



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PALERMO



*Ministero dell'Istruzione
dell'Università e Ricerca*

Università degli Studi di Palermo

Facoltà di Farmacia

**Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e
Farmaceutiche**

DOTTORATO DI RICERCA

in

“Tecnologie delle Sostanze Biologicamente Attive”

XXIV CICLO, A.A. 2010/2011

SSD CHIM/09

**Sintesi, caratterizzazione e nuove strategie formulative
per la somministrazione di nuovi derivati
dopaminici nella terapia della malattia di Parkinson**

Coordinatore:

Ch.mo Prof. Gaetano Giammona

**Tesi di Dottorato di Ricerca di:
Anna Lisa Scaturro**

Tutor:

Ch.mo Prof. L.I. Giannola

INDICE

1. PRESENTAZIONE

2. BACKGROUND

2.1 La Malattia di Parkinson

2.2. Trattamento farmacologico del PD: i farmaci impiegati

2.3. Farmaci più impiegati: potenzialità e limiti

2.3.1. L-DOPA

2.3.2 Esteri della L-DOPA

2.3.3. Ropirinolo

2.4. Vie di somministrazione alternative: la mucosa buccale

2.5. bioadesione ed Adhesive Drug Delivery Systems

2.6 Struttura e funzionamento della Barriera Emato Encefalica

2.7. Prodrug e site targeting

3. APPROCCIO TECNOLOGICO AL MIGLIORAMENTO DELLA BIODISPONIBILITA' DI FARMACI PER IL PD

3.1 Studi preliminari sulla somministrabilità di L-Dopa Metil Estere attraverso la mucosa buccale

3.1.1 Premessa

3.1.2 Risultati e discussione

3.2. Formulazione di compresse buccali per il rilascio controllato di Ropinirolo

3.2.1 Premessa

3.2.2 Risultati e discussione

3.3 PARTE SPERIMENTALE DELL'APPROCCIO TECNOLOGICO

3.3.1 Materiali e strumenti

3.3.2 Metodi per gli studi sull'LDME

3.3.2.1 Stabilità chimica della LDME in soluzione acquosa

3.3.2.2 Stabilità enzimatica della LDME

3.3.2.3 Preparazione della mucosa buccale porcina per gli esperimenti di permeazione

3.3.2.4 Test di permeazione ex vivo attraverso mucosa buccale

3.3.2.5 Analisi dei dati

3.3.3 Metodi per gli studi sul Ropinirolo

3.3.3.1 Preparazione delle matrici di Ropinirolo

3.3.3.2 Preparazione delle compresse matriciali cariche di Ropirinolo

3.3.3.3 Test di swelling delle compresse matriciali cariche di Ropirinolo

3.3.3.4 Test di mucoadesione in vitro delle compresse matriciali cariche di Ropirinolo

3.3.3.5 Rilascio in vitro del Ropinirolo dalle compresse matriciali

3.3.3.6 Preparazione della mucosa buccale porcina per gli esperimenti di permeazione

3.3.3.7 Test di permeazione ex vivo di Ropinirolo dopo somministrazione di compresse matriciali

3.3.3.8 Permeazione ex vivo di Ropinirolo dopo somministrazione di compresse matriciali mediante co-somministrazione di enhancers chimici

3.3.3.9 Analisi dei dati

3.3.2.10 Estrazione del ROP dalla mucosa buccale porcina

4. APPROCCIO SINTETICO AL MIGLIORAMENTO DELLA BIODISPONIBILITA' DI FARMACI PER IL PD

4.1. Premessa

4.2. Progettazione di due profarmaci della Dopamina: L-leucine β -(3,4-dihydroxyphenyl) etilamide (DA-Leu) ed L-Tryptophan β -(3,4-dihydroxyphenyl) etilamide (DA-Tryp)

4.2.1 Sintesi e caratterizzazione

4.2.2 Determinazione del coefficiente di distribuzione a pH 7.4

4.2.3. Stabilità chimica del DA-Leu e del DA-Tryp.

4.2.4. Stabilità del DA-Leu e del DA-Tryp in plasma umano

4.2.5. Stabilità del DA-Leu e del DA-Tryp in omogenato di cervello di ratto.

4.3 Valutazione in vitro dell'attraversamento della barriera emato-encefalica

4.3.1 Valutazione dell'attitudine di un nuovo derivato aminoacidico della dopamina (DA-Phen) ad attraversare la BBB

4.3.1.1. Studi di permeabilità mediante modello PAMPA-BBB

4.3.1.2. Studi di permeabilità mediante modello Caco-2

4.4. PARTE SPERIMENTALE DELL'APPROCCIO SINTETICO

4.4.1. Materiali e strumenti

4.4.2. Metodi

4.4.2.1 Sintesi dell'L-Leucina - β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (DA-Leu)

4.4.2.1.1. Sintesi dell' N-Boc-L-Leucina- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

4.4.2.1.2. Idrolisi dell' N-Boc-L- Leucina - β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

4.4.2.1.3. Demetilazione dell'L- Leucina - β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

4.4.2.2. Sintesi dell' L-Triptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (DA-Tryp)

4.4.2.2.1. sintesi dell'N-Boc-L-Triptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

4.4.2.2.2. Idrolisi dell' N-Boc-L-triptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

4.4.2.2.3. Demetilazione dell' L-Triptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

4.4.2.3. Determinazione del coefficiente di distribuzione a pH 7.4

4.4.2.4. Stabilità chimica DA-Leu e del DA-Tryp

4.4.2.5. Stabilità del DA-Leu e del DA-Tryp in plasma umano

4.4.2.6. Stabilità del DA-Leu e del DA-Tryp in presenza di enzimi cerebrali

4.4.2.7. Valutazione in vitro dell'attraversamento della barriera emato-encefalica

4.4.2.7.1. Studi di trasporto mediante modello PAMPA-BBB

4.4.2.7.1.1. Stabilità chimica dell'L-fenilalanina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide (DA-Phen)

4.4.2.7.1.2. Assemblaggio del sistema PAMPA-BBB

4.4.2.7.1.3 Validazione del modello PAMPA-BBB

4.4.2.7.1.4 Studi di permeabilità dell'L-fenilalanina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide

4.4.2.7.1.5. Analisi dei dati

4.4.2.7.2. Colture cellulari Caco-2

4.4.2.7.2.1. Test di tossicità su linea cellulare Caco-2

4.4.2.7.2.2. Studi di trasporto bidirezionale attraverso linea cellulare Caco-2

4.4.2.7.2.3. Analisi dei dati

5. BIBLIOGRAFIA

1. PRESENTAZIONE

L'individuazione di nuove strategie terapeutiche, in grado di intervenire in maniera sempre più efficace sul trattamento delle patologie del sistema nervoso centrale (SNC), costituisce un argomento molto interessante della ricerca.

Le patologie neurodegenerative rappresentano delle vere e proprie emergenze clinico-farmacologiche sia nel campo della prevenzione che in quello della terapia. In particolare, la malattia di Parkinson (PD) è caratterizzata da una lenta e progressiva degenerazione del sistema dopaminergico che compromette il controllo dei muscoli, i movimenti e l'equilibrio. Non esiste una vera e propria cura della PD; la terapia è solo sintomatica ed ha lo scopo di mitigare i sintomi, alleviare le disabilità e migliorare le funzioni motorie. (The Goodman e Gilman's Pharmacological Bases of Therapeutics 2008; Rao S.S *et al.*, 2006) -Molto spesso, la presenza di effetti collaterali, la complessa somministrazione giornaliera e il non raggiungimento di concentrazioni adeguate di farmaco nel sito d'azione rappresentano i principali limiti nell'uso di formulazioni a rilascio convenzionale.

L'introduzione di sistemi di rilascio non convenzionali, progettati allo scopo di aumentare l'efficacia e la sicurezza dei farmaci, ha avuto un importante impatto nella popolazione in quanto essi sono in grado di migliorare in modo significativo la qualità di vita dei pazienti che preferiscono somministrazioni alternative e accettano sempre più spesso le nuove tecnologie di rilascio dei farmaci.

Questi aspetti hanno determinato un crescente interesse per lo sviluppo di Drug Delivery Systems (DDS) allo scopo di prolungare il tempo di cessione, di migliorare la performance dei farmaci nell'ambiente biologico, mantenere costante la concentrazione plasmatica e/o tissutale del farmaco, riducendo nel contempo le fluttuazioni ematiche, le dosi somministrate e i connessi effetti indesiderati. I sistemi innovativi per il rilascio di farmaci ottimizzano la fase biofarmaceutica e forniscono una prestabilita e riproducibile cinetica di rilascio.

Sulla base delle considerazioni esposte, la realizzazione di sistemi terapeutici innovativi, in grado di superare i problemi tipici delle forme farmaceutiche convenzionali, potrebbe costituire un valido approccio anche nel trattamento della PD.

Una soluzione ancor più interessante potrebbe essere quella di direzionare selettivamente le sostanze farmacologicamente attive al cervello. Rispetto ad altri tessuti l'ingresso all'interno del SNC è limitato da fattori di trasporto e metabolici e dalle specifiche proprietà della barriera emato-encefalica (BBB), formata dall'endotelio dei capillari cerebrali. Le caratteristiche endoteliali rendono, infatti, la BBB una interfaccia filtrante dinamica molto selettiva che impedisce il passaggio della maggior parte delle sostanze idrofile dal sangue al SNC (Scherrmann J.M., 2002; Ballabh P. *et al.*, 2004; Lo E.H. *et al.*, 2001; Wolburg H., Lippoldt A., 2002). Per promuovere il direzionamento dei farmaci verso il CNS sono state proposte varie strategie, alcune delle quali invasive, come l'applicazione di impianti intracerebrali, alterazione osmotica della BBB, modificazione chimica temporanea delle Tight Junctions; veicolazione del farmaco in liposomi e nanoparticelle, coniugazione del farmaco, o del sistema contenente il farmaco, con anticorpi specifici per un recettore presente sulla BBB, lipidizzazione delle molecole, modificazione strutturale di molecole attive per migliorarne le proprietà farmacocinetiche (Pardridge W.M., 2007; Smith Q.R., 2005).

Un'interessante e, soprattutto, non invasiva via per ottimizzare la biodisponibilità dei farmaci nel SNC potrebbe essere la coniugazione degli stessi con specifici vettori capaci di veicolarli all'interno del CNS sfruttando un meccanismo di trasporto carrier mediato (Fernandez C. *et al.*, 2003; Giannola L. I. *et al.*, 2008; Di Stefano A. *et al.*, 2008; Di Stefano A. *et al.*, 2004). La derivatizzazione e/o la coniugazione tramite legami covalenti con molecole appropriate potrebbe migliorare le proprietà necessarie per il passaggio attraverso la BBB ed allo stesso tempo potrebbero ottimizzare la distribuzione del farmaco minimizzandone gli effetti indesiderati (Itoh S., Oo C., 2010; Stocchi F. *et al.*, 2005).

I coniugati, una volta raggiunto il CNS, potrebbero essere scissi enzimaticamente rilasciando il principio attivo libero nel sito target (Giannola L. I. *et al.*, 2008). Dopo la scissione del legame farmaco-vettore, quest'ultimo dovrebbe essere metabolizzato *in situ*, evitando fenomeni di accumulo; il farmaco,

liberatosi, trovando difficoltà nel retrodiffondere dovrebbe rimanere intrappolato nel CNS, esplicando la sua azione.

In questa tesi di Dottorato si intende percorrere un doppio canale di ricerca:

- da un lato, ottenere un miglioramento della biodisponibilità di farmaci noti e ampiamente usati nel trattamento della PD attraverso l'utilizzo di nuove forme di dosaggio mucoadesive, opportunamente formulate per la somministrazione attraverso la via buccale (approccio tecnologico);

- dall'altro, la sintesi di nuove molecole che possano agire da *prodrug* della Dopamina per il direzionamento di quest'ultima nel SNC (approccio sintetico).

2. BACKGROUND

2.1 La Malattia di Parkinson

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, la malattia del Parkinson è la seconda patologia neurodegenerativa più diffusa al mondo, dopo la malattia di Alzheimer, ed una delle più comuni cause di disabilità neurologica ad alto impatto sociale (Pezzoli G. *et al.*, 2004). La sua incidenza raggiunge l'1-2% nelle persone di età superiore ai 50 anni, anche se il 5-10% dei casi è classificato ad esordio giovanile e si sviluppa in età inferiore ai 40 anni. Presenta una distribuzione a livello mondiale e non ha alcuna distinzione di genere (Goole J. , Amighi K., 2009).

La Malattia di Parkinson (PD) è una patologia neurodegenerativa cronica e progressiva, caratterizzata da un quadro clinico che mostra alterazioni di natura motoria, cognitiva e funzionale (Daniel O. *et al.*, 2012).

Attualmente l'eziologia della PD non è del tutto chiarita, numerosi studi caso-controllo hanno, infatti, mostrato la complessità della patogenesi. Tra le cause principali si possono annoverare:

- il trattamento con alcuni farmaci (tra cui i dopaminoagonisti) o l'assunzione di sostanze stupefacenti,
- traumi cerebrali, encefaliti virali, ed aterosclerosi cerebrale,
- fattori genetici: sono stati identificati geni coinvolti nella predisposizione alla PD, soprattutto ad esordio giovanile, (α -sinucleina, leucina-rich repeat kinase 2 e la glucocerebrosidasi) (Schapira A.H., Jenner P, 2011),
- esposizione a tossine (esempio la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahydrodropyridine (MPTP)), pesticidi, erbicidi sintetici e metalli (Tsuboi Y., 2012; Schapira A., 2008).

Studi epidemiologici, sull'uomo suggeriscono, comunque, che la genesi sia multifattoriale, ovvero il risultato di una possibile combinazione tra predisposizione genetica ed esposizione protratta a una o più sostanze tossiche

(Tsuboi Y., 2012). Recenti studi hanno messo in evidenza che la PD ha un'incidenza minore nei fumatori, nei consumatori di caffeina e farmaci antinfiammatori non steroidei: queste sostanze possono assolvere una funzione protettiva delle cellule dei gangli della base. Ad esempio la nicotina oltre ad aumentare il rilascio di dopamina a livello striatale è anche in grado di inibire l'enzima monoaminoossidasi, responsabile dello stress ossidativo (Obeso J.A., 2010).

Sebbene l'eziologia della PD sia ancora oggetto di discussione, la patogenesi è stata ampiamente identificata nella degenerazione dei neuroni dopaminergici della via nigrostriatale, ovvero quel complesso neuronale che interconnette i nuclei dei gangli della base (GB), i quali hanno il fisiologico compito di coordinare il movimento (Brown P., Williams D., 2005). I GB sono, inoltre, coinvolti nell'apprendimento, nella pianificazione, nella memoria e nelle emozioni. La drastica riduzione della Dopamina (DA) si verifica, soprattutto, a livello della *Substantia Nigra* e del *Corpo Striato*, che ricevono le principali afferenze dalla corteccia e riproiettano a questa attraverso il talamo. In questa sequenza complessiva di connessioni possono essere identificati due differenti circuiti: *un circuito diretto* - che facilita il movimento, e *un circuito indiretto* - che sopprime le attività motorie (Obeso J.A., 2010). I due circuiti sono modulati in maniera differente dalla proiezione dopaminergica proveniente dal mesencefalo: il rilascio di DA nello striato attiva i recettori D1 e induce un'accensione della via diretta, che facilita il movimento, ed allo stesso tempo, per attivazione dei recettori D2, inibisce la via indiretta che limita il movimento con conseguente facilitazione motoria (Nieuwenhuys R. *et al.*, 2007).

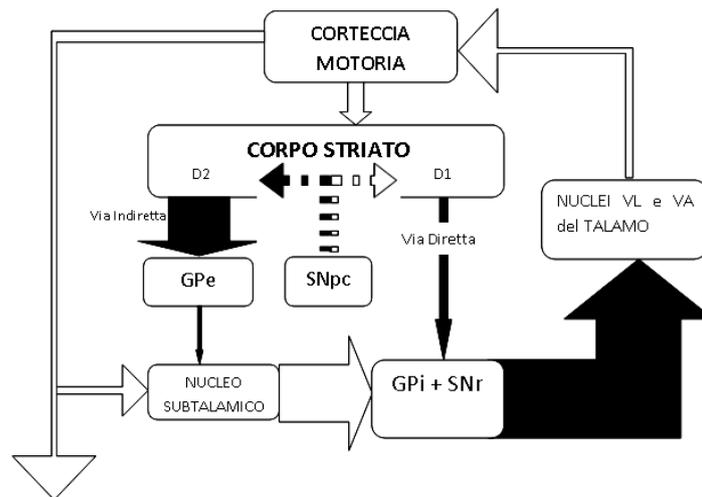


Figura 1. Schema del circuito neuronale tra i gangli della base e corteccia

A causa della perdita del normale controllo dopaminergico nigrostriatale, nella PD la via diretta non viene eccitata e la via indiretta non viene inibita. Questo genera una riduzione della trasmissione eccitatoria talamo-corticale, con conseguente perdita dell'attivazione delle aree corticali coinvolte nella programmazione e nella regolazione del movimento e, quindi, difficoltà motoria. Inoltre, vengono meno gli input inibitori dopaminergici sugli interneuroni colinergici, presenti in queste complesse interconnessioni, determinando un'alterazione dell'equilibrio tra DA e Acetilcolina, con conseguente iperattività colinergica responsabile del tremore a riposo, caratteristico del parkinsoniano (Pisani A. *et al.*, 2003).

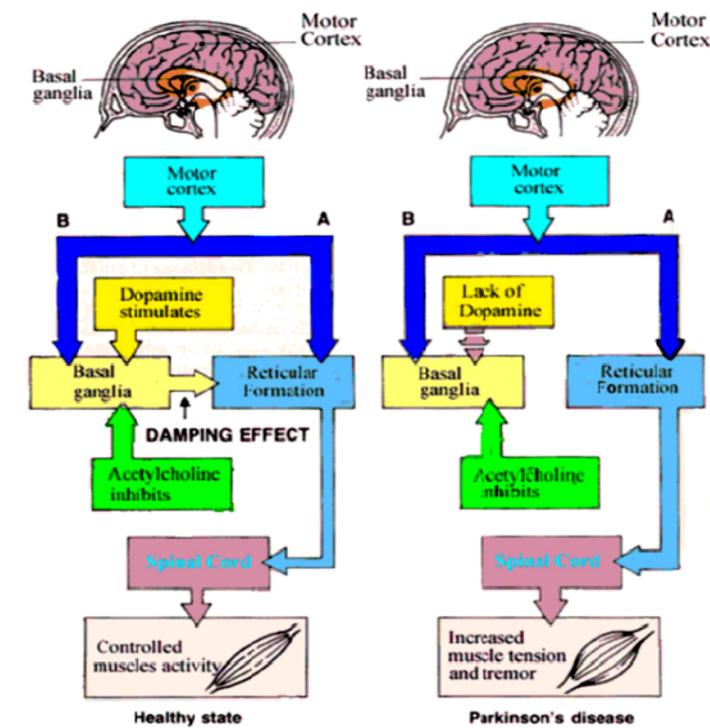


Figura 2. Confronto del controllo recettoriale sull'attività motoria in soggetti allo stato normale e colpiti da Parkinson

La degenerazione neuronale, a carattere cronico e progressivo, diventa responsabile dei segni clinici della PD, comprendenti tremore a riposo, acinesia, bradicinesia, rigidità e perdita di riflessi posturali (Goole J. , Amighi K., 2009). Tuttavia, circa il 70% dei terminali nervosi striatali e fino al 60% dei neuroni dopaminergici nella SN vengono persi prima che i sintomi clinici della PD diventino evidenti (Davie C.A., 2008) il processo patologico, necessita di anni per raggiungere la sua estensione nel sistema nervoso umano e, durante il suo corso, le lesioni intraneuronali aumentano costantemente in gravità. Come mostrato nella Tabella 1, con l'avanzamento della patologia vengono coinvolte le aree del mesencefalo e prosencefalo basale. Infine, i cambiamenti patologici compaiono nella neocorteccia (Heiko B. *et al.*, 2004).

-
1. Medulla (dorsal motor nucleus of the vagus and contiguous medullary reticular formation); olfactory bulb and anterior olfactory nucleus; autonomic nervous system
 2. Ascends to pons, including reticular nuclei, raphe, and locus ceruleus
 3. Reaches midbrain (substantia nigra)
 4. Ascends further to more severely affect basal forebrain and involves the entorhinal cortex (anteromedial temporal cortex)
 5. Involves association and prefrontal cortex
 6. Diffusely affects neocortex
-

Tabella 1 . I sei stadi della PD secondo Braak

L'ultimo stadio della PD è caratterizzato da una anomala aggregazione di una proteina sinaptica fibrosa, chiamata α -sinucleina. Quest'ultima è il principale componente strutturale dei corpi di Lewy (Figura 3), ovvero delle inclusioni intracitoplasmatiche che si sviluppano nelle cellule nervose e soppiantano altre componenti cellulari, rendendo i neuroni particolarmente sensibili allo stress ossidativo e, quindi, alla degenerazione (Chaturvedi R. K., Beal M., 2013; Olanow C.W., Tatton W.G., 1999).

