H.K.; Lee, J.W.; Kim, Y.S.; Kim, H.; Lee, M.H.; Shin, M.S.; Ham, D.H., Park, H.K.; Lee, H.; Kim, C.J. “*Amygdalin suppresses lipopolysaccharide-induced expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in mouse BV2 microglial cells*”. *Neurol. Res.* **2007**, 29 (Suppl. 1), S59–S64.
- Yoon, Y.W.; Sung, B.; Chung, J.M. “*Nitric oxide mediates behavioural signs of neuropathic pain in an experimental rat model*”. *NeuroReport.* **1998**, 9, 367–372.