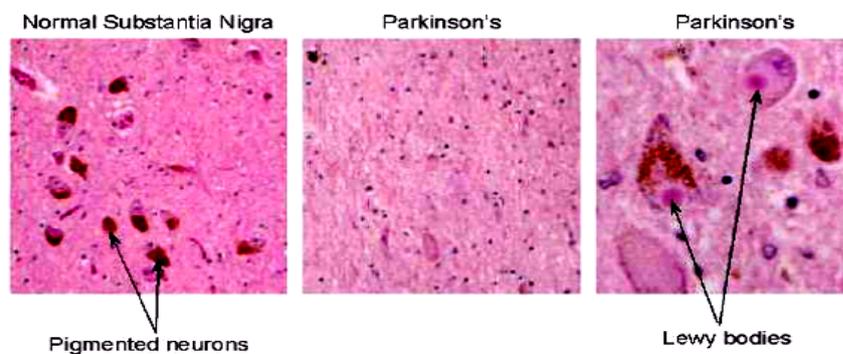


Figura 3. Corpi di Lewy nella sostanza nera di un paziente affetto daPD a confronto con la sostanza nera di un soggetto normale

Recenti studi hanno sollevato l'ipotesi che alla base dell'eziopatogenesi della PD ci sia una disfunzione dell'attività mitocondriale. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), a causa della disfunzione mitocondriale, portano alla

modificazione ossidativa dell' α -sinucleina, innescando un processo di fibrillazione (Koo H. J. *et al.*, 2013).

L'evidenza del coinvolgimento specifico della disfunzione mitocondriale nella patogenesi della PD è stata osservata a seguito di infusioni accidentali della tossina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahydrodropyridine (MPTP); quest'ultima infatti inibisce selettivamente il complesso mitocondriale-I nella catena di trasporto degli elettroni, inducendo parkinsonismo (Koo H. J. *et al.*, 2013).

Anche le mutazioni genetiche a carico della α -sinucleina possono causare un ridotto controllo del traffico vescicolare e la formazione di pori nella vescicola causando, quindi, la deplezione di DA dalla vescicola o l'interazione con la DA citoplasmatica per formare specie tossiche (Alter S.P. *et al.*, 2013).

Sebbene sia principalmente un disturbo del movimento, la PD è accompagnata anche da una varietà di sintomi non motori, tra cui: problemi neuropsichiatrici (ansia, depressione), disfunzioni cognitive (disturbi del linguaggio e demenza), disturbi del sonno, problemi gastrointestinali, sessuali e cardiovascolari (ipotensione ortostatica). Tali disfunzioni possono comparire prima dei disturbi motori o negli stadi avanzati della malattia, e spesso possono limitare il trattamento farmacologico, con conseguente aumento della disabilità e scarsa qualità della vita per i pazienti (Khedr E.M. *et al.*, 2013).

2.2. Trattamento farmacologico della PD: i farmaci impiegati

Ad oggi, non esiste un trattamento risolutivo in grado di migliorare la degenerazione e arrestare, quindi, il decorso della malattia. Le strategie terapeutiche impiegate hanno efficacia sintomatica e mirano al controllo dei sintomi migliorando, nella maggior parte dei casi, la qualità di vita dei pazienti senza però modificare il decorso della patologia (Stocchi F., 2008).

Poiché i sintomi relativi alla PD sono dovuti principalmente ad una drastica diminuzione della DA, la somministrazione di sostanze capaci di incrementare tale neurotrasmettitore a livello centrale rappresenta la miglior strategia terapeutica per alleviare la disabilità motoria parkinsoniana.

Nell'ultimo ventennio sono stati attuati diversi trattamenti farmacologici per il controllo sintomatico della PD. (Tabella 2)

PRINCIPIO ATTIVO	MECCANISMO D'AZIONE	INDICAZIONI TERAPEUTICHE
L-DOPA (co-somministrata con inibitori della dopa-decarbossilasi)	Precursore della dopamina (ripristina le concentrazioni intracerebrali di dopamina)	Singolo trattamento con maggiore efficacia
BROMOCRIPTINA, PERGOLIDE, APOMORFINA	Attivanti dei recettori D ₁ e D ₂	Controllo delle fluttuazioni motorie
CABERGOLINA, LISURIDE, PRAMIPEXOLO, ROPINIROLO	Agonisti del recettore D ₂	Prevenzione e controllo delle fluttuazioni motorie
SELEGILINA	Inibitore delle B-MAO	Nello stadio iniziale, con potenziali effetti neuro protettivi e nel controllo delle fluttuazioni motorie
TOLCAPONE, ENTACAPONE	Inibitori COMT prolungano l'emivita della levodopa	Controllo delle fluttuazioni motorie
TRISILFENIDILE, ORFENADRINA, BIPERIDINA	Blocco dei recettori colinergici muscarinici	Nello stadio iniziale per il controllo del tremore
AMANTIDINA	Antagonista NMDA	Discinesia provocata dalla somministrazione di L_DOPA

Tabella 2. Farmaci che più frequentemente vengono utilizzati nel trattamento della PD e relativi meccanismi d'azione.

2.3. Farmaci più impiegati: potenzialità e limiti

2.3.1. L-DOPA

Anche dopo mezzo secolo dalla sua introduzione, il farmaco di prima scelta per il miglioramento dei sintomi motori della PD è la Levodopa (L-DOPA) (Müller T. *et al.*, 2013).

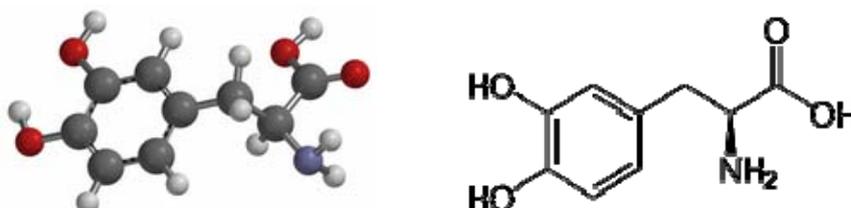


Figura 4. Levodopa (L-3,4-diidrossi-fenilalanina): struttura chimica

La L-DOPA, il precursore endogeno della DA e delle catecolamine in generale, è un aminoacido neutro prodotto dall'azione sulla L-tirosina della tirosina idrossilasi, enzima specifico che si trova soltanto nei gangli simpatici del cervello e nelle surrenali (Stocchi F., 2008).

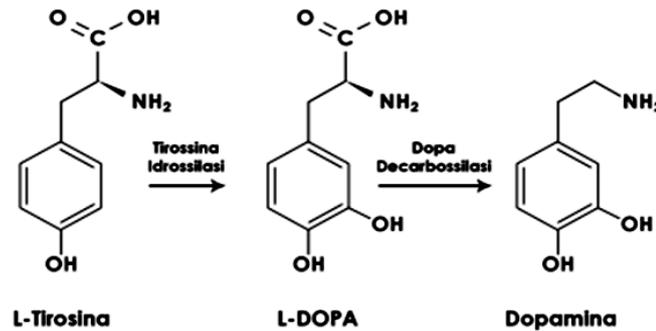


Figura 5. Sintesi della Dopamina a partire dall'aminoacido L-tirosina

La L-DOPA ha rivoluzionato la terapia sintomatica della PD, riducendo l'entità dei disturbi motori, migliorando l'autonomia e la qualità di vita dei pazienti ed incrementandone l'aspettativa di vita (Rascol O. *et al.*, 2002). Nessun altro trattamento "anti-parkinson" è in grado d'indurre analoghi benefici e la L-DOPA è, tuttora, considerato il "gold standard" della terapia farmacologia (Davie C.A., 2008). La L-DOPA, somministrata come tale si comporta, quindi, da profarmaco in grado di attraversare la BBB, sfruttando i carriers degli aminoacidi ivi presenti, e di raggiungere il SNC. In tale distretto, viene convertita in DA, ad opera delle L-decarbossilasi degli aminoacidi aromatici (AADC), ed immagazzinata nelle vescicole sinaptiche, dalle quali viene rilasciata progressivamente sui recettori postsinaptici (Contin M., Martinelli P., 2010).

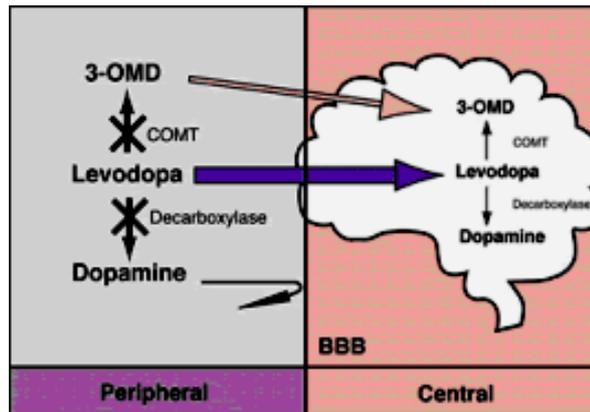


Figura 6. Meccanismo d'azione della Levodopa

In questo modo, la L-DOPA supplementa i livelli di DA striatale e riattiva la trasmissione nigrostriatale soppressa (Djaldeiti R., Melamed E., 2001).

La L-DOPA, convenzionalmente somministrata per via orale, viene rapidamente assorbita a livello dell'intestino tenue e raggiunge una concentrazione plasmatica massima fra 0,5 e 2 ore dalla sua assunzione. L'emivita plasmatica è di circa 1-3 ore e la velocità di assorbimento è fortemente influenzata dalla velocità di svuotamento gastrico. La biodisponibilità, di circa il 30% della dose somministrata, può essere ritardata dal pH gastrico o intestinale oltre che dalla presenza di cibo. Subisce un intenso first pass effect: più del 95% della L-DOPA somministrata per via orale viene decarbossilata a DA ad opera delle decarbossilasi periferiche e in piccole percentuali anche in acido 3,4 idrossifenilacetico (DOPAC) e acido omovanillico (HVA) a livello della mucosa intestinale, del fegato e dei reni. È stato stimato che della dose totale somministrata solo l'1% giunge al cervello come farmaco immodificato (Contin M., Martinelli P., 2010). Gli effetti avversi a livello periferico sono: vomito, nausea, anoressia, tachicardia, extrasistoli, ipotensione e midriasi, mentre la saliva e l'urina si colorano di brunastro, a causa del pigmento melanina prodotto dall'ossidazione delle catecolamine (Pahwa R, Lyons K.E., 2011). Per prevenire gli effetti collaterali correlati al metabolismo periferico, aumentare la disponibilità centrale della L-DOPA e ridurre la dose giornaliera di farmaco da somministrare (Annunziato L., Di Renzo G., 2010), nella pratica clinica il farmaco viene associato ad inibitori dell'enzima dopa-decarbossilasi: Carbidopa (Sinemet[®])

oppure alla Benserazide (Madopar[®]), in rapporto 1:4 con la L-DOPA. In commercio è stato, inoltre, introdotto Stalevo[®], un'associazione di 3 principi attivi: Levodopa, Carbidopa ed Entacapone, inibitore dell'enzima Catecol-O-metiltransferasi (COMT), il principale enzima responsabile del metabolismo della L-DOPA. Tale associazione permette di ottenere concentrazioni plasmatiche di farmaco stabili, una maggiore biodisponibilità e un incremento dell'emivita. Viene così favorita una stimolazione più costante dei recettori dopaminergici, una risposta clinica modulata e un prolungamento della durata dell'effetto esercitato dalle singole dosi di farmaco (Solla P. *et al.*, 2010).

Nelle prime fasi della terapia con L-DOPA il paziente mostra una soddisfacente risposta terapeutica: si denota un miglioramento dei segni e dei sintomi parkinsoniani. Tale periodo dura circa 4-5 anni e viene definito “*levodopa honeymoon phase*” (Djaldetti R., Melamed E., 2001).

Dopo questo periodo iniziale, in circa l' 80-85% dei pazienti compare una sintomatologia complessa, definita “fase scompensata della malattia” o “sindrome da trattamento cronico”, che implica la comparsa di diversi problemi motori e non (Koprich J.B. *et al.*, 2013). Il trattamento cronico con L-DOPA è, infatti, associato con lo sviluppo di complicanze motorie, le più comuni sono le fluttuazioni motorie e le discinesie.

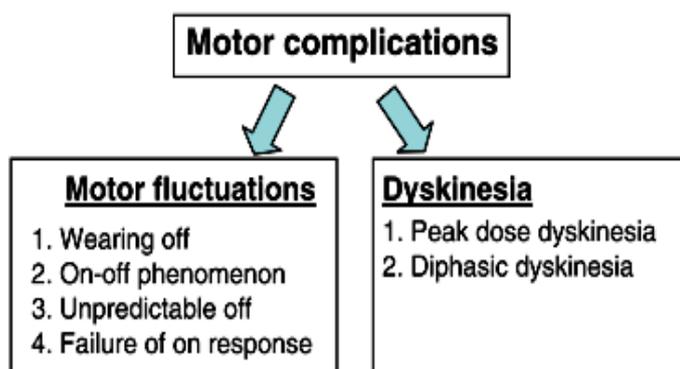


Figura 7. Complicazioni motorie indotte da Levodopa

L'origine delle complicazioni motorie è sicuramente correlata alla perdita del meccanismo di autoregolazione a livello delle sinapsi dopaminergiche. Man mano che il processo neurodegenerativo progredisce, l'attività dopaminergica diviene sempre più dipendente dall'apporto esogeno della L-DOPA e pertanto i fattori farmacocinetici che modificano la disponibilità centrale di L-DOPA-DA acquisiscono un'importanza singolare. Si genera una stimolazione intermittente dei recettori della DA che porta ad ulteriori irregolarità nel circuito dei gangli della base (Maranis S. et al., 2011) in cui una stimolazione non fisiologica dei recettori dopaminergici striatali, destabilizza un sistema già instabile (Chaturvedi R. K., Beal M., 2013).

Più in dettaglio, il *fenomeno on-off* consiste nell'alternanza tra periodi in cui i pazienti rispondono alla L-DOPA (periodi "on"), e periodi in cui il farmaco non controlla in modo soddisfacente la disabilità motoria (periodi "off"). Si può definire il fenomeno "on-off" come una fluttuazione dell'attività della L-DOPA. Questa può essere dovuta a diversi fattori: variazione dell'assorbimento intestinale di L-DOPA, bassa emivita del farmaco (1-2 ore), fluttuazioni plasmatiche, desensitizzazione del recettore dopaminergico per prolungata esposizione al farmaco stesso (Maranis S. et al., 2011).

Il *wearing-off* è generalmente il fenomeno che compare più precocemente e consiste in un calo della performance motoria, con ricomparsa dei sintomi parkinsoniani, che si risolve dopo la successiva somministrazione del farmaco (Stocchi F. et al. 2005). Tale fenomeno è una conseguenza diretta della stimolazione pulsatile e non fisiologica dei recettori dopaminergici e della riduzione della finestra terapeutica. Esso indica la minor durata dell'effetto farmacologico (meno di 1 ora vs le 4 ore nelle fasi iniziali della terapia; Figura 8) (Maranis S. et al., 2011).

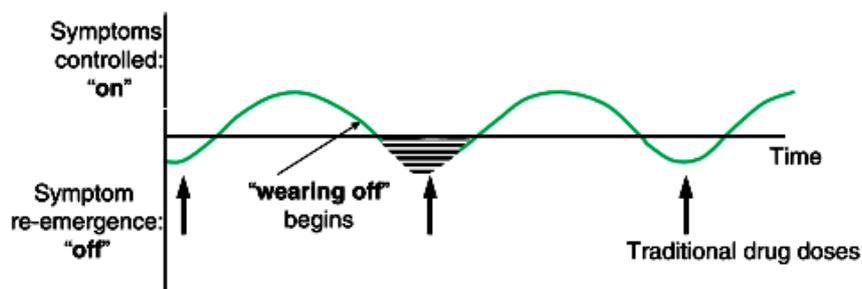


Figura 8. Rappresentazione schematica del fenomeno “wearing off”

Tuttavia la complicità motoria più comune del trattamento dopaminergico a lungo termine è la comparsa di movimenti involontari, noti con il termine discinesie, dipendenti dalle fluttuazioni della concentrazione plasmatica di L-DOPA (Koprich J.B. *et al.*, 2013).

Da quanto riportato, le complicanze motorie appaiono non solo come riflesso delle proprietà intrinseche della L-DOPA, quanto correlate alla modalità della sua somministrazione. Infatti, la risposta clinica è influenzata dal trasporto della L-DOPA attraverso la parete intestinale, mediante un meccanismo carrier facilitato saturabile, che media anche l'assorbimento di aminoacidi. Pertanto, l'assorbimento del farmaco può essere ritardato o diminuito dalla concomitante assunzione di pasti proteici. Esso, inoltre, è influenzato dal ritardato svuotamento gastrico: la L-DOPA non assorbita viene attaccata dalle decarbossilasi gastriche che la trasformano in DA (Maranis S. *et al.*, 2011). Di conseguenza, la quantità di L-DOPA che arriva all'intestino tenue è sensibilmente ridotta e la dose assorbita diventa insufficiente a raggiungere livelli terapeutici adeguati e costanti. A questa problematica, si aggiunge la sua elevata acidità e scarsa idrosolubilità, motivo per il quale la somministrazione di questo farmaco non è consigliata per un trattamento cronico parenterale (Di Stefano A. *et al.*, 2008).

Al fine di migliorare la terapia della PD, sono state proposte diverse strategie terapeutiche. Ad esempio, la somministrazione di principi attivi di diversa natura in monoterapia, o in associazione con la L-DOPA. Tra questi gli inibitori delle monoamino ossidasi di tipo B (MAO-B) capaci di inibire le MAO-B, enzimi che metabolizzano la serotonina e le catecolamine (Dalvi A., 2013); o ancora farmaci

anticolinergici che antagonizzano i recettori muscarinici a livello degli interneuroni striatali, ripristinando il bilancio tra la neurotrasmissione dopaminergica e quella colinergica (Schapira A.H.V. et al., 2006).

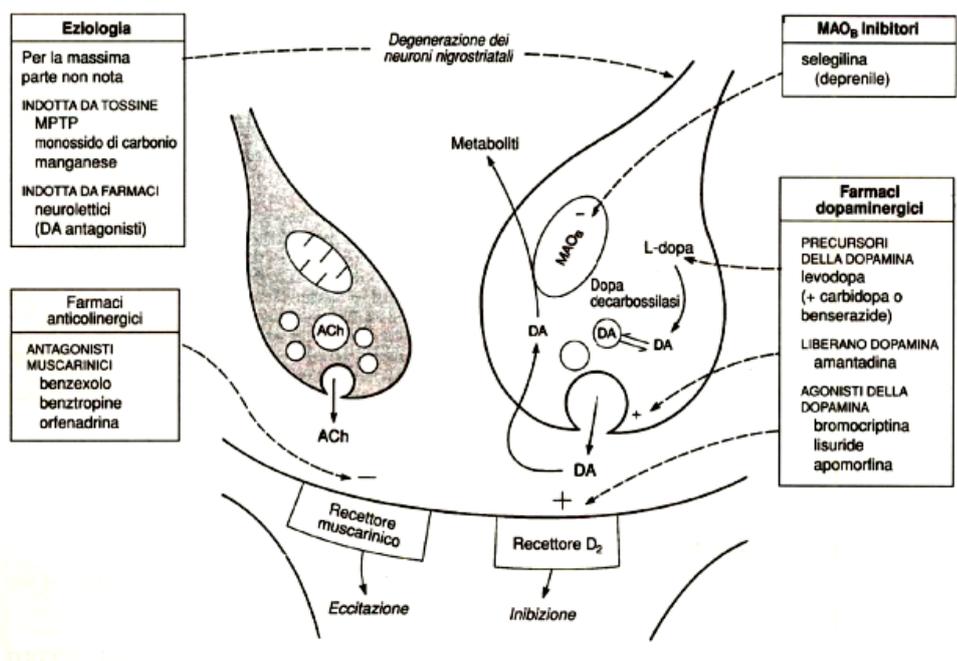


Figura 9 . Farmaci utilizzati nel Parkinson e loro meccanismo.

Tuttavia questi farmaci mostrano una inadeguata efficacia nelle disabilità motorie su parkinsoniani, specie negli stadi avanzati della malattia.

Diversi studi hanno evidenziato come le complicazioni legate al trattamento con la L-DOPA possano essere limitate riducendo i picchi e le fluttuazioni plasmatiche del principio attivo, garantendo una stimolazione dopaminergica meno pulsatile e più continua nel tempo (Fahn, 2005). Nel tentativo di migliorare l'assorbimento, la biodisponibilità e il mantenimento delle concentrazioni plasmatiche costanti di L-DOPA, sono state sviluppate forme di dosaggio non convenzionali a rilascio controllato (Ngwuluka N. et al., 2010). Le due formulazioni Sinemet Cr® e Madopar HBS® sono state progettate per garantire il rilascio controllato rispettivamente dell'associazione L-DOPA/carbidopa e L-DOPA/benserazide. L'efficacia di queste formulazioni è stata confrontata con

quella della formulazione convenzionale sia in pazienti stabili che in pazienti con fluttuazioni motorie: nonostante riducano la percentuale dei periodi “off”, queste formulazioni orali a rilascio controllato presentano un tempo di comparsa dell’effetto più lungo, richiedono dosi di attacco più elevate e non permettono di posticipare o ridurre le complicazioni legate al trattamento a lungo termine con la L-DOPA .

Di recente introduzione è il trattamento con Duodopa, una nuova formulazione di L-DOPA per infusione intestinale continua, innovativa per due motivi principali:

1. permette di erogare il farmaco in modo continuo, direttamente a livello intestinale attraverso una gastrostomia percutanea;
2. la nuova formulazione consiste in una soluzione altamente viscosa, contenente una elevata quantità del principio attivo in un piccolo volume (Nyholm D, et al. 2005).

L’infusione continua intra-duodenale è la via di somministrazione usata anche da un nuovo drug delivery system di L-DOPA sotto forma di gel intestinale (LCIG) di carbossimetilcellulosa-L-DOPA associata all’inibitore Carbidopa per la gestione delle complicanze motorie (Müller T. et al.,2013).

2.3.2 Esteri della L-DOPA

Negli ultimi anni, l'attenzione dei ricercatori si è ampiamente focalizzata verso la realizzazione di profarmaci esterei della L-DOPA, prodotti per esterificazione del gruppo carbossilico del farmaco. Questi farmaci mostrano un profilo farmacocinetico migliore della L-DOPA e proprietà chimico-fisiche più adatte all'attraversamento della BBB. (Goole J., Amighi K., 2009). In particolare, gli esteri della L-DOPA mostrano elevata solubilità in acqua, che si traduce in una completa liberazione dalle forme farmaceutiche, maggiore lipofilia, che si traduce in efficiente attraversamento delle membrane biologiche (ad esempio intestinali e mucose nasali) (Kao H.D. *et al.*, 2009; Itoh S., Oo C., 2010) oltre, il gruppo estereo viene rapidamente convertito in vivo in L-DOPA dalle esterasi non specifiche (Goole J, Amighi K., 2009; Bettini R. *et al.*, 2002). L’alta solubilità

assicura un assorbimento più rapido e costante, con una risposta farmacodinamica più regolare rispetto alle formulazioni di L-DOPA

La lipofilia, raggiunta in seguito alla trasformazione del gruppo carbossilico in estere, promuove la diffusione passiva, migliorando l'assorbimento. Gli esteri esercitano una risposta farmacologica simile a quella del farmaco parenterale in quanto il gruppo estereo viene rapidamente idrolizzato dalle esterasi periferiche (Goole J., Amighi K., 2009).

Ad oggi, l'unico derivato estereo presente in commercio è la L-DOPA Metil Estere (LDME) sotto il nome SIRIO[®] compresse effervescenti.

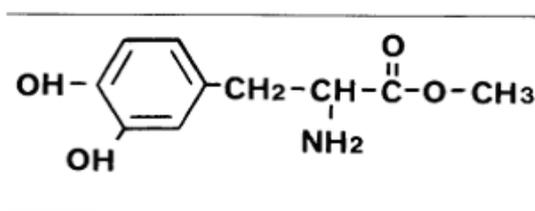


Figura 10. Struttura chimica della LDME

In particolare, le caratteristiche di elevata solubilità e di rapido transito nel tratto gastrointestinale di LDME, consentono di evitare degradazioni del farmaco, di ottenere un assorbimento più rapido di L-DOPA e, in ultima analisi, di raggiungere adeguati e più prevedibili livelli plasmatici (Stocchi F. et al., 2010). La LDME somministrata sotto forma di compresse effervescenti presenta una solubilità in acqua circa 250 volte maggiore rispetto alle compresse convenzionali di L-DOPA; questo garantisce un più veloce e un più costante assorbimento oltre ad una più rapida comparsa d'azione (Hickey P., Stacy M., 2011). La LDME, garantendo un rapido assorbimento duodenale, è stata proposta come terapia di protezione dal fenomeno “off” pomeridiano, in particolare, in presenza di entacapone, si potrebbero ottimizzare i periodi critici della giornata (Zangaglia R. et al., 2010). La combinazione con Carbidopa, si è dimostrata efficace nel migliorare la performance motoria giornaliera e la qualità di vita in pazienti

parkinsoniani con *delayed-on* associato al fenomeno del *wearing-off* (Bosco D. et al., 2011). Rispetto alla formulazione standard con L-DOPA, tale associazione terapeutica ha, infatti, evidenziato un beneficio terapeutico sulle fluttuazioni motorie: si assiste ad una riduzione del periodo totale giornaliero di blocco motorio, una riduzione del periodo di latenza alla fase “on” e un prolungamento della durata dell’effetto clinico (Stocchi F. et al., 2010). Negli ultimi anni è stato studiato un nuovo *delivery system* versatile per la somministrazione orale di LDME e carbidopa, sotto forma di compressa matriciale a tre strati. Questo sistema matriciale presenta cinetiche di rilascio del farmaco, dipendenti dalla composizione degli strati e dalla loro posizione relativa nella compressa (Bettini R. et al., 2002). Altra recente formulazione ha previsto l’associazione di LDME/benserazide sotto forma di nanoparticelle: studi clinici preliminari nei ratti hanno evidenziato una riduzione delle discinesie (Yang X. et al., 2012).

Per i pazienti che manifestano disfagia, la somministrazione di L-DOPA per via orale è insoddisfacente, pertanto è stata proposta la formulazione di LDME come polvere nasale. In tal modo si ottengono tutti i vantaggi sia dell’utilizzo della via nasale come sito di somministrazione alternativo sia delle caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche della LDME. Tale *delivery system* permette di ottenere un più rapido *intake* del farmaco e garantisce livelli plasmatici costanti (Chun I.K. et al., 2011).

2.3.3. Ropinirolo

Per prevenire le complicanze associate alla somministrazione di L-DOPA, specie nei pazienti di giovane età, si può anche iniziare la terapia con un dopamino-agonista ed associare i due farmaci solo nelle fasi più avanzate della malattia.

Sebbene gli agonisti dopaminergici abbiano un’efficacia ridotta rispetto alla L-DOPA possiedono, però, diversi vantaggi. La prerogativa di questi farmaci è che essi non richiedono la conversione metabolica in un composto attivo per esercitare il loro effetto farmacologico, ma stimolano direttamente i recettori dopaminergici. Per questo motivo, l’efficacia degli agonisti della DA è indipendente dalla

degenerazione dei neuroni dopaminergici. Entrambe le classi hanno come bersaglio principale i recettori per la dopamina della classe D₂ e D₃.

Recenti studi in *vitro* suggeriscono che la maggior parte dei dopaminoagonisti possiedono un'attività neuroprotettiva intrinseca, del tutto indipendente dall'attività dopaminomimetica. Tuttavia questo effetto neuroprotettivo non è stato ancora confermato (Annunziato L., Di Renzo G. Trattato di Farmacologia 2010).

Capostipite dei dopaminoagonisti è la Bromocriptina, (Parlodel) entrata in commercio circa 30 anni fa, seguita da Lisuride (Dopergin), Pergolide (Nopar), Diidroergocriptina (Daverium), Apomorfina (Apofin), Cabergolina (Cabaser), e dai nuovi preparati non ergolinici quali, Pramipexolo (Mirapexin), Rotigotina (Neupro) e Ropinirolo (Requip).

Bromocriptina, Lisuride e Pergolide si legano con elevata affinità ai recettori della dopamina D₂, ma mostrano anche una relativa affinità verso i recettori D₁, adrenergici e serotoninergici. Di contro, gli agenti più recenti (Ropinirolo e Pramipexolo) sono agonisti specifici, in quanto si legano ai recettori D₂ e D₃ con elevata affinità.

Tutti i dopamino-agonisti somministrabili per via orale, ed in particolare Cabergolina, Pergolide, Pramipexolo e Ropinirolo, sono caratterizzati da emivita plasmatica più lunga rispetto alla L-DOPA (Annunziato L., Di Renzo G. Trattato di Farmacologia 2010).

E' dimostrato da tempo che l'uso precoce di agonisti della DA nel trattamento della PD porta ad una minore incidenza di discinesia rispetto al trattamento con L-DOPA, soprattutto nei primi anni della terapia. Un recente lavoro pubblicato dalla Cochrane Database₂ dopo aver esaminato più di 29 diversi studi e più di 5000 pazienti, ha dimostrato che gli agonisti dopaminergici riducono l'incidenza di complicanze motorie se usati nelle prime fasi del trattamento della PD, anche se, rispetto al trattamento con L-DOPA, il controllo dei sintomi risulta meno efficace e gli effetti collaterali possono essere incrementati (Gershanika O., Jenner P., 2011). Inoltre, la co-somministrazione di L-DOPA con agonisti della DA, quali Pergolide, Ropinirolo, Pramipexolo o Cabergolina, in pazienti con complicanze motorie, è in grado di ridurre il tempo di "off" di circa 1,1-1,5 ore. Queste

prerogative permettono di ridurre del 30% la dose di L-DOPA da somministrare (Stocchi F., 2011).

In particolare, il Ropinirolo (ROP) (Figura 11) è un farmaco efficace nel trattamento della PD, sia in monoterapia sia in combinazione con L-DOPA. È stato recentemente suggerito che il ROP non solo ha azione dopaminosimile, ma mostra anche un potenziale effetto neuroprotettivo contro il perossido di idrogeno, neutralizza i radicali liberi indotti dalla 6-idrossi-DA e protegge le cellule dagli effetti lesivi indotti dalla MPTP (Park G. *et al.*, 2013).

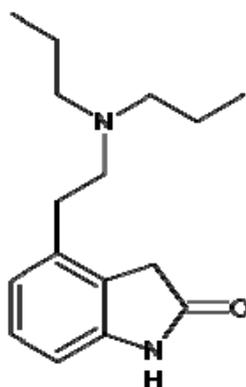


Figura 11. struttura chimica del Ropinirolo

ROP viene somministrato per via orale in compresse convenzionali a rilascio immediato da 2 mg / 4 mg / 8 mg di farmaco; esso viene rapidamente e quasi completamente assorbito, raggiungendo una concentrazione massima plasmatica tra 1 e 2 ore dalla somministrazione; la biodisponibilità si aggira intorno al 55% ed è caratterizzata da una emivita di 5-6 ore.

Dal 2008 è disponibile una nuova formulazione di Ropinirolo in compresse rivestite (con OPADRY), a rilascio protratto (ROP RP), contenenti 8 mg di farmaco. Il Ropinirolo a rilascio modificato (RP) è stato sviluppato con l'obiettivo di assicurare un'efficacia terapeutica che copra tutto l'arco della giornata attraverso una somministrazione singola, mantenendo lo stesso dosaggio quotidiano del farmaco.

In uno studio randomizzato in doppio cieco EASE-PD Monotherapy, una somministrazione giornaliera di 8 mg di Ropinirolo RP è stata comparata con 3 somministrazioni/die da 2,5 mg di Ropinirolo a rilascio immediato ad intervalli di 8 ore. Dallo studio è emerso che i due tipi di somministrazione, a dosaggio pressoché equivalente, presentano un'efficacia clinica sovrapponibile ed un elevato grado di tollerabilità senza un evidente aumento di effetti collaterali (Tompson D.J., Vearer D., 2007).

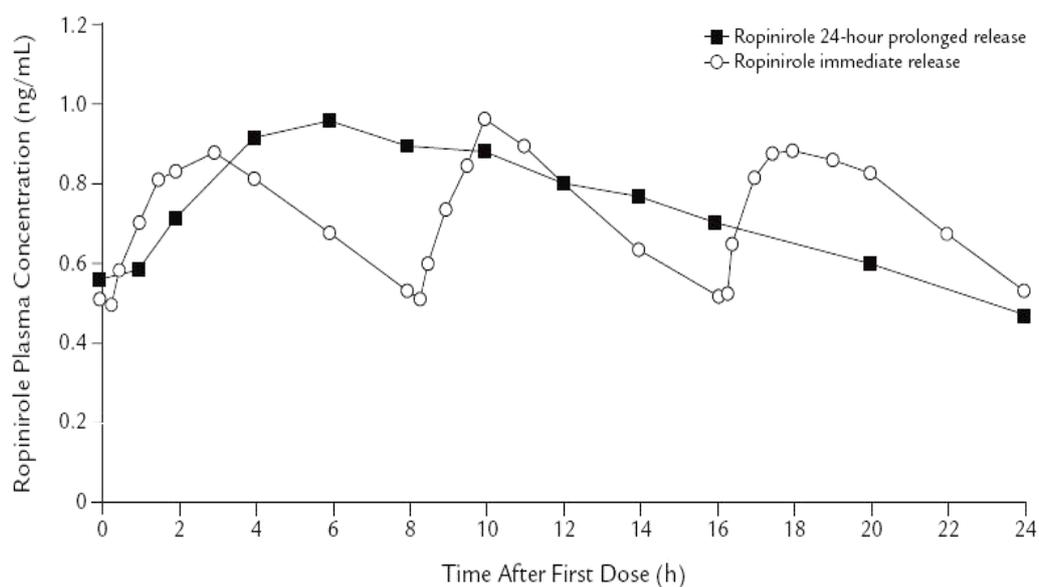


Figura 12. Confronto fra le concentrazioni plasmatiche allo steady state delle formulazioni di tipo IR e PR di Ropinirolo, dopo somministrazione della prima dose

A differenza della forma di dosaggio a rilascio immediato, la formulazione a rilascio prolungato, con dose giornaliera comparabile, ha presentato diversi vantaggi, come, maggiore tollerabilità da parte del paziente, nonché una stimolazione dopaminergica costante durante le ore diurne e una aumentata compliance.

Inoltre, le fluttuazioni delle concentrazioni plasmatiche risultano meno frequenti ed in particolare il rapporto fra la concentrazione massima raggiunta e la concentrazione minima efficace (C_{max}/C_{min}) appare inferiore: un valore di 1.8 per

la formulazione a rilascio prolungato di ROP rispetto al valore di circa 5 per il ROP a rilascio immediato (Jost W.H., *et al.*, 2008).

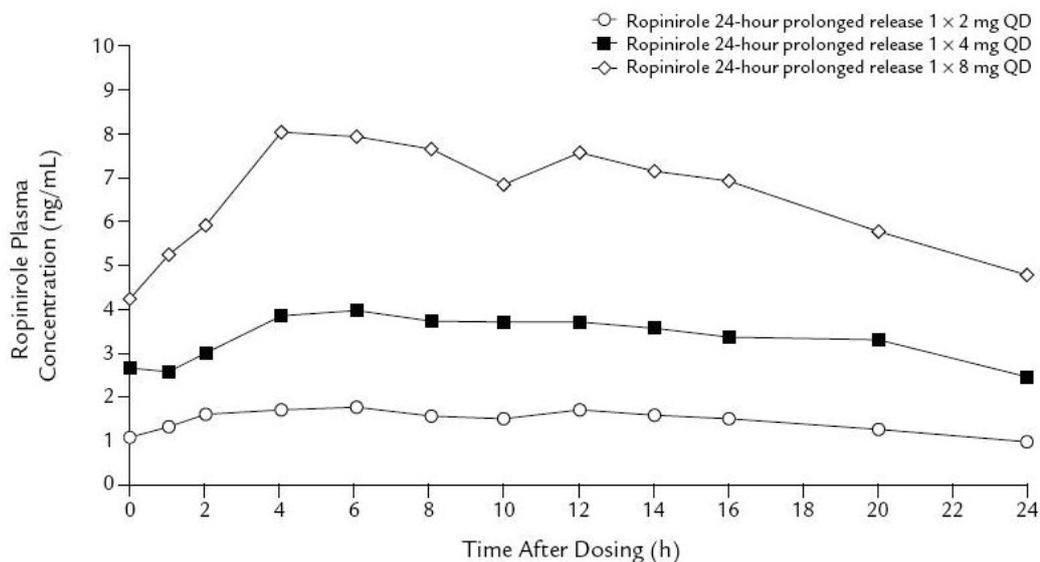


Figura 13. La formulazione PR permette un rilascio continuo di Ropinirolo per 24h; il grafico mostra che l'esposizione (AUC-Cmax) è del tutto sovrapponibile per il Ropinirolo PR assunto una volta al giorno ed il Ropinirolo IR assunto tre volte al giorno

In uno studio EASE-PD Adjunct è stato osservato l'effetto del ROP nei pazienti con PD in stadio avanzato, che mostravano fluttuazioni motorie e discinesie, rispetto al placebo. Da questo è emerso un significativo aumento del tempo in fase "on" (pari a circa 2 ore) senza comparsa di significativi effetti discinetici. Il trattamento ha, inoltre, evidenziato un impatto positivo sulla qualità del sonno e sui sintomi depressivi (Hersh B.P. *et al.*, 2010).

ROP a rilascio prolungato rappresenta, in ultima analisi, un ulteriore e significativo passo avanti verso il perfezionamento delle terapie anti-Parkinson, che vedono nei farmaci dopaminoagonisti e nella L-DOPA i presidi farmacologici maggiormente impiegati. Infatti, nei pazienti affetti da PD che non rispondono in maniera ottimale alla terapia con L-DOPA/Carbidopa, la somministrazione giornaliera di ROP PR modera il fenomeno del "wearing-off" nel tempo, riduce significativamente la comparsa delle discinesie e fornisce significativi

miglioramenti dell'umore e dei parametri basali della qualità di vita (Stocchi F. *et al.*, 2009).

2.4. Vie di somministrazione alternative: la mucosa buccale

L'uso di vie di somministrazione alternative a quella orale può contribuire al mantenimento di livelli plasmatici costanti dei farmaci. In particolare, nella terapia della PD, l'uso di tali vie potrebbe consentire una costante stimolazione dei neuroni nigrostriatali per lunghi periodi di tempo.

Una via di somministrazione dei farmaci che di recente ha attratto l'interesse degli studiosi e che può essere considerata come alternativa alle vie di somministrazione convenzionali è quella attraverso la mucosa della cavità orale e specificatamente attraverso la mucosa buccale.

Tale via trova applicazione sia per le terapie loco-regionali che per quelle sistemiche (Dhiman M.K. *et al.*, 2009).

La mucosa orale ha una superficie totale di circa 200 cm² e consiste di tre strati anatomico-funzionali:

- uno strato esterno, costituito da un epitelio stratificato squamoso,
- uno strato intermedio poco vascolarizzato di origine mesodermica connesso con una matrice extracellulare di materiale proteico fibroso di circa 1,2 µm (membrana basale o lamina propria),
- uno strato interno sottomucoso formato da tessuto connettivo lasso (Campisi G. *et al.*, 2010), (Salamat-Miller N. *et al.*, 2005).

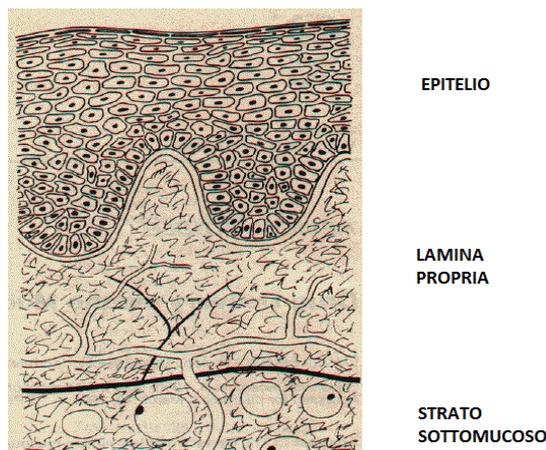


Figura 14. Struttura della mucosa della cavità orale

L'epitelio protegge i tessuti e gli organi sottostanti; la lamina propria esercita funzioni trofiche nei confronti dello strato epiteliale, lo strato sottomucoso contiene vasi sanguigni, ramificazioni nervose e ghiandole intramurali (Squier C., Brogden K. A., 2011).

In base alle diverse regioni della cavità orale, le caratteristiche della mucosa variano in termini di composizione e spessore dell'epitelio.

Le gengive ed il palato duro, in quanto zone soggette a stress meccanici, presentano un epitelio cheratinizzato, simile all'epidermide, avente funzione "barriera" (Shojaei A.H., 1998). Di contro, gli epiteli del palato molle, delle regioni sublinguale e buccale non sono cheratinizzati e mostrano una maggiore permeabilità all'acqua rispetto all'epitelio cheratinizzato (Salamat-Miller N. *et al.*, 2005).

L'apporto sanguigno al tessuto della cavità orale deriva, principalmente, dall'arteria *facciale*, ramificazione della carotide esterna.

A livello della cavità orale, possiamo individuare tre diversi siti di assorbimento dei farmaci:

- la mucosa sublinguale localizzata sul pavimento della bocca,
- le membrane gengivale e palatale,
- la mucosa buccale.

La mucosa sublinguale è permeabile e consente un assorbimento immediato e una buona biodisponibilità dei farmaci; inoltre, essa è facilmente accessibile e la

somministrazione per questa via è ben accettata da parte dei pazienti (Shojaei A.H., 1998).

Le mucose, gengivale e palatale, si prestano abbastanza bene per applicazioni locali, quali il trattamento di mal di denti, affezioni periodontali, infezioni batteriche e fungine e stomatiti, (Sudhakar Y. *et al.*, 2006).

La differenza di comportamento delle varie zone della cavità orale, nei confronti dell'assorbimento dei farmaci, è correlata oltre che alla diversa struttura (mucosa cheratinizzata o non cheratinizzata), anche alla diversa composizione tissutale.

In particolare, i tessuti del palato cheratinizzato e la mucosa gengivale contengono un'elevata quantità di acilceramidi e colesterolo, di contro, le mucose sublinguale e buccale (non cheratinizzate) hanno un alto contenuto di fosfolipidi, esteri del colesterolo e glicosilceramidi (Squier C.A. *et al.*, 1986) (Squier C., Brogden K. A., 2011). Questa diversa composizione comporta evidenti variazioni delle strutture contenute nei domini idrofili e lipofili della membrana.

Per somministrazione buccale s'intende, in particolare, l'applicazione di un farmaco sull'epitelio che riveste la parte interna della guancia (Rossi *et al.*, 2005 *car*m). Questa mucosa, paragonata alle altre, è più tollerante nei confronti di potenziali allergeni ed ha una minore tendenza a danni irreversibili; inoltre è ben vascolarizzata, relativamente immobile e presenta un'esigua attività enzimatica. (Scholz O.A. *et al.*, 2008)

La mucosa buccale è più spessa e meno permeabile della sublinguale e inoltre, anche a causa del minore apporto sanguigno, generalmente non permette un rapido assorbimento dei farmaci. Essa, si presta abbastanza bene all'applicazione di forme di dosaggio in grado di produrre effetti sia topici che sistemici e, vista la scarsa mobilità, anche di forme di dosaggio non convenzionali a rilascio protratto di principi attivi (Rossi S. *et al.*, 2005).

La mucosa buccale presenta una grande superficie (circa il 23% della superficie totale della mucosa orale compresa la lingua) e ben si presta alla somministrazione sistemica di farmaci (Teubl B.J. *et al.*, 2012).

Quando questa via di somministrazione viene utilizzata per ottenere un effetto sistemico, risultano evidenti numerosi vantaggi:

- la mucosa buccale protegge il farmaco dalla degradazione dovuta al pH e da vari enzimi presenti nel tratto gastro-intestinale;
- il farmaco raggiunge direttamente il circolo plasmatico;
- il fenomeno del metabolismo di primo passaggio epatico è eliminato;
- i livelli ematici del farmaco non subiscono evidenti fluttuazioni;
- la biodisponibilità del farmaco è aumentata rispetto a quanto osservato dopo somministrazione per via orale;
- è possibile la rimozione della forma di dosaggio nelle emergenze;
- la compliance del paziente è migliorata grazie alla facilità di somministrazione delle forme di dosaggio e all'accessibilità del sito di applicazione (Campisi et al. 2010).

Composti con differenti proprietà chimico fisiche attraversano la mucosa buccale mediante differenti meccanismi:

- Diffusione semplice (paracellulare e trancellulare);
- Diffusione mediata da carrier;
- Trasporto attivo;
- Endocitosi;

La diffusione passiva risulta essere il principale meccanismo per il trasferimento dei farmaci attraverso mucosa buccale, mentre il trasporto carrier-mediato esercita un ruolo secondario. Un farmaco può permeare attraverso la mucosa buccale, utilizzando contemporaneamente sia la via trancellulare che la via paracellulare, ma il percorso che offre la minima resistenza alla penetrazione è generalmente preferito, in funzione delle sue proprietà (dimensioni, lipofilia, capacità di formare legami a idrogeno, carica, conformazione ecc). In generale, per composti idrofili il percorso paracellulare è la via preferita mentre la via transcellulare è preferita dai farmaci lipofili (De Caro V. *et al.*, 2012).

Alcuni descrittori molecolari sono in grado di fornire buone previsioni sull'adeguatezza delle proprietà chimico fisiche dei farmaci per attraversare le membrane biologiche. La “*regola di Lipinski*” conosciuta anche come “*La Regola del Cinque*”, afferma che, per avere un buon assorbimento, un farmaco deve possedere:

- un peso molecolare minore di 500

- non più di 5 gruppi donatori di legame a idrogeno
- non più di 10 gruppi accettori di legame a idrogeno
- un valore di log P calcolato minore di +5
- un'area di superficie polare $\leq 140 \text{ \AA}$ ed un numero di legami ruotabili ≤ 10 (Lipinski C.A., 2004; Lipinski C.A. *et al.*, 2012)

Una varietà di tessuti di animali possono essere utilizzati per studi di permeabilità attraverso mucosa buccale. La mucosa buccale porcina, in particolare, è considerata la più rappresentativa del tessuto umano per morfologia, struttura e distribuzione del bilayer lipidico mucosale; inoltre, questo epitelio, analogamente a quello umano, non presenta alcuna cheratinizzazione (Campisi G. *et al.* 2010).

2.5 Mucoadesione ed *Adhesive Drug Delivery Systems*

La via buccale mostra, però, alcuni svantaggi. Essi sono principalmente connessi ai meccanismi fisiologici di rimozione dal cavo orale quali l'effetto di lavaggio da parte della saliva e lo stress meccanico che le forme di dosaggio solide subiscono nell'ambiente. Inoltre, i tempi di ritenzione sul sito di assorbimento possono essere insufficienti, la concentrazione del farmaco sul sito potrebbe non essere adeguata e, in relazione alla zona di applicazione all'interno del cavo orale, una quota di farmaco rilasciato potrebbe essere persa per deglutizione. Per queste ragioni, la recente ricerca scientifica mira allo sviluppo di *Adhesive Drug Delivery Systems*, ovvero sistemi costituiti da materiali polimerici con azione mucoadesiva (Kumar V. *et al.*, 2011).

Infatti, tali sistemi possono offrire numerosi vantaggi rispetto a forme di dosaggio convenzionali:

- △ stretto contatto tra la mucosa e la forma di dosaggio;
- △ raggiungimento di elevate concentrazioni di farmaco sulla superficie di assorbimento per un periodo prolungato di tempo;
- △ immobilizzazione della forma di dosaggio in una specifica zona del cavo orale;

- ▲ protezione del farmaco dalle condizioni ambientali (Perioli L., Pagano C., 2012).

Inoltre, attraverso l'impiego degli *Adesive Drug Delivery Systems* la fase biofarmaceutica viene prolungata e, nel caso di formulazioni per terapie sistemiche, si assiste ad un prolungamento della durata dei livelli ematici di farmaco in concentrazione terapeuticamente opportuna.

Con il termine bioadesione si intende l'instaurarsi di un intimo contatto tra un sistema farmaceutico e un substrato biologico attraverso la formazione di legami di natura chimica e/o fisica tra le due superfici. Quando l'interazione avviene tra una forma farmaceutica e il muco, allora si parla di mucoadesione.

Sono state sviluppate numerose teorie per spiegare il fenomeno della bioadesione: la teoria elettronica, dell'assorbimento, della frattura, della bagnabilità e della diffusione.

Nessuna teoria, presa singolarmente, è stata accettata come unico meccanismo attraverso il quale avviene il processo; tuttavia, una combinazione di più teorie può essere usata per descrivere il fenomeno (Boddupalli B. M. *et al.*, 2010).

Il meccanismo della mucoadesione è convenzionalmente diviso in due fasi: la fase di contatto e la fase di consolidamento (Figura 15). Nella prima fase si instaura un contatto tra il polimero e il muco presente sul tessuto biologico, favorito dall'analogia strutturale, dalla buona bagnabilità e dalle proprietà di rigonfiamento dei polimeri. Durante la fase di consolidamento si assiste alla compenetrazione delle catene polimeriche presenti nel sistema. In altre parole, il polimero del sistema farmaceutico viene portato dapprima in intimo contatto con la mucosa; con il tempo, le catene del materiale bioadesivo penetrano nello strato di muco, ricco di catene glicoproteiche (mucine). Tra i polimeri si instaurano legami a idrogeno che servono ad ancorare il dispositivo bioadesivo sul sito di applicazione in modo semipermanente.

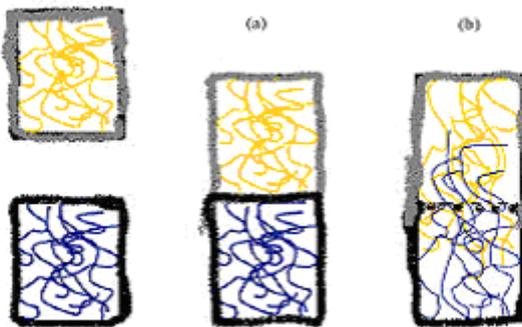


Figura 15. Fase di contatto (a) e fase di consolidamento (b) durante il processo di mucoadesione

I materiali utilizzati nello sviluppo di formulazioni mucoadesive per applicazione buccale sono in genere macromolecole idrofile, caratterizzate dalla presenza di un elevato numero di gruppi capaci di garantire l'instaurarsi di legami a idrogeno tra la formulazione e le glicoproteine contenute nel muco. Pertanto, i polimeri contenenti gruppi ossidrilici e carbossilici, come polivinilalcol, acido poliacrilico, poli-idrossialchil-metacrilati, e i loro rispettivi copolimeri sono i candidati ideali per la bioadesione (Boddupalli B. M. *et al.*, 2010).

Ulteriori eccipienti possono essere aggiunti alla formulazione per modulare le proprietà di tali sistemi: filmogeni, plasticizzanti, dolcificanti, stabilizzanti, gelificanti, rigonfianti e polimeri rate-controlling, capaci di controllare il rilascio del principio attivo. Questi ultimi rappresentano i componenti più importanti per lo sviluppo di nuovi *Adhesive Drug Delivery Systems*. Lo sviluppo di forme di dosaggio mucoadesive per il rilascio buccale di principi attivi è un campo in continuo sviluppo visti i vantaggi che offre questa via di somministrazione.

2.6 Struttura e funzionamento della Barriera Emato Encefalica

I farmaci destinati al trattamento di patologie del SNC dovrebbero, dopo somministrazione, raggiungere il sito di azione rapidamente e immutati.

Tuttavia, affinché un farmaco possa giungere a livello cerebrale, è necessario che permei attraverso le pareti dei capillari cerebrali, diffonda nei liquidi interstiziali e che, infine, venga captato dalle cellule nervose. (Rasheed A. *et al.*, 2010), (Vlieghe P., Khrestchatisky M., 2013)

Tre sono le barriere fisiologiche che regolano l'omeostasi del tessuto nervoso e limitano il trasporto delle molecole attraverso il parenchima cerebrale (Abbott N. J. 2013) (Figura 16):

- I. la barriera emato-encefalica (BBB), che rappresenta l'interfaccia principale tra sangue e SNC;
- II. la barriera sangue-fluido cerebrospinale (CSFB), che comprende l'epitelio del plesso corioideo secernente liquido cerebrospinale (CSF) nei ventricoli cerebrali;
- III. la membrana epiteliale avascolare dell'aracnoide, che rappresenta il rivestimento più esterno del SNC e delinea lo strato intermedio delle meningi.

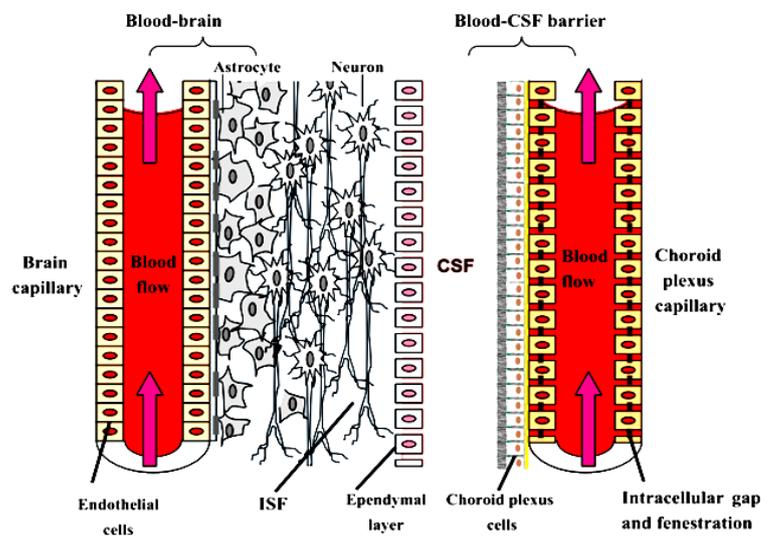


Figura 16. Rappresentazione delle barriere fisiologiche cerebrali.

La rete di capillari, che irrorà il cervello, è così compatta e tortuosa che ogni neurone o cellula gliale si trova ad una distanza massima di 20 μm da un capillare;

dunque, ogni neurone è ampiamente perfuso da microvasi sanguigni e, teoricamente, il percorso transvascolare permetterebbe ai farmaci di accedere per intero al cervello ed essere captati da ogni singolo neurone. (Vlieghe P., Khrestchatisky M. 2013)

Nonostante la presenza della fitta rete di capillari, la principale difficoltà della maggior parte dei composti terapeutici, che raggiungono il cervello attraverso il flusso ematico, è legata all'incapacità di attraversare la barriera emato-encefalica (BBB). (Roy S. 2012), (Zawilska J. B. *et al.* 2013)

Quest'ultima, infatti, non è una semplice barriera fisica, che protegge efficacemente il SNC da sostanze neurotossiche, ma rappresenta un vero e proprio ostacolo all'ingresso di un gran numero di potenziali agenti terapeutici nel cervello. Pertanto, la capacità di una molecola di giungere al SNC è strettamente legata alle proprietà chimico-fisiche della stessa e alle caratteristiche morfologiche della BBB. (Abbott N. J. *et al.* 2010) (Roy S. 2012), (Rasheed A. *et al.* 2010), (Pavan B. *et al.* 2008)

I costituenti principali della BBB sono le cellule endoteliali dei capillari cerebrali (BCECs), che associate ad altri tipi di cellule, quali i periciti, la microglia e i piedi terminali perivascolari degli astrociti (*end-foot*), garantiscono la formazione dell'unità neurovascolare e lo svolgimento di tutte le funzioni della BBB (Figura 17a). (Abbott N. J. 2013), (Pavan B. *et al.* 2008), (Nguyen J.H. 2012)

In particolare, i periciti avvolgono parzialmente le cellule endoteliali e condividono con esse una lamina basale; i piedi perivascolari degli astrociti collegano i neuroni e la microglia [costituite da cellule del sistema immunitario SNC-residente (macrofagi perivascolari)], contribuendo ai processi di difesa degli organi cerebrali. (Abbott N. J. 2013)

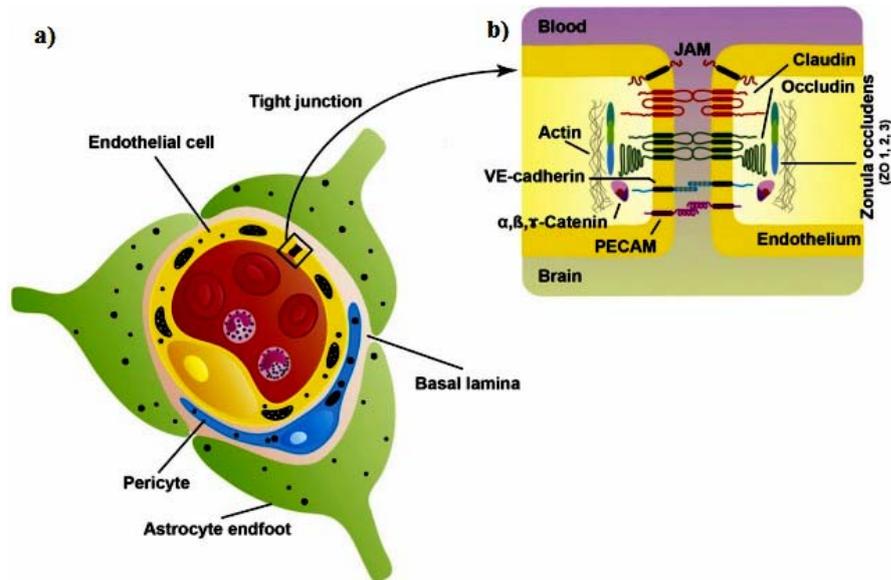


Figura 17. a) Rappresentazione dell'unità neurovascolare; b) Struttura anatomico-fisiologica delle Tight Junctions

Le BCECs e i loro complessi giunzionali costituiscono il più importante ostacolo all'attraversamento della BBB (dal sangue al parenchima cerebrale). Esse non solo rivestono la superficie interna del lume dei vasi cerebrali, ma, rispetto alle cellule che rivestono i capillari periferici, mostrano particolari caratteristiche morfologiche che le contraddistinguono, quali:

- la presenza di giunzioni intercellulari strette, dette *tight junctions* (Tjs),
- l'assenza di fenestrature,
- una ridotta attività pinocitica. (Roy S. 2012), (Vlieghe P., Khrestchatisky M., 2013), (Pavan B. *et al.* 2008), (Rautio J. *et al.*, 2008), (Kang E.J. *et al.*, 2013)

Le TJs rappresentano la saldatura che tiene intimamente connesse tra di loro le BCECs limitando in quantità significative la diffusione paracellulare di ioni e altre piccole molecole idrosolubili. (Abbott N. J., 2013), (Vlieghe P., Khrestchatisky M., 2013), (Rautio J. *et al.*, 2008), (Abbott N. J. *et al.*, 2010). Esse si originano dall'interazione di diverse molecole proteiche, comprendenti (Figura 17b): le proteine transmembrana (claudine e occludine) e le proteine della zonula occludens (ZO 1, 2 e 3), che ancorano le precedenti al citoscheletro intracellulare di actina.

Le BCECs, infine, portano alla formazione di una vera e propria “barriera enzimatica” esprimendo una varietà di enzimi, sia citosolici che di membrana (carbosipeptidasi, aminopeptidasi, colinesterasi, ecc.), che possono metabolizzare efficientemente i farmaci e, pertanto, contribuiscono ulteriormente al comportamento restrittivo della barriera. (Abbott N. J. *et al.*, 2010) (Vlieghe P., Khrestchatsky M., 2013) (Pavan B. *et al.*, 2008)

E’ importante sottolineare che non tutto il sistema nervoso è protetto dalla BBB; essa, infatti, non è presente in alcune aree, determinando la libera circolazione di soluti tra il sangue e il liquido interstiziale circostante. Queste aree sono denominate collettivamente “organi circumventricolari” (CVO) tra i quali è compreso il plesso coroideo. Le cellule epiteliali del plesso coroideo possiedono, infatti, numerose fenestrature: esse non sono interruzioni della parete del capillare, ma delle zone in cui la parete è molto sottile, consentendo, pertanto, l’attraversamento della barriera per via intracellulare (Roy S., 2012). Tuttavia, l’area dei capillari fenestrati presenti nei CVO è nettamente inferiore rispetto all’area totale della BBB, in un rapporto di circa 1:5000, rendendo trascurabile l’elevata permeabilità di queste zone in confronto alla capacità barriera dell’endotelio cerebrale. (Pavan B *et al.*, 2008)

Mentre la via di trasporto paracellulare è bloccata dai complessi giunzionali, i soluti essenziali per il nutrimento degli organi superiori, sia verso l’interno che verso l’esterno del parenchima cerebrale, si muovono per via transcellulare. (Kang E. J. *et al.*, 2013)

In particolare, il movimento dei nutrienti attraverso la BBB può essere sia di tipo passivo, guidato dal gradiente di concentrazione plasma-cervello, sia di tipo facilitato, mediante una serie di trasportatori specifici presenti nelle membrane delle cellule endoteliali. Trasportatori di efflusso, inoltre, limitano la permanenza nel SNC di una grande varietà di soluti. (Abbott N. J. *et al.*, 2010)

Una comprensione dettagliata sia dei meccanismi di captazione che di efflusso regolati dalla BBB (Figura 18) può essere di grande importanza al fine di sviluppare nuovi agenti terapeutici mirati al cervello e capaci di esplicare l'effetto farmacologico atteso. (Roy S., 2012)

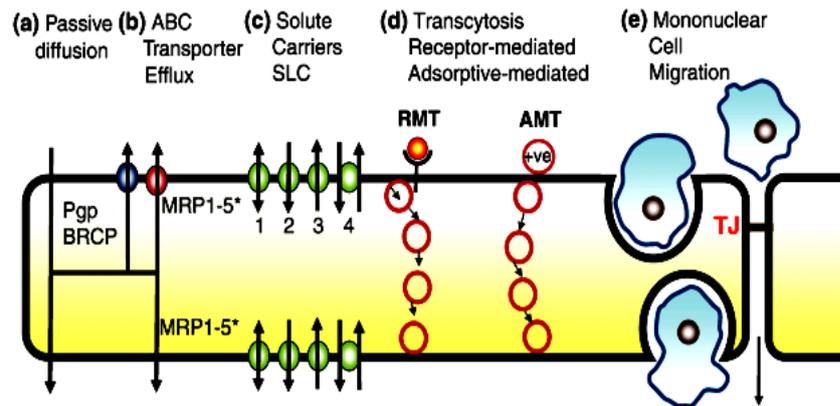


Figura 18. Meccanismi di captazione ed efflusso regolati dalla BBB.

Solo le molecole di piccole dimensioni, con sufficiente liposolubilità, opportuno peso molecolare (PM) e con natura neutra o senza carica, possono diffondere passivamente attraverso le BCECs e distribuirsi nel cervello (Gabathuler R., 2010).

In condizioni fisiologiche, la BBB ostacola l'ingresso di soluti polari e di molecole con dimensioni superiori a 500 Da. Si presume, infatti, che il passaggio di molecole idrofile attraverso la BBB dipenda in gran parte dalla loro dimensione molecolare (Kang E. J. *et al.*, 2013). Pertanto, un valido approccio per ottenere o migliorare la diffusione passiva di farmaci attraverso la BBB potrebbe essere quello di aumentare la lipofilia o ridurre la dimensione molecolare. (Roy S., 2012)

Si deve comunque tenere in considerazione che numerose molecole, pur essendo capaci di attraversare la BBB per diffusione passiva, vengono attivamente trasportate dal cervello al flusso sanguigno mediante sistemi di trasporto attivi di efflusso (AET). Il modello AET della BBB è costituito da una famiglia di proteine di trasporto attivo conosciute con il nome ATP-binding cassette (ABC). Esse includono la P-glicoproteina (P-gp), la Multidrug Resistance Proteins (MRP) e la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) che, strategicamente espresse sul lato luminale dell'endotelio della BBB, impediscono l'ingresso nel cervello di sostanze endogene potenzialmente tossiche. Allo stesso modo tali sistemi impediscono l'ingresso di xenobiotici e di farmaci lipofili utili per le patologie del SNC

(Abbott N. J., 2013) (Vlieghe P, Khrestchatisky M., 2013) (Gabathuler R., 2010). Di conseguenza, se un farmaco è un buon substrato per i sistemi AET della BBB non può distribuirsi nel cervello e si assiste alla comparsa dei cosiddetti fenomeni di “resistenza ai farmaci”. Pertanto, la co-somministrazione di molecole che inibiscono il sistema AET, insieme all’agente terapeutico, potrebbe essere una strategia valida per aumentare la concentrazione cerebrale del principio attivo. (Pavan B. *et al.*, 2008)

Le molecole idrofile di piccole dimensioni, essenziali per la sopravvivenza delle cellule cerebrali, come glucosio, amminoacidi, vitamine e nucleotidi, usano sistemi di influsso carrier-mediati espressi sul lato luminale (sangue) e basolaterale (cervello) delle cellule endoteliali. I carriers (SLC) possono essere (Figura 18):

- bidirezionali, la direzione di trasporto è governata dal gradiente di concentrazione del substrato (1);
- unidirezionali, sia verso l’interno che verso l’esterno della cellula (2/3);
- scambiatori/co-trasportatori per lo scambio o il co-transporto di altri soluti o ioni nella stessa direzione o in quella opposta (4).

In questo ultimo caso la direzione di trasporto è anche reversibile secondo gradiente elettrochimico. (Abbott N. J. *et al.*, 2010)

2.7. Prodrug e site targeting

Per il trattamento di patologie a carico del SNC, il *drug design* di molecole che devono agire in specifici distretti dell’organismo deve tener conto che l’efficacia del nuovo sistema terapeutico dipende principalmente dalla capacità intrinseca del principio attivo di raggiungere l’organo bersaglio e di mantenersi in concentrazione adeguata e per tempi opportuni. Quest’ultimo fattore rappresenta una vera e propria sfida alla progettazione razionale di profarmaci capaci di direzionare e fornire il principio attivo direttamente al cervello. (Roy S., 2012)

I principali ostacoli nel *drug targeting* (direzionamento) e nel *drug delivery* (rilascio) di farmaci diretti al SNC sono rappresentati dalla mancata selettività da parte di molti agenti farmacologici, potenzialmente efficaci, nei confronti del sito

d'azione e dall'incapacità degli stessi di attraversare le barriere fisiologiche, che regolano la diffusione delle sostanze dal circolo ematico alle aree cerebrali. (Vlieghe P., Khrestchatisky M., 2013), (Pavan B. *et al.*, 2008)

Un interessante approccio per aumentare l'assorbimento dei farmaci nel SNC potrebbe essere quello di progettare farmaci che assomigliano strutturalmente ai composti endogeni, oppure coniugati ad essi, per essere trasportati nel cervello dai carrier endogeni. (Roy S., 2012), (Pavan B. *et al.*, 2008)

Molecole grandi e/o idrofile come ormoni, transferrina, insulina e lipoproteine attraversano la BBB per transitosi, utilizzando specifici recettori espressi sul lato luminale delle cellule endoteliali. Nei processi di transitosi recettore-mediata (RMT), il ligando si lega al recettore e fa scattare un evento endocitotico che consente il trasporto di macromolecole come peptidi e proteine attraverso l'endotelio. Nei processi di transitosi mediati dall'adsorbimento (AMT), le macromolecole cariche positivamente inducono direttamente la transitosi (Figura 18, d).

Questi sistemi possono essere sfruttati per il *drug targeting* al SNC di farmaci ad alto peso molecolare. (Abbott N. J., 2013)

Per aggirare la moltitudine di ostacoli che impediscono la penetrazione da parte di potenziali agenti terapeutici nel SNC, sono state esplorate e sviluppate numerose strategie di *drug delivery*. (Roy S., 2012)

Generalmente, sono tre gli approcci più utilizzati.

Il primo comprende una serie di metodi invasivi, come la somministrazione intraparenchimale, intracerebroventricolare o intratecale, ecc., mediante i quali è possibile fornire direttamente il farmaco nel cervello.

Il secondo approccio consiste nell'interruzione transitoria della BBB, come l'apertura per infusione arteriosa intracarotidea di soluzioni iperosmotiche di saccaridi (ad esempio, mannitolo), permettendo agli agenti terapeutici di entrare nel cervello attraverso una barriera resa più permeabile. (Vlieghe P., Khrestchatisky M., 2013)

La terza strategia, valida e non invasiva, in grado di migliorare i processi di assorbimento e distribuzione di un farmaco nel SNC, consiste nella somministrazione di *prodrug*. Questo approccio si basa sulla modificazione

chimica reversibile di una molecola farmacologicamente attiva, che le consente di superare efficacemente la BBB, raggiungendo l'opportuna concentrazione *in situ*, dove può essere riconvertita nel farmaco padre (*parent drug*) ed esplicare così l'effetto farmacologico atteso. (Gabathuler R., 2010)

Nel corso degli ultimi due decenni, all'attuazione della strategia *prodrug* ha registrato un costante miglioramento delle proprietà fisico-chimiche, biofarmaceutiche e/o farmacocinetiche di composti farmacologicamente attivi. Si stima che circa il 10% dei farmaci attualmente in commercio nel mondo può essere classificata come "profarmaco". (Zawilska J. B. *et al.*, 2013) (Huttunen K. M. *et al.*, 2011)

Il termine *profarmaco*, introdotto nel 1958 da Adrien Albert, si riferisce a derivati biologicamente inerti ottenuti per modificazioni chimiche transitorie di specie biologicamente attive. *In vivo*, il profarmaco subisce una conversione enzimatica e/o chimica per rilasciare il farmaco attivo direttamente al sito d'azione. L'obiettivo primario del *prodrug design* è, infatti, quello di mascherare le proprietà indesiderate del *parent drug* o di migliorarne le proprietà chimico-fisiche, al fine di aumentarne la biodisponibilità o dotarle di elevato organotropismo. (Roy S. 2012) (Huttunen K. M. *et al.*, 2011)

Nella letteratura recente sono riportati studi mirati alla formulazione di nuovi *delivery systems* in grado di veicolare molecole farmacologicamente attive in prossimità del loro sito d'azione. Tra questi, i liposomi, le nano e microparticelle polimeriche o lipidiche, le micelle e i dendrimeri sembrano essere i più efficaci nell'interagire con i sistemi biologici a livello molecolare con un alto grado di specificità, nel fornire neuroprotezione e nel facilitare il trasporto dei farmaci attraverso la BBB (Di Stefano A. *et al.*, 2008).

La realizzazione di profarmaci, ottenuti mediante formazione di legami covalenti con un opportuno "mezzo di trasporto temporaneo" o *carrier chimico*, consente di modificare le proprietà chimico-fisiche del principio attivo, in modo da rendere ideale il rapporto tra porzione idrofila e porzione lipofila, la dimensione e le caratteristiche di polarità, facilitandone quindi il trasporto attraverso la BBB (Scherrmann J.-M. , 2002).

L'ottenimento di questo risultato dipende dalla scelta dell'opportuno *carrier* e dal suo legame con il farmaco, che deve essere stabile a livello sistemico, ma, allo stesso tempo, deve permettere l'interazione del principio attivo con il suo sito bersaglio, mantenendone, quindi, inalterato il meccanismo d'azione a livello molecolare.

3. APPROCCIO TECNOLOGICO AL MIGLIORAMENTO DELLA BIODISPONIBILITA' DI FARMACI PER LA PD

3.1 Studi preliminari sulla somministrabilità di L-Dopa Metil Estere attraverso la mucosa buccale

3.1.1 Premessa

Secondo dati riportati in letteratura, la LDME diffonde attraverso la mucosa intestinale e nasale, con una velocità maggiore rispetto alla L-DOPA, producendo una concentrazione plasmatica significativamente più alta e, una volta giunta nel torrente plasmatico, viene rapidamente idrolizzata in L-DOPA dalle esterasi non specifiche (Itho S., Oo C., 2009).

Una interessante via di somministrazione alternativa, che potrebbe ottimizzare la biodisponibilità di questo principio attivo, potrebbe essere la mucosa buccale

Sulla base delle considerazioni precedentemente riportate e dalla applicazione di tali concetti, la LDME, rispetto alla L-DOPA, dovrebbe attraversare più facilmente le biomembrane, (Vedi tabella 3)

	L-DOPA	LDME
Inherent Properties		
Empirical Formula	C ₉ H ₁₁ NO ₄	C ₁₀ H ₁₃ NO ₄
Molecular Weight	197.188	211.214
Calculated Properties		
Molar Volume (cm ³)	134.297±3.0	159.6
ACD/LogP	-0.23	-0.07
Log D (pH 7.4)	< - 2	-0.598
Number of Hydrogen Bond Donors	5	4
Number of Hydrogen Bond Acceptors	5	5
Polar Surface Area (Å ²)	5103.780	92.78
Number of Freely Rotatable Bonds	6	7
Rule of 5 Violations	1	0

Tabella 3. Proprietà fisico-chimiche calcolate per L-DOPA ed LDME

Alla luce dei vantaggi offerti dalla mucosa buccale come via di somministrazione alternativa alla via orale, l'applicazione di una forma di dosaggio transbuccale contenente LDME potrebbe minimizzare i limiti della terapia convenzionale e migliorare la qualità di vita del paziente.

In base alle considerazioni fatte in precedenza sulla necessità di garantire un controllo del segnale dopaminergico a livello cerebrale, per far fronte agli effetti indesiderati della L-DOPA, e alle evidenze di una potenziale applicazione dei sistemi a rilascio controllato, nel corso della mia attività di ricerca mi sono occupata di valutare la somministrabilità della LDME per via buccale. A tal fine è stato valutato, preliminarmente, il comportamento del derivato estereo nelle condizioni ambientali del cavo orale e, per mezzo di test *ex vivo*, è stata determinata l'attitudine della LDME ad attraversare la mucosa buccale umana.

3.1.2 Risultati e Discussione

Durante le fasi preliminari della progettazione di nuove forme di dosaggio per il rilascio buccale di farmaci è necessaria la valutazione del comportamento del principio attivo nell'ambiente di somministrazione. In primo luogo, è fondamentale considerare la stabilità del principio attivo nelle condizioni fisiologiche della cavità orale e l'attitudine di questo a permeare la mucosa.

È stato, quindi, condotto uno studio preliminare volto a valutare i fattori limitanti per la somministrazione buccale della LDME.

Allo scopo di verificare l'assenza di alterazioni chimiche del farmaco in saliva, modificazioni che potrebbero compromettere gli studi di permeabilità attraverso la membrana, è stata valutata la stabilità chimica della LDME in soluzioni tampone simulanti le condizioni di somministrazione. Analoghe valutazioni sono state effettuate in ambiente plasmatico in cui il principio attivo potrebbe subire fenomeni di degradazione.. In particolare, lo studio di stabilità è stato condotto in condizioni mimanti l'ambiente della cavità orale, utilizzando saliva artificiale non enzimatica a pH 6.8 e in ambiente plasmatico, utilizzando plasma artificiale non enzimatico a pH 7.4.

La valutazione della stabilità chimica delle soluzioni acquose della LDME è stata effettuata mediante analisi HPLC per un arco di tempo di 6 ore. Le analisi di campioni, prelevati ad intervalli di tempo di un ora, hanno evidenziato che ad entrambe le condizioni di pH si assiste alla liberazione di L-DOPA, indicando un fenomeno di idrolisi chimica del legame estereo. In particolare, sia per la soluzione a pH 6.8 che per quella a pH 7.4 si assiste, nelle 6 ore, ad una progressiva e costante liberazione di L-DOPA che nel tempo raggiunge rispettivamente un valore dell'8.3 % e dell'11% del prodotto somministrato. Inoltre, si verifica la concomitante e progressiva formazione di un prodotto di decomposizione che impartisce al campione una colorazione bruna. Sia la velocità di idrolisi che di formazione del prodotto di decomposizione aumentano all'aumentare del pH, evidenziando una catalisi di tipo basico.

La struttura della L-DOPA così come quella della LDME è assimilabile ad una struttura idrochinonica (anello aromatico OH-bisostituito). In letteratura è riportato che gli idrochinoni possono essere ossidati a chinoni, mediante una reazione che comporta un trasferimento di elettroni. Tale ossidazione può essere osservata anche visivamente, perché gli idrochinoni sono incolori ed i chinoni sono colorati (Hovorka, S.W., Schoneich, C., 2001).

L'eventuale somministrazione della LDME nella cavità orale deve pertanto prevedere la stabilizzazione del farmaco nell'ambiente biologico.

Secondo quanto riportato in letteratura, in soluzioni acide (pH 2.0 o 4.0) la L-DOPA rimane quasi completamente in forma non ossidata (Kankkunen T. *et al.*, 2002).

Sulla base di queste evidenze è sembrato opportuno stabilizzare le soluzioni della LDME impiegando soluzioni tampone a valori di pH leggermente acidi, compatibili con il fluido salivare e tali da non alterare le proprietà di barriera della mucosa buccale.. Pertanto, la stabilità chimica della LDME è stata valutata mediante l'analisi di diverse soluzioni del farmaco anche nel range di pH 5.8 - 6.5:

- tampone citrato pH 5.8
- tampone citrato pH 6.0
- tampone citrato pH 6.2
- tampone citrato pH 6.5

Tutte le soluzioni di farmaco sono state preparate ad una concentrazione di 1 mg/ml. La valutazione della stabilità chimica delle soluzioni acquose del derivato è stata effettuata mediante analisi HPLC per un arco di tempo di 6 ore. Le analisi di campioni, prelevati ad intervalli di tempo di un ora, hanno evidenziato che la velocità di idrolisi del legame estereo si riduce progressivamente al diminuire del pH della soluzione testata (Figura 19).

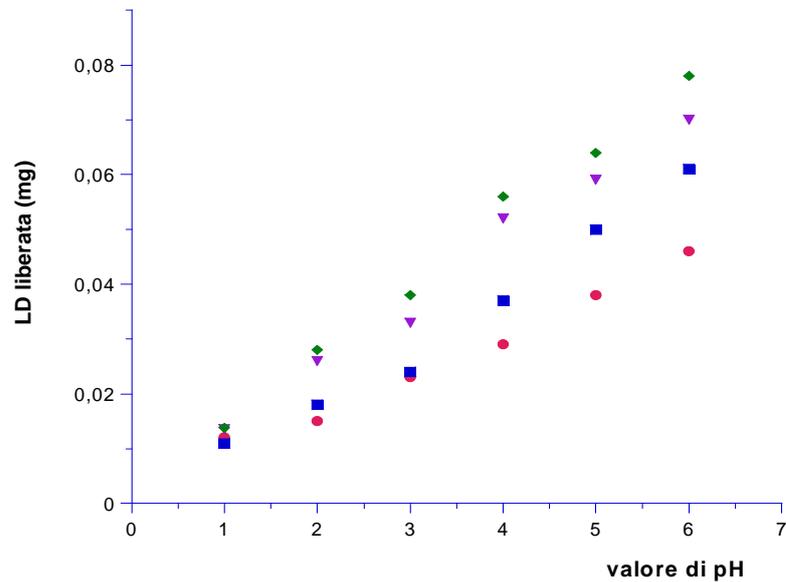


Figura 19 Effetto del pH sulla velocità di idrolisi chimica del legame estero della LDME a 37 °C: ● pH 5.8; ■ pH 6.0; ▼ 6.2; ◆ pH 6.5

La percentuale di L-DOPA liberata al variare del pH della soluzione, dopo sei ore di monitoraggio, è riassunta nella seguente tabella:

Soluzione tampone	% L-DOPA liberata
pH 5.8	4.5
pH 6.0	5.9
pH 6.2	7
pH 6.5	7.9

Tabella 4. Percentuale di L-DOPA liberata dopo 6 ore al variare del pH della soluzione tampone

Osservata la stabilità chimica della LDME, il lavoro è proseguito con la valutazione dell'attitudine della stessa ad attraversare la barriera mucosale buccale mediante studi di permeabilità *ex vivo* su modello animale.

Sulla base dei risultati di stabilità chimica, gli esperimenti di permeazione sono stati condotti impiegando soluzioni di LDME in tampone citrato pH 5.8, poiché a tale valore di pH la soluzione di farmaco risulta notevolmente stabile (% di L-DOPA liberata 4.5% dopo 6 ore). Per gli esperimenti di permeazione *ex vivo* è stata impiegata la mucosa buccale del maiale domestico in quanto è considerata la più rappresentativa del tessuto umano ed è paragonabile anche in termini di spessore (circa 200-800 μm) (Smart J.D., 2004) (Van Eyk A.D. and Van der Bijl P., 2004 a) (Van Eyk A. D. and Van der Bijl P., 2004 b).

Gli studi di permeazione sono stati condotti impiegando celle di diffusione verticali tipo Franz.

I campioni mucosali sono stati ottenuti da tessuto asportato chirurgicamente dalla cavità orale dei maiali, immediatamente dopo il sacrificio, e privato della porzione connettivale sottostante.

Prima dell'inizio degli esperimenti di permeazione, i campioni di mucosa sono stati sottoposti a shock termico, al fine di consentire la separazione dell'epitelio dalle porzioni submucosali (Diaz Del Consuelo I., 2005). Al fine di mantenere intatto il patrimonio enzimatico della mucosa, per gli studi di permeazione, i campioni sono stati utilizzati immediatamente dopo l'asportazione.

Gli esperimenti di permeazione sono stati condotti alla temperatura di $37.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$, in modo tale da simulare le condizioni del sistema biologico. Ad intervalli di tempo di un ora, sono stati prelevati campioni di soluzione accettrice; per evitare fenomeni di saturazione e mantenere le condizioni "sink" del sistema, i volumi prelevati sono stati sostituiti con uguale quantità di fluido accettore fresco.

Lo studio di permeazione della LDME attraverso la barriera ha previsto l'impiego, come fase donatrice, di una soluzione di farmaco 50 mg/ml in tampone citrato pH 5.8. Per evitare fenomeni di degradazione che avrebbero potuto alterare la valutazione della permeazione come fase accettrice è stata utilizzata una soluzione tampone di pari valore di pH. Tutti gli esperimenti sono stati condotti per circa 6 ore ed i risultati ottenuti sono stati riportati come media di 6 prove.

Ad ogni intervallo di tempo, sono state osservate le specie presenti nel compartimento accettore. I risultati hanno evidenziato che l'unica specie è la L-

DOPA. La quantità di L-DOPA nel compartimento accettore è stata determinata mediante analisi HPLC, utilizzando la relativa curva di taratura.

La quantità di L-DOPA riscontrata nel compartimento accettore, è stata espressa come quantità di L-DOPA in funzione del tempo (Figura 20).

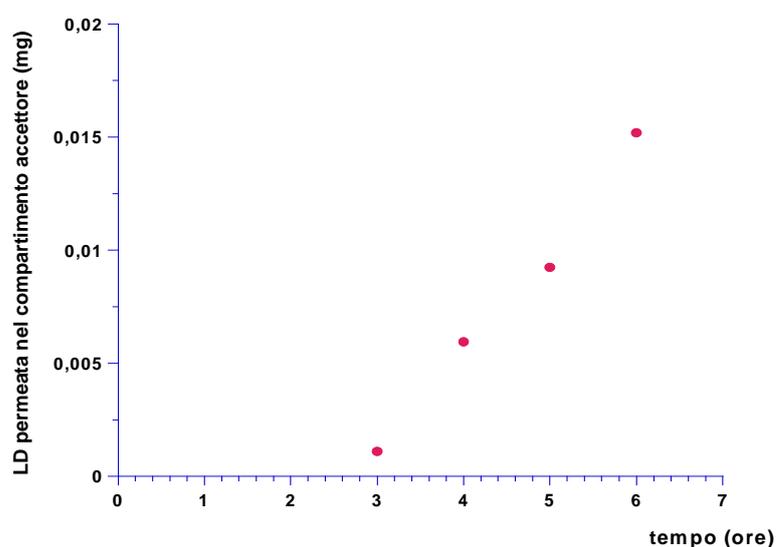


Figura 20 . Profilo di permeazione della L-DOPA dalla soluzione di LDME (50 mg/ml) in tampone citrato pH 5.8

Il valore di J_s è risultato pari a $0.011855 \text{ mg/cm}^2\text{h}$. Dall'intercetta tra la tangente alla porzione lineare del profilo di permeazione con l'asse delle x , si osserva un *lag time* di 2.5 ore.

La presenza di sola L-DOPA nell'accettore e il basso valore del flusso ottenuto sperimentalmente non si accordano con quanto riportato in letteratura: la LDME diffonde attraverso la mucosa intestinale e nasale molto velocemente e, secondo i criteri teorici della "regola di Lipinski", il profarmaco dovrebbe attraversare molto più facilmente le biomembrane, rispetto alla L-DOPA. (Itho S., Oo. C., 2000)

Da una attenta analisi della struttura molecolare e con l'ausilio del programma *chemicalize.org*, è stato possibile osservare che a pH 5.8, il 93.71% di LDME si trova nella sua forma dissociata e, quindi, l'aliquota di farmaco disponibile per la diffusione è bassa. Pertanto, sono stati eseguiti gli stessi esperimenti impiegando

una soluzione di farmaco in tampone a pH 6.2. Questo valore di pH può, infatti, essere considerato un buon compromesso tra stabilità (solo il 7% di LDME è idrolizzato dopo 6 h) e quantità di forma indissociata disponibile per la diffusione (14,42% a pH 6,2 vs 6.29% a pH 5.8).

Questa seconda serie di esperimenti di permeazione è stata condotta impiegando gli stessi metodi descritti e utilizzando soluzioni tampone a pH 6.2 sia come fase donatrice che come fase accettrice.

Anche in questo caso, i risultati hanno evidenziato che l'unica specie presente nel compartimento accettore è la L-DOPA.

La quantità di L-DOPA presente nel compartimento accettore è stata riportata in funzione del tempo (Figura 21).

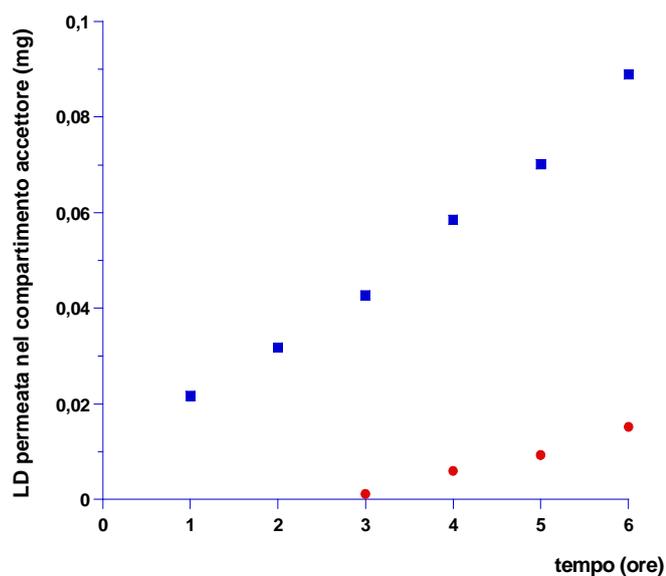


Figura 21. Profilo di permeazione della L-DOPA dalla soluzione di LDME (50 mg/ml) ● in tampone citrato pH 5.8 ■ in tampone citrato pH 6.2

L'impiego di soluzioni donatrici in tampone pH 6.2 ha fornito i risultati attesi: la quantità di L-DOPA presente nel compartimento accettore è risultata ben 6 volte superiore dopo le sei ore (0.014mg a pH 5.8 vs 0.088 mg a pH 6.2) e non si assiste al fenomeno del *lag time*.

In termini di flusso di J_s , impiegando soluzioni donatrici di LDME a pH 6.2, si

assiste ad un incremento di circa 3 volte (0.034699 mg/cm²h a pH 6.2 vs 0.011855 mg/cm²h a pH 5.8).

Alla luce dei risultati ottenuti dagli esperimenti di permeazione, è divenuto cruciale valutare se la quantità di L-DOPA presente nel compartimento accettore sia dovuto a:

- △ fenomeno di permeazione della L-DOPA formatasi nel compartimento donatore per idrolisi chimica e/o enzimatica;
- △ fenomeno di idrolisi enzimatica della LDME durante la sua permeazione attraverso l'epitelio buccale;
- △ fenomeno di idrolisi chimica della LDME nel compartimento accettore dopo la sua permeazione attraverso l'epitelio buccale.

Quest'ultima ipotesi può essere immediatamente scartata vista la notevole stabilità della LDME in soluzione ai valori di pH presi in esame.

Per verificare la prima ipotesi, sono stati condotti esperimenti di permeazione di soluzioni donatrici di sola L-DOPA impiegando:

- △ una soluzione di farmaco 1.5 mg/ml (massima solubilità) in tampone citrato pH 5.8 e come fase accettrice di una soluzione tampone citrato pH 5.8
- △ una soluzione di farmaco 1.5 mg/ml (massima solubilità) in tampone citrato pH 6.2 e come fase accettrice di una soluzione tampone citrato pH 6.2

Tutti gli esperimenti sono stati condotti per circa 6 ore ed i risultati ottenuti sono stati riportati come media di 6 prove.

La quantità di L-DOPA presente nel compartimento accettore è stata riportata in funzione del tempo (Figura 22).

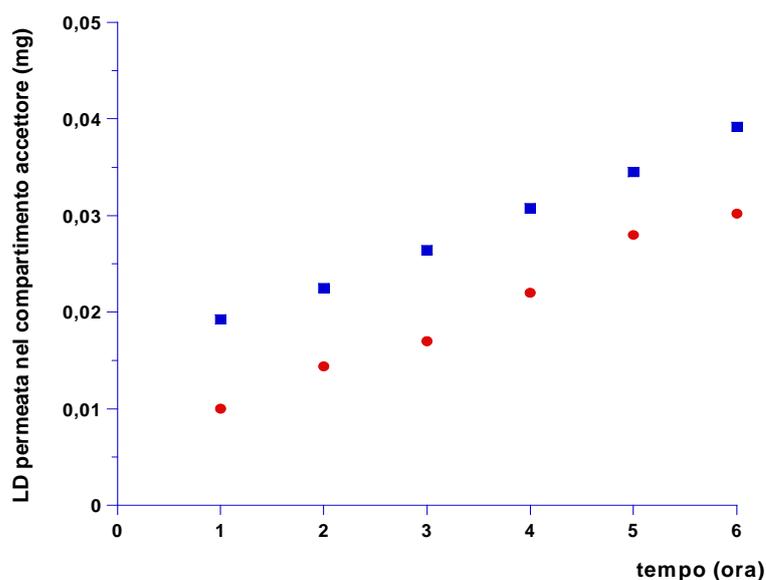


Figura 22. Profilo di permeazione della L-DOPA impiegando una soluzione di L-DOPA (1.5 mg/ml) ● in tampone pH 5.8 ■ in tampone pH 6.2

Impiegando soluzioni donatrici di L-DOPA a pH 5.8 e pH 6.2, i valori di J_s attraverso la mucosa buccale porcina, sono risultati pressoché identici: rispettivamente $0.0109 \text{ mg/cm}^2\text{h}$ e $0.0104 \text{ mg/cm}^2\text{h}$. Secondo quanto riportato in letteratura la L-DOPA attraversa le mucose, prevalentemente, mediante un meccanismo di trasporto carrier-mediato saturabile (Contin M., Martinelli P., 2010) ed, inoltre, la quantità della forma indissociata risulta bassa e rimane pressoché invariata ai due valori di pH impiegati (0.06 % a pH 5.8 vs 0.11 % a pH 6.2)

Al fine di verificare la conversione del profarmaco in L-DOPA catalizzata dagli enzimi di membrana, è stata valutata la velocità di idrolisi nel compartimento donatore dopo aver posto la soluzione di farmaco a contatto con la mucosa buccale. Gli esperimenti sono stati condotti ad una temperatura di 37°C distribuendo sulla superficie della mucosa buccale:

- una soluzione di LDME in tampone a pH 5.8 (1 mg-ml)
- una soluzione di LDME in tampone a pH 6.2 (1 mg-ml)

La valutazione della stabilità enzimatica delle soluzioni acquose del profarmaco è stata effettuata mediante analisi HPLC per un arco di tempo di 6 ore ad intervalli di tempo regolari di un ora.

Mettendo a paragone i risultati di stabilità chimica ed enzimatica (concentrazione di LDME 1 mg /ml) ai due diversi valori di pH, è possibile evidenziare che (Figura 23) :

- la velocità di idrolisi enzimatica è maggiore della idrolisi chimica
- l'idrolisi enzimatica risente dell'effetto del pH

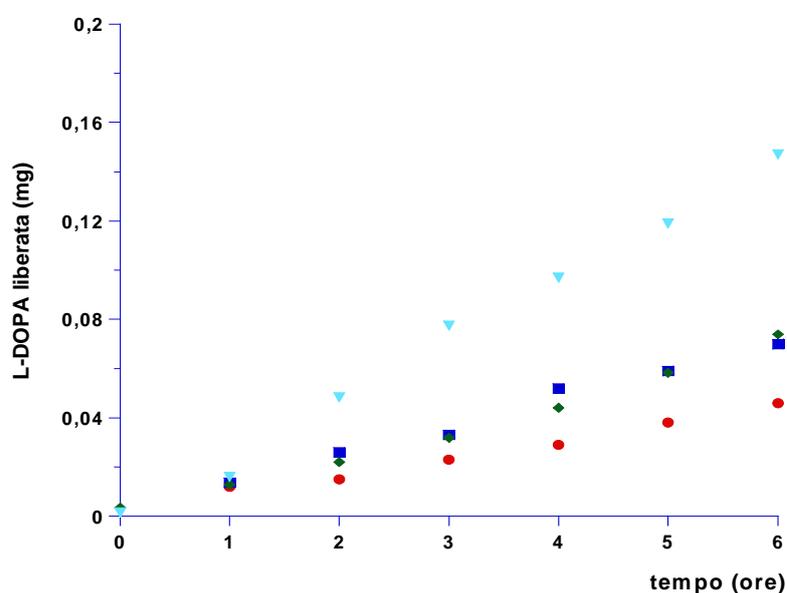


Figura 23. Velocità di idrolisi del legame estero della LDME a 37 °C:

- chimica a pH 5.8; ■ chimica a pH 6.2;
- ◆ enzimatica a pH 5.8; ▼ pH enzimatica a pH 6.2

Inoltre, al fine di valutare l'entità del fenomeno di scissione enzimatica sono stati condotti studi impiegando le medesime condizioni sperimentali degli studi di permeazione. Pertanto, 1 ml di soluzione di LDME ad una concentrazione di 50 mg/ml, sia in tampone a pH 5.8 che a pH 6.2, è stata posta a contatto con l'epitelio buccale.

Mettendo a paragone i risultati di stabilità enzimatica (concentrazione di LDME 50 mg /ml) ai due diversi valori di pH, è possibile evidenziare che la velocità di idrolisi enzimatica è leggermente superiore alla velocità di idrolisi chimica, come risulta dai valori riportati in Tabella 5

L-DOPA liberata (mg)		Tempo (ore)
<i>pH 5.8</i>	<i>pH 6.2</i>	
0.190	0.205	1
0.280	0.360	2
0.595	0.540	3
0.620	0.785	4
0.720	1.145	5
0.800	1.510	6

Tabella 5 . Quantità (mg) di L-DOPA liberata nel compartimento donatore da una soluzione di LDME (50mg/ml) a pH 5.8 e a pH 6.2

In particolare è possibile notare come a pH 6.2 la L-DOPA presente nel compartimento donatore raggiunge il valore di 1.5 mg solo dopo 6 ore. Questo dato ci permette di affermare che durante gli esperimenti di permeazione impiegando una soluzione donatrice di LDME 50 mg/ml, la specie che attraversa l'epitelio buccale è la LDME. L'incremento del valore di flusso ottenuto impiegando soluzioni donatrici di quest'ultima rispetto alla soluzione di sola L-DOPA è dovuto ad una maggiore tendenza della LDME ad attraversare la mucosa buccale. Pertanto, la quantità di L-DOPA riscontrata nel compartimento accettore è data da un fenomeno di idrolisi enzimatica durante il fenomeno di permeazione.

Al fine di promuovere la velocità di permeazione del farmaco attraverso la mucosa buccale, sono stati condotti esperimenti di permeazione in presenza di promotori di assorbimento (*enhancers*) chimici. Gli *enhancers* chimici, alterando transitoriamente le caratteristiche di permeabilità dello strato più esterno della mucosa, potrebbero promuovere il passaggio transmucosale. Come promotore di assorbimento è stato selezionato e testato il Tween 80 in soluzione al 2%: si tratta

di un tensioattivo non ionico che, interagendo con i lipidi o componenti proteiche di membrana, altera l'organizzazione lipidica del doppio strato cellulare e promuove la diffusione per via intracellulare (Khairnar G.A. Sayyad F.J., 2010). Esso, inoltre, può essere impiegato per migliorare la solubilità dei farmaci: quando la concentrazione di tensioattivi supera la loro concentrazione micellare critica (CMC), si verifica la formazione di micelle che intrappolano il farmaco all'interno di esse. Questo processo, noto come micellizzazione, comporta generalmente un aumento della solubilità dei farmaci e la possibilità di incrementarne la stabilità chimica e/o enzimatica (Chaudhary A. *et al.*, 2012).

Preliminarmente sono stati condotti studi di stabilità chimica ed enzimatica delle soluzioni di LDME (1mg/ml) in tampone a pH 6.2 contenete il 2% di Tween 80, al fine di valutare l'effetto del tensioattivo sulle cinetiche di idrolisi del legame estereo.

Come è possibile osservare dal grafico riportato in Figura 24 l'impiego del Tween 80 in soluzione al 2% è in grado di:

- preservare lievemente la soluzione di LDME dall'idrolisi chimica
- ridurre notevolmente la velocità d'idrolisi enzimatica della LDME

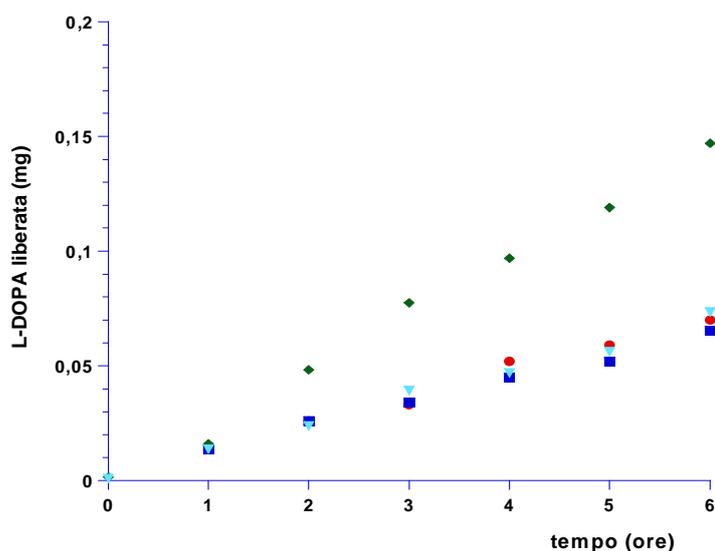


Figura 24. Velocità di idrolisi del legame estero della LDME a 37 °C:
 ● chimica a pH 5.8; ■ chimica a pH 5.8 al 2% di tween 80;
 ◆ enzimatica a pH 6.2; ▼ enzimatica a pH 6.2 al 2% di Tween 80

Lo studio di permeazione della LDME attraverso la mucosa buccale porcina ha previsto l'impiego come fase donatrice di una soluzione LDME 50 mg/ml in tampone citrato pH 6.2 al 2% di Tween e come fase accettrice di una soluzione tampone citrato pH 6.2.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti per circa 6 ore ed i risultati ottenuti sono stati riportati come media di 6 prove.

La quantità di L-DOPA permeata nel compartimento accettore è stata espressa in funzione del tempo, (Figura 25).

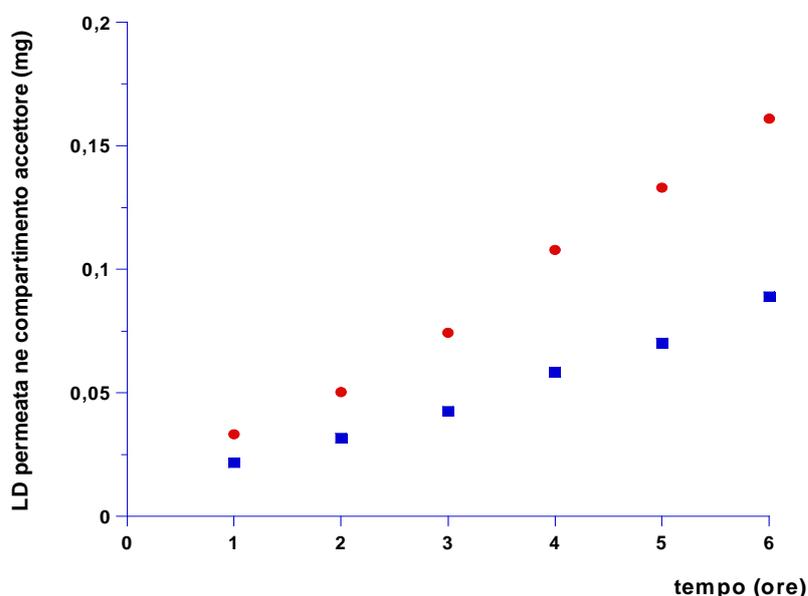


Figura 25. Profilo di permeazione della L-DOPA dalla soluzione di LDME (50 mg/ml) ● in tampone citrato pH 6.2 al 2% Tween 80 ■ in tampone citrato pH 6.2

Il valore di J_s impiegando soluzioni donatrici di LDME a pH 6.2 contenenti il 2% Tween 80, attraverso la mucosa buccale porcina, è risultato pari a 0.068368 mg/cm²h (vs 0.034699 mg/cm²h a pH 6.2). Si assiste, quindi, ad un incremento del flusso di L-DOPA di circa 2 volte.

Infine sono stati condotti studi di permeazione della sola L-DOPA attraverso la mucosa buccale porcina impiegando, come fase donatrice, una soluzione L-DOPA

1.5 mg/ml in tampone citrato pH 6.2 al 2% di Tween 80 e, come fase accettrice, una soluzione tampone citrato pH 6.2

Tutti gli esperimenti sono stati condotti per circa 6 ore ed i risultati ottenuti sono stati riportati come media di 6 prove.

La quantità di L-DOPA permeata nel compartimento accettore è stata riportata in funzione del tempo. (Figura 26).

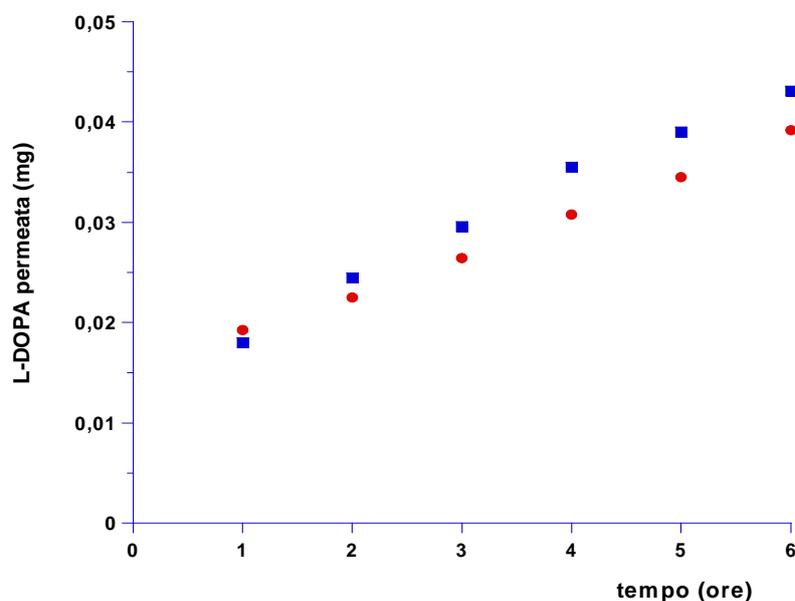


Figura 26. Profilo di permeazione della L-DOPA dalla soluzione di L-DOPA (1.5 mg/ml) ● in tampone citrato pH 6.2 ■ in tampone citrato pH 6.2 contenente il 2% Tween 80

Impiegando soluzioni donatrici di L-DOPA a pH 6.2 contenenti il 2% Tween 80, il valore di J_s attraverso la mucosa buccale porcina è risultato pari a 0.0130 mg/cm²h (vs 0.0104mg/cm²h a pH 6.2).

L'impiego dell'enhancer non ha determinato un aumento sostanziale del flusso di L-DOPA attraverso il tessuto.

Tale risultato conferma l'ipotesi precedentemente esposta ovvero che la specie che permea attraverso la mucosa buccale durante gli esperimenti di permeazione è

la LDME e non la L-DOPA originatasi nel compartimento donatore per idrolisi chimica e/o enzimatica.

Il Tween 80 rallenta la velocità di idrolisi enzimatica della LDME e, allo stesso tempo, ne incrementa il flusso attraverso l'epitelio, ma non promuove la permeazione della L-DOPA (0.068368 mg/cm²h vs 0.0130 mg/cm²h)

Per valutare cambiamenti patologici che si possono verificare nella morfologia e nell'organizzazione dei tessuti e, in particolare, osservare fenomeni di apoptosi o altri eventuali effetti citotossici del farmaco sul tessuto mucosale porcino, i campioni sono stati posti a contatto con le soluzioni per 6 ore, mimando le stesse condizioni delle prove di permeazione. In particolare, sono state valutate porzioni di tessuto mucosale trattato con le seguenti soluzioni in saliva artificiale:

- LDME 50 mg/ml in tampone pH 5.8
- LDME 50 mg/ml in tampone pH 6.2

L'analisi istomorfologica, effettuata presso il servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute "G. D'Alessandro" dell'Università degli Studi di Palermo, ha evidenziato che il tessuto mucosale non subisce alcun danno cellulare quando viene trattato con le soluzioni testate.

3.2. Formulazione di compresse buccali per il rilascio controllato di Ropinirolo (ROP)

3.2.1 Premessa

ROP a rilascio prolungato rappresenta, come già enunciato, un ulteriore e significativo passo avanti verso il perfezionamento delle terapie anti-Parkinson, che vedono nei farmaci dopaminoagonisti e nella L-DOPA i presidi farmacologici maggiormente impiegati.

Sebbene i vantaggi offerti dalla formulazione a rilascio protratto siano numerosi, esse da sole non eliminano uno dei principali svantaggi della somministrazione di Ropinirolo per *os*: il farmaco, infatti, subisce un marcato metabolismo di primo passaggio epatico che ne riduce la biodisponibilità al 55% della dose somministrata. Inoltre, lo steady-state viene raggiunto solo dopo circa 48 h (Tompson D. J. and Vearer D., 2007).

Al fine di minimizzare tale processo e di ottimizzare la biodisponibilità del principio attivo, si è ritenuta interessante, anche in questo caso, utilizzare la mucosa buccale quale sito di somministrazione.

Nell'ambito degli studi volti ad ottenere un miglioramento della biodisponibilità di farmaci noti e ampiamente usati nel trattamento della PD attraverso l'utilizzo di nuove forme di dosaggio per la somministrazione attraverso la via buccale è stato anche progettato un *nuovo Adhesive Buccal Drug Delivery System*.

La nuova formulazione prevede l'uso di polimeri mucoadesivi nei quali il farmaco è disperso uniformemente in una matrice polimerica monolitica. Il sistema matriciale, sotto forma di compressa, può essere applicato direttamente sulla mucosa (sito di assorbimento) sulla quale rimane adeso. Per prevenire la perdita di farmaco nel cavo orale il sistema è munito di un rivestimento impermeabile, che impedisce al farmaco di diffondere nella saliva e di essere perso per deglutizione.

Lo schema di tale sistema è riportato in Figura 27

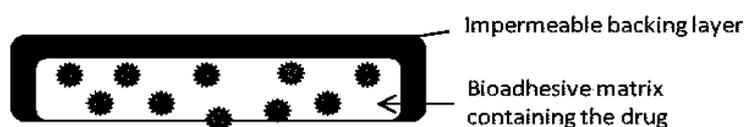


Figura 27. Schema del nuovo Adhesive Buccal Drug Delivery System contenente Ropinirolo

Gli aspetti positivi di questo sistema matriciale, legati ai vantaggi dati dalla somministrazione buccale, potrebbero tradursi in un miglioramento della terapia del Parkinson ed in un aumento della compliance da parte del paziente.

3.2.2 RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel corso di uno studio per la somministrazione buccale del ROP, svolto presso i laboratori del Dipartimento STEBICEF dell'Università di Palermo, sono stati valutati i principali fattori limitanti nello sviluppo di un dispositivo per il rilascio buccale: la stabilità del principio attivo nelle condizioni fisiologiche della cavità orale e la sua attitudine ad attraversare la barriera mucosale (De Caro V. *et al.*, 2012).

I dati ottenuti nello studio hanno dimostrato che il ROP:

- ▲ è stabile nelle condizioni ambientali del cavo orale,
- ▲ attraversa l'epitelio buccale mediante un meccanismo di diffusione passiva.

In particolare, la somministrazione di una soluzione contenente 10 mg/mL di ROP sulla mucosa buccale consente di raggiungere livelli plasmatici efficaci di farmaco già dopo 3 ore dalla somministrazione pur mostrando un *lag time* di circa 120 min; un aumento della concentrazione della soluzione donatrice, determina una riduzione del *lag time* di 30 min; tuttavia, per concentrazioni superiori a 30 mg/mL, non si osservano variazioni, in termini di velocità di assorbimento, per l'instaurarsi di un fenomeno di saturazione della membrana mucosale. L'impiego del Limonene nonché l'applicazione di un campo elettrico iontoforetico favoriscono tale passaggio, in termini sia di velocità di assorbimento sia di riduzione del *lag time*.

Come noto, il Requip[®] (Ropinirolo PR), somministrato alla dose di 8 mg/die raggiunge le concentrazioni minime efficaci dopo 6 h dalla somministrazione della prima dose e le condizioni di *steady state* plasmatico dopo due giorni.

In base a tali considerazioni è stato possibile affermare che la via buccale consente una netta riduzione dei tempi necessari al raggiungimento della concentrazione minima efficace e delle condizioni di *steady state* plasmatici, un aumento della biodisponibilità del ROP legato all'evidente riduzione del first pass effect, che si traduce in una netta riduzione della dose somministrata (De Caro V. *et al.*, 2012).

Basandosi sui risultati sulla permeabilità mucosale delle soluzioni di ROP ottenuti, questo lavoro di ricerca è stato volto verso lo sviluppo di un sistema non convenzionale mucoadesivo per il rilascio prolungato del farmaco da applicare sulla mucosa buccale.

In questo lavoro, il sistema matriciale è stato realizzato impiegando, quali supporti polimerici, l'Eudragit RS 100[®] ed RL 100[®]. Eudragit[®] è il marchio per una vasta gamma di copolimeri a base di polimetacrilato. Esso comprende copolimeri anionici, cationici e neutri a base di acido metacrilico, esteri metacrilici ed acrilici o loro derivati. Gli Eudragit sono non biodegradabili, non assorbibili, e non tossici. Essi possono costituire lo strato contenente il farmaco o come parte integrante del *rate controlling*. Inoltre è stato descritto l'utilizzo degli Eudragit[®] come materiale muco-adesivo. In particolare gli Eudragit RS ed RL sono polimetacrilati aventi un gruppo ammonico quaternario. La presenza di questi gruppi cationici rende la formulazione permeabile all'acqua, con conseguente rigonfiamento delle matrici polimeriche (Morales J. O. *et al.*, 2013).

L'Eudragit RL 100[®] differisce dall'RS 100[®] per l'elevato numero di gruppi ammonici quaternari. L'Eudragit RL 100[®] risulta liberamente permeabile all'acqua; al contrario l'Eudragit RS 100[®] risulta poco permeabile. In entrambi i casi il rilascio del farmaco è pH indipendente.

Questi polimeri trovano il loro principale impiego nel rivestimento di forme di dosaggio solide, quali compresse, capsule, granuli, sistemi matriciali e compresse a rilascio controllato.

Nella preparazione delle matrici è stata impiegata anche una piccola percentuale di Polivinilpirrolidone (PVP), una delle molecole più versatili e ampiamente utilizzate nell'industria farmaceutica. Tale polimero è comunemente impiegato per la sintesi dei film polimerici, da solo o in combinazione con altre molecole, al fine di migliorarne l'idrofilia; inoltre, è in grado di stabilizzare i farmaci nelle pellicole polimeriche inducendone un rilascio locale e controllato. Grazie alle sue capacità di formare legami addizionali con le mucine (mucoadesione) e per la sua elevata inerzia dal punto di vista chimico e biologico, il PVP è stato utilizzato anche per garantire e prolungare un intimo contatto con la mucosa buccale (Sfondrini M.F. *et al.*, 2011).

Sono state preparate quattro diverse matrici con differenti rapporti farmaco/polimeri al fine di valutare come differenti percentuali dei due polimeri siano in grado di modificare le proprietà mucoadesive ed il rilascio del farmaco delle formulazioni.

Le matrici solide sono state realizzate con il metodo dell'evaporazione del solvente, e il sistema terapeutico finale è costituito da compresse, ottenute per compressione diretta della matrice polverizzata.

Al fine di prevenire la perdita di farmaco nel cavo orale, è stato realizzato un sottile strato impermeabilizzante su una delle due facce della compressa mediante l'aggiunta di acido stearico.

Per valutare le proprietà di rigonfiamento e mucoadesive, le compresse sono state sottoposte a prove di Swelling e test di mucoadesione.

Il grado di rigonfiamento di una formulazione rappresenta la capacità di questa ultima di assorbire acqua dall'ambiente circostante. Tale proprietà non solo gioca un ruolo di fondamentale importanza nel processo di mucoadesione, ma permette di regolare la velocità di liberazione del principio attivo che, a sua volta, influenza la velocità di permeazione del farmaco attraverso la mucosa.

Il test di Swelling è stato condotto per tutte le formulazioni a due diversi tempi (1 e 2 ore).

I risultati sono riportati nella tabella 6

Formulazione	Composizione (%)	Grado di Swelling	
		1h	2h
A	20 ROP; 10 PVP; 70 RL100; 25 ac.stearico	0,430	0,432
B	10 ROP; 10 PVP; 80 RL100; 25 ac.stearico	0,732	0,755
C	20 ROP; 20 PVP; 60 RS100; 25 ac.stearico	0,350	0,350
D	10 ROP; 20 PVP; 70 RS100; 25% ac.stearico	0,26	0,290

Tabella 6. Composizione e grado di swelling delle compresse matriciali testate.

Le formulazioni contenenti Eudragit RL 100[®] mostrano una maggiore attitudine al rigonfiamento; tale risultato è dovuto al maggiore contenuto di gruppi ammonici quaternari nel polimero. Il grado di idratazione e di rigonfiamento è infatti regolato dal controione Cl⁻ che subisce scambio con gli anioni del buffer nel mezzo di dissoluzione. Dopo la prima ora, solo piccole modifiche del grado di rigonfiamento sono state evidenziate, a tutte le percentuali di PVP impiegate.

Le formulazioni contenenti Eudragit RS 100[®] mostrano una minore attitudine al rigonfiamento. Tra la prima e la seconda ora dopo l'applicazione, non si osservano variazioni di rigonfiamento, a tutte le percentuali di PVP impiegate. Il basso grado di rigonfiamento delle compresse suggerisce che la loro applicazione *in vivo* causerebbe minimo disagio al paziente ed un aumento della *compliance*.

L'adesione delle compresse sulla superficie della mucosa orale è un requisito fondamentale nella realizzazione degli *Adhesive Drug Delivery Systems* in quanto consente di mantenere il rilascio del farmaco nel sito di applicazione per un lungo periodo di tempo. La forza di mucoadesione, misurata e calcolata per tutte le formulazioni, è stata riassunta nella seguente:

Formulazione	Composizione (%)	Forza di adesione (N)	Detachment Force (N/m ²)
A	20 ROP; 10 PVP; 70 RL100; 25 ac.stearico	0,27 ± 0,02	1376 ± 12,5
B	10 ROP; 10 PVP; 80 RL100; 25 ac.stearico	0,26 ± 0,02	1327 ± 12,3
C	20 ROP; 20 PVP; 60 RS100; 25 ac.stearico	0,31 ± 0,01	1582 ± 14,4
D	10 ROP; 20 PVP; 70 RS100; 25% ac.stearico	0,30 ± 0,02	1532 ± 11,9

Tabella 7. Forza di adesione e detachment force delle compresse matriciali testate

Dai dati ottenuti è possibile dedurre che la forza di adesione dipende essenzialmente dalla quantità di PVP presente nella formulazione.

Le compresse sono state sottoposte a studi di rilascio *in vitro* utilizzando una cella di flusso descritta nella sezione "Metodi" e secondo la metodica descritta. Il sistema consente di valutare la liberazione del farmaco dalle compresse, in

condizioni paragonabili a quelle che si riscontrano *in vivo*, poichè questo permette di calibrare il flusso di saliva artificiale che incontra e bagna la matrice.

Ad intervalli regolari di tempo sono stati prelevati campioni di soluzione in uscita dal sistema ed analizzati spettrofotometricamente. I dati raccolti in termini di quantità di ROP rilasciata dalle matrici nel tempo sono stati riportati in grafico come mostrato nelle Figure 28 e 29.

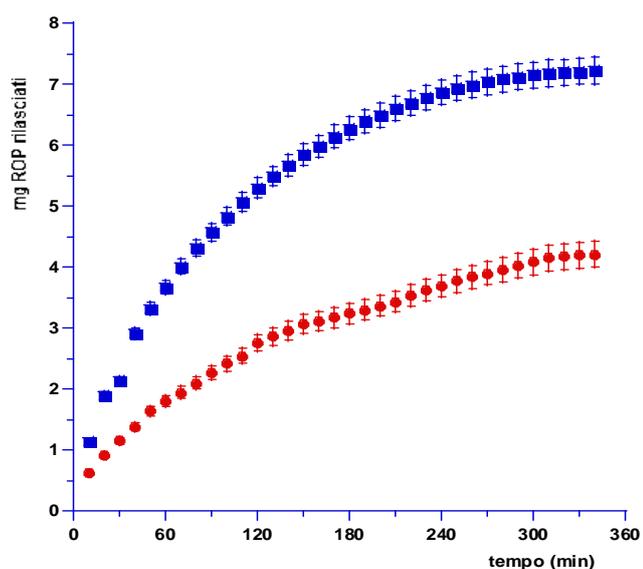


Figura 28. Profilo di rilascio del ROP da: ● formulazione A; ■ formulazione C

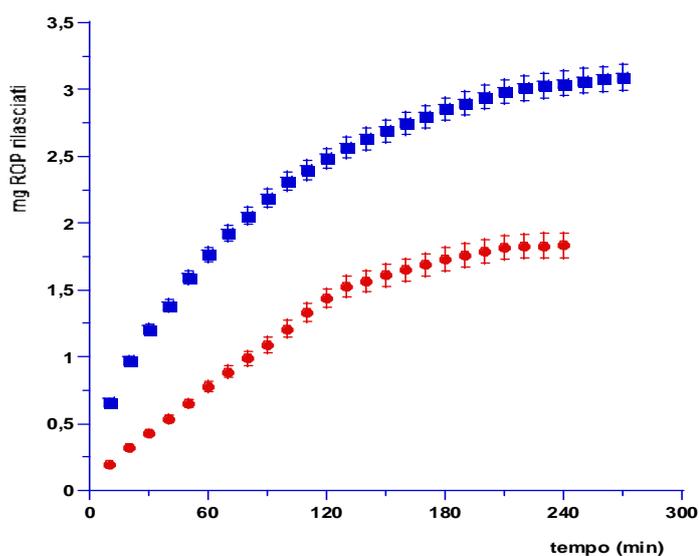


Figura 29. Profilo di rilascio del ROP da: ● formulazione B; ■ formulazione D

Il rilascio di ROP dalle matrici è risultato lento e regolare. È importante notare che le matrici contenenti una minore quantità di farmaco presentano una velocità di rilascio di ROP inferiore. Ciò è probabilmente dovuto alla non saturazione dell'ambiente salivare a contatto con la formulazione.

In particolare, il profilo di rilascio del farmaco dalle matrici contenenti Eudragit RL 100[®] mostrano un andamento di tipo Higuchiano (Figura 30); si osserva, infatti, un andamento lineare quando la quantità di farmaco rilasciata viene riportata in funzione della radice quadrata del tempo (coefficiente di correlazione = 0.997 per la formulazione A ; 0.995 per la formulazione B).

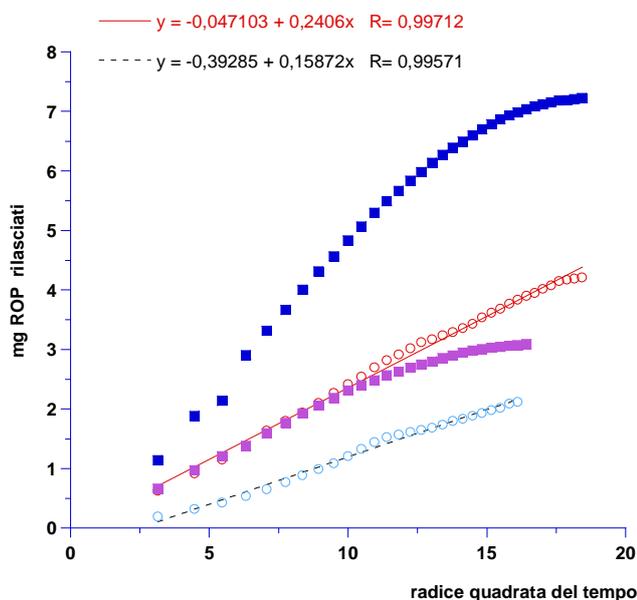


Figura 30. Profilo di rilascio del ROP in funzione della radice quadrata del tempo da: ○ formulazione A; ○ formulazione B; ■ formulazione C; ■ formulazione D

Pertanto è possibile affermare che solo le formulazioni contenenti Eudragit RL 100[®] presentano un profilo di rilascio di tipo prettamente matriciale, mostrando una maggiore capacità di controllo nella diffusione del farmaco dal sistema terapeutico.

Al fine di verificare se la quantità di ROP rilasciata nel tempo dalla forma di dosaggio sia sufficiente a garantire un flusso di farmaco attraverso la mucosa buccale, idoneo a ottenere l'effetto terapeutico, sono stati eseguiti esperimenti di permeazione *ex vivo* attraverso la barriera mucosale, impiegando celle di diffusione verticali tipo Franz. Nel compartimento donatore è stata applicata sul tessuto mucosale porcino la forma di dosaggio con la superficie rivestita rivolta verso l'alto. Al sistema è stato aggiunto un volume di saliva artificiale idoneo a mantenere bagnata la compressa per tutta la durata dell'esperimento.

La valutazione della quantità di Ropinirolo permeata nel compartimento accettore è stata effettuata mediante misure spettrofotometriche UV-VIS, utilizzando l'opportuno bianco e la relativa curva di taratura.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti per circa 6 ore ed i risultati ottenuti sono stati riportati come media di 6 prove.

La quantità di ROP per unità di superficie, permeata attraverso la mucosa buccale, è stata riportata in funzione del tempo (Figura 31).

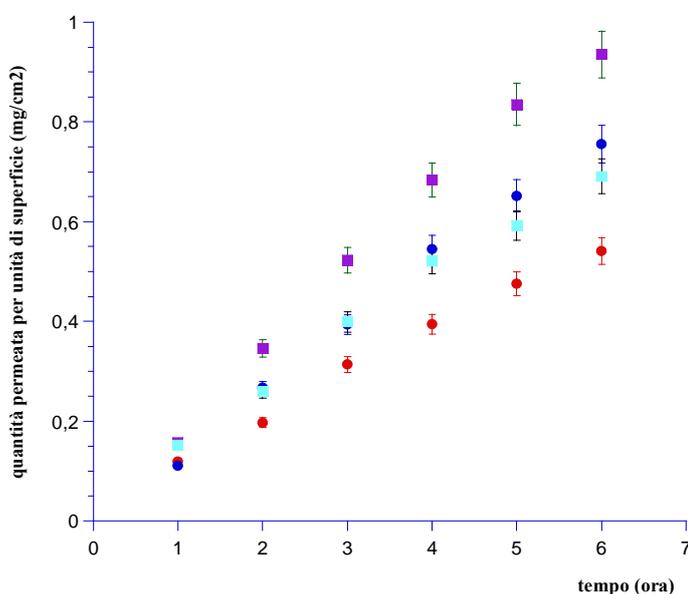


Figura 31. Profilo di permeazione del ROP attraverso la mucosa buccale porcina, utilizzando: ■ formulazione A; ● formulazione B; ■ formulazione C; ● formulazione D

I valori di J_s del ROP, dopo applicazione delle compresse sulla mucosa buccale porcina, sono riportati in Tabella 8.

Formulazione	Composizione (%)	J_s ($\text{mg}/\text{cm}^2\text{h}^{-1}$)	coeff. correlazione
A	20 ROP; 10 PVP; 70 RL100; 25 ac.stearico	0.15756	0.99571
B	10 ROP; 10 PVP; 80 RL100; 25 ac.stearico	0.10899	0.99535
C	20 ROP; 20 PVP; 60 RS100; 25 ac.stearico	0.086368	0.99669
D	10 ROP; 20 PVP; 70 RS100; 25% ac.stearico	0.12928	0.99721

Tabella 8. Valori di J_s del ROP, dopo applicazione delle compresse sulla mucosa buccale porcina

I profili di permeazione del ROP dalle compresse mostrano un andamento lineare durante le prime 5 ore dalla somministrazione.

Il processo di permeazione è risultato unidirezionale ed irreversibile.

I dati sperimentali ottenuti consentono di affermare che la quantità di ROP rilasciata dalle matrici, che attraversa la mucosa buccale e raggiunge il circolo sistemico, è terapeuticamente sufficiente anche per le formulazioni B e D con dose di farmaco dimezzata.

La percentuale di farmaco permeata attraverso la mucosa orale porcina dalle quattro formulazione, dopo 1 h e 6 h, è riportata in Tabella 9.

Formulazione	Composizione (%)	% Rop permeato dopo 1 h	% Rop permeato dopo 6 h
A	20 ROP; 10 PVP; 70 RL100; 25 ac.stearico	1.9750	11.691
B	10 ROP; 10 PVP; 80 RL100; 25 ac.stearico	2.9927	13.532
C	20 ROP; 20 PVP; 60 RS100; 25 ac.stearico	1.9100	8.6383
D	10 ROP; 20 PVP; 70 RS100; 25% ac.stearico	2.7787	18.890

Tabella 9. Percentuale di ROP permeata attraverso la mucosa dopo 1 h e 6 h

Dall'intercetta della tangente alla porzione lineare del profilo di permeazione con l'asse delle x , è stato possibile evincere che per tutte le formulazioni applicate non si assiste al fenomeno del *lag time*.

Al termine di ogni esperimento è stata determinata la quantità di farmaco rimasta intrappolata nella membrana, mediante estrazione in metanolo. I dati indicano che la frazione che si accumula nella membrana varia al variare del tipo di formulazione testata. In particolare i dati sono riportati nella Tabella 10 (media di 6 esperimenti).

Formulazione	Composizione (%)	Rop accumulato (mg)
A	20 ROP; 10 PVP; 70 RL100; 25 ac.stearico	0.94
B	10 ROP; 10 PVP; 80 RL100; 25 ac.stearico	0.77
C	20 ROP; 20 PVP; 60 RS100; 25 ac.stearico	0.42
D	10 ROP; 20 PVP; 70 RS100; 25% ac.stearico	0.65

Tabella 10. Frazione di ROP accumulato in membrana dopo 6 ore.

I dati indicano che nel caso in cui venga utilizzata la formulazione A, il tessuto mucosale potrebbe comportarsi da reservoir del farmaco.

Pur avendo bypassato il problema del *lag time* attraverso l'impiego di compresse matriciali bioadesive, al fine di promuovere ulteriormente la velocità di permeazione del ROP attraverso la mucosa buccale, sono stati condotti esperimenti di permeazione in presenza di un promotore di assorbimento chimico.

Sulla parte non impermeabilizzata della compressa sono stati quindi aggiunti 2 μ l di limonene, prima di effettuare gli studi di permeazione.

La quantità di ROP per unità di superficie, permeata attraverso la mucosa buccale, è stata riportata in funzione del tempo (Figura 32).

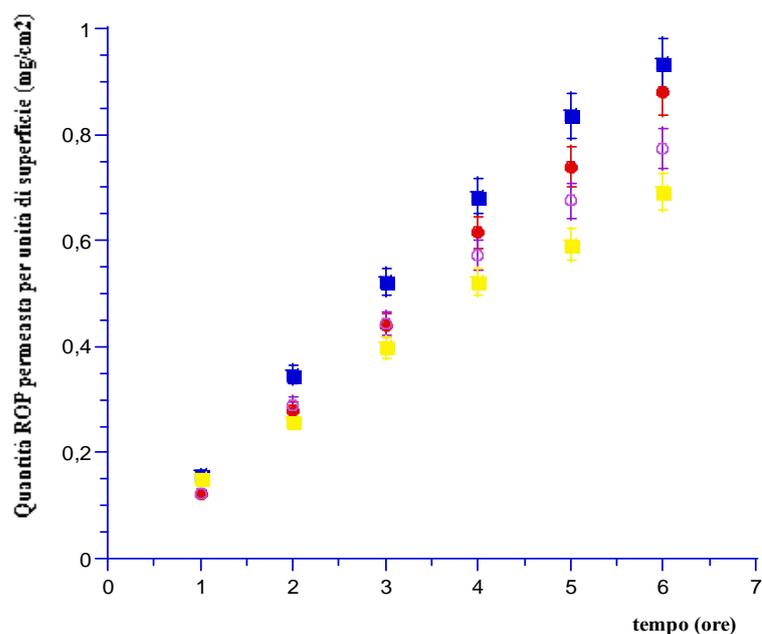


Figura 32. Profilo di permeazione del ROP attraverso la mucosa buccale porcina, utilizzando: ■ formulazione A; ● formulazione A con 2 μ Limonene; ■ formulazione C con 2 μ Limonene ; ○ formulazione C

L'impiego dell'enhancer chimico, non ha prodotto gli effetti attesi. L'enhancer, infatti, è risultato poco influente sulla velocità di assorbimento del ROP attraverso la mucosa buccale. Esso potrebbe comunque essere inserito nel sistema matriciale al fine di migliorare le caratteristiche organolettiche della formulazione e, quindi, la *compliance* del paziente.

3.3 PARTE SPERIMENTALE DELL'APPROCCIO TECNOLOGICO

3.3.1 Materiali e strumenti

La L-3,4-Diidrossifenilalanina metil estere cloridrato (LDME), la L-3,4-Diidrossifenilalanina (L-DOPA) ed il Tween 80 sono stati acquistati presso la Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Il Ropinirolo cloridrato è stato acquistato presso la ditta Zhejiang Hengdian (Hangzhou, China), il Limonene ed il Polivinilpirrolidone (PVP) presso la ditta Aldrich (Stenheim, Germania), l'acido stearico presso la ditta Polichimica (Bologna). L'Eudragit RS 100 ed RL 100 sono stati gentilmente forniti dalla ditta Rofarma (Milano, Italia).

La soluzione isotonica (pH 7.0) è stata preparata solubilizzando 9.0 g di NaCl in 1 L di acqua distillata.

Il tampone citrato pH 5.8 è stato preparato usando acido citrico (1.77 g) e sodio citrato (12.22 g) in 1 L di acqua distillata.

Il tampone citrato pH 6.0 è stato preparato usando acido citrico (1.36) e sodio citrato (12.8) in 1 L di acqua distillata.

Il tampone citrato pH 6.2 è stato preparato usando acido citrico (0.95 g) e sodio citrato (13.38 g) in 1 L di acqua distillata.

Il tampone citrato pH 6.5 è stato preparato usando acido citrico (0.538 g) e sodio citrato (13.95 g) in 1 L di acqua distillata.

Il tampone citrato pH 6.8 è stato preparato usando acido citrico (0.29 g) e sodio citrato (14.3 g) in 1 L di acqua distillata.

Il plasma artificiale non enzimatico (pH 7.4) è stato preparato solubilizzando 20.5 g/L di Na₂HPO₄ e 2.80 g/L di KH₂PO₄ in acqua distillata.

La saliva artificiale (pH 6.8) è stata preparata solubilizzando in un litro d'acqua distillata 1,5 g/L di KCl, 1,75 g/L NaHCO₃, 0,5 g/L di KSCN, 0,5 g/L di NaH₂PO₄ H₂O, 1 g/L di Acido lattico in acqua distillata.

I componenti utilizzati per la preparazione delle soluzioni tampone sono stati acquistati presso la ditta Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Per la preparazione delle compresse buccali è stata utilizzata una comprimitrice Perkin-Elmer IR Accessory Hidraulic Press (potenza max 25×10^4 N).

I prodotti chimici ed i solventi sono stati utilizzati senza subire ulteriori purificazioni. I prodotti chimici ed i solventi sono stati utilizzati senza subire ulteriori purificazioni.

La mucosa buccale porcina è stata gentilmente messa a disposizione dal Mattatoio Comunale di Villabate, Palermo.

Gli studi di permeazione sono stati condotti utilizzando celle verticali di tipo Franz. Queste rappresentano un modello a due compartimenti aperti, così costituiti:

- un compartimento donatore, contenente la soluzione di farmaco in un opportuna soluzione tampone;
- la membrana mucosale che separa il compartimento donatore da quello accettore;
- un compartimento accettore, contenente una opportuna soluzione tampone;
- un agitatore magnetico, posto nel compartimento accettore;
- una camicia per la termostatazione;
- un braccio laterale per il prelievo dei campioni da analizzare.

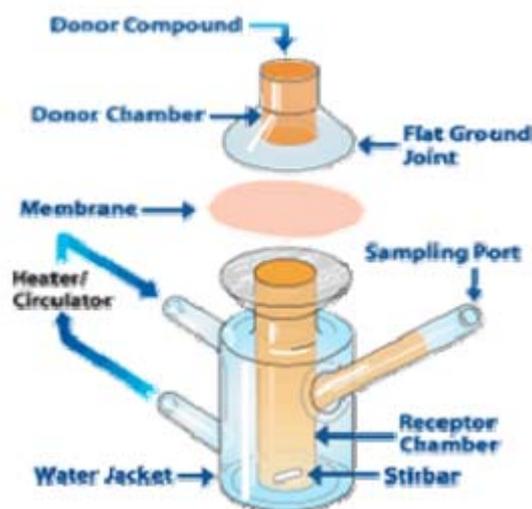


Figura 33. Schema della cella di diffusione verticale tipo Franz

Per gli studi di permeazione della LDME sono state impiegate celle verticali di Franz aventi le seguenti caratteristiche: diametro foro 7 mm, volume compartimento accettore 26 ml (SES GmbH - Analysesysteme, Bechenheim, Germany).

Per gli studi di permeazione della LDME sono state impiegate celle verticali di Franz aventi le seguenti caratteristiche: diametro foro 9 mm, volume compartimento accettore 15 ml (SES GmbH - Analysesysteme, Bechenheim, Germany).

La temperatura e l'agitazione, nelle prove di permeazione *ex vivo*, sono state regolate utilizzando un sistema costituito da una piastra agitante e riscaldante (Heidolph MR 3001 K, Germany) munita di una sonda termostatica (Heidolph EKT 3001, Germany). Per i prelievi sono state usate microsiringhe Hamilton Bonaduz Schweiz.

Le analisi spettrofotometriche dei campioni di ROP sono state condotte con uno spettrofotometro UV-Vis Shimadzu, mod. PharmaSpec 1700, utilizzando l'opportuno bianco e le relative curve di taratura ($\lambda_{\max} = 249.60$ nm, E1% = 0.295984 in plasma artificiale, range di concentrazione 0.003-0.1 mg/mL; $\lambda_{\max} = 250$ nm, E1% = 0.304 in saliva artificiale pH 6.8, range di concentrazione 0.025-0.5 mg/mL; $\lambda_{\max} = 250$ nm, E1% = 0.346 in metanolo, range di concentrazione 0.03-0.6 mg/mL).

Le analisi HPLC dei campioni di LDME ed L-DOPA sono state condotte con uno strumento Agilent dotato di una pompa quaternaria (G1311B) Agilent 1260 Infinity, un detector UV 1260 VL Infinity, un iniettore di 20 μ l e un programma informatico integrato (OpenLAB CDS ChemStation Workstation). I solventi di grado HPLC sono stati acquistati presso la ditta Baker (Milano, Italia). La separazione cromatografica è stata condotta utilizzando una Colonna a fase inversa Phenomenex Gemini-NX, (5 μ m, 15 cm x 4.6 mm), una fase mobile composta da soluzione acquosa di TFA 0.01% e acetonitrile (95:5 v/v) in condizione isocratica. Il flusso è stato impostato a 1 ml/min e la lunghezza d'onda della lampada UV a 280 nm. In queste condizioni il tempo di ritenzione (Tr) dei farmaci sono rispettivamente: L-DOPA 1,98 min e LDME 2,90 min.

La determinazione quantitativa delle aree sottese ai picchi cromatografici è stata effettuata utilizzando soluzioni standard. Le curve di calibrazione sono state eseguite in un range di concentrazione di 0.001 – 1 mg/mL (LOD 0.0001).

3.3.2 Metodi per gli studi sull'LDME

3.3.2.1 Stabilità chimica della LDME in soluzione acquosa

La stabilità chimica della *LDME* è stata valutata mediante l'analisi di diverse soluzioni del farmaco in:

- Plasma artificiale pH 7.4,
- Saliva artificiale pH 6.8,
- Soluzione tampone citrato pH 6.5,
- Soluzione tampone citrato pH 6.2,
- Soluzione tampone citrato pH 6.0,
- Soluzione tampone citrato pH 5.8,
- Soluzione tampone citrato pH 6.2 al 2% di Tween80.

Tutte le soluzioni di farmaco sono state preparate ad una concentrazione di 1 e/o 50 mg/ml. La stabilità chimica è stata valutata ad una temperatura di 37 ± 0.5 °C.

Al fine di valutare sia l'integrità del legame estereo che la formazione di possibili composti di degradazione, ogni 60 min, campioni (25 µl) sono stati prelevati ed immediatamente analizzati mediante HPLC, come sopra descritto. Ogni esperimento è stato condotto per 6 ore ed è stato ripetuto 3 volte.

3.3.2.2 Stabilità enzimatica della LDME

La stabilità enzimatica di *LDME* è stata studiata a 37 ± 0.5 °C ponendo la soluzione dei farmaci a contatto con la mucosa buccale porcina. In particolare gli esperimenti sono stati avviati distribuendo sulla superficie della mucosa buccale (area 0.38465 cm²) le seguenti soluzioni:

- soluzione in tampone citrato pH 5.8 di *LDME* (50mg/ml)
- soluzione in tampone citrato pH 5.8 di *LDME* (1 mg/ml)

- soluzione in tampone citrato pH 6.2 di LDME (50 mg/ml)
- soluzione in tampone citrato pH 6.2 di LDME (1mg/ml)
- soluzione in tampone citrato pH 6.2 al 2 % di Tween 80 di LDME (1 mg/ml)

Per valutare la stabilità enzimatica dei composti, ogni 60 min, campioni (25 µl) sono stati prelevati ed immediatamente analizzati mediante HPLC, come sopra descritto. Ogni esperimento è stato condotto per 6 ore ed è stato ripetuto 3 volte.

3.3.2.3 Preparazione della mucosa buccale porcina per gli esperimenti di permeazione

I campioni di mucosa buccale porcina, prelevati subito dopo il sacrificio di maiali domestici dell'età media di 12 mesi, sono stati ricavati dal tessuto rimosso dall'area vestibolare del trigone retro molare. In seguito, sono stati trasferiti in contenitori refrigerati presso i laboratori del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) entro 1 h. Prima dell'uso, i campioni di mucosa sono stati sottoposti a separazione dell'epitelio mucosale dal tessuto adiposo e dal connettivo submucosale, mediante shock termico. La separazione dell'epitelio è stata realizzata ponendo il campione in soluzione isotonica, alla temperatura di 60°C, per circa 2 minuti, ottenendo così porzioni mucosali aventi spessore pari a $250 \pm 25 \mu\text{m}$. (Diaz Del Consuelo I. et al., 2005). Il trattamento a caldo non comporta alcuna modificazione della permeabilità ed integrità della mucosa orale (De Caro V. et al., 2012).

3.3.2.4 Test di permeazione ex vivo attraverso mucosa buccale

Per la valutazione della permeabilità *ex vivo* della LDME, della L-DOPA attraverso la mucosa buccale porcina è stata utilizzata una cella di diffusione verticale tipo Franz, diametro foro 7 mm, volume compartimento accettore 26 ml (SES GmbH - Analysesysteme, Bechenheim, Germany).

Il campione mucosale, immediatamente dopo la sua asportazione, è stato interposto tra il compartimento donatore e quello accettore. Entrambi i

compartimenti sono stati precedentemente riempiti con soluzione tampone adeguata al valore di pH da testare (5.8 o 6.2), e sono stati lasciati condizionare per 15 minuti a 37°C. In seguito, dal compartimento donatore è stata rimossa la soluzione tampone ed è stato introdotto LDME o L-DOPA disciolto in 1 mL di soluzione tampone. In particolare, lo studio di permeazione dei due farmaci attraverso la mucosa buccale porcina, ha previsto l'impiego, come fase donatrice, di:

- soluzione in tampone citrato pH 5.8 di LDME (50mg/ml)
- soluzione in tampone citrato pH 6.2 di LDME (50mg/ml)
- soluzione in tampone citrato pH 5.8 di L-DOPA (1.5 mg/ml)
- soluzione in tampone citrato pH 6.2 di L-DOPA (1.5 mg/ml)
- soluzione in tampone citrato pH 6.2 al 2% di Tween 80 di LDME (50mg/ml)
- soluzione in tampone citrato pH 6.2 al 2% di Tween 80 di L-DOPA (1.5 mg/ml)

Gli esperimenti sono stati condotti a $37.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$, per 6 h, per mimare le condizioni *in vivo*. Ad intervalli regolari di tempo, attraverso il braccio laterale della cella, sono stati prelevati dal compartimento accettore campioni da 0.5 mL. Per mantenere le condizioni "sink" del sistema, i volumi prelevati sono stati sostituiti con un identico volume di fluido accettore fresco. La quantità di LDME permeata attraverso la mucosa buccale è stata valutata mediante analisi HPLC. I risultati sono riportati come media di 6 esperimenti diversi, in cui sono stati utilizzati frazioni della stessa porzione di tessuto ($P < 0.05$). L'integrità del tessuto mucosale è stato monitorato alla fine di ogni esperimento, secondo il metodo riportato precedentemente (De Caro V. *et al.*, 2008.)

3.3.2.5 Analisi dei dati

Il valore del flusso (J_s) attraverso la membrane è stato calcolato allo *steady state* per unità di area utilizzando l'analisi *della regressione lineare* dei dati di permeazione attraverso la relazione

$$J_s = Q/At \text{ (mg/cm}^2\text{h)}$$

dove Q è la quantità di LDME che attraversa la mucosa e raggiunge il compartimento accettore, A è l'area della sezione attiva disponibile per la diffusione ($0,38465\text{cm}^2$) e t è il tempo di esposizione (h).

3.3.3 Metodi per gli studi sul Ropinirolo

3.3.3.1 Preparazione delle matrici di Ropinirolo

Le matrici contenenti Ropinirolo sono state preparate utilizzando il metodo dell'evaporazione del solvente. Sono state preparate quattro diverse matrici con differenti rapporti di farmaco/miscela polimerica. Le quantità dei singoli componenti, utilizzate per ottenere 100 mg di matrice, sono riportate nelle tabelle 11 e 12.

	Eudragit RS 100 (mg)	PVP (mg)	ROP (mg)
MATRICE A	60	20	20
MATRICE B	70	20	10

Tabella 11. Composizione delle matrici polimeriche contenenti Eudragit RS 100

	Eudragit RL 100 (mg)	PVP (mg)	ROP (mg)
MATRICE C	70	10	20
MATRICE D	80	10	10

Tabella 12. Composizione delle matrici polimeriche contenenti Eudragit RL 100

Il Ropinirolo è stato posto in un mortaio di porcellana e ad esso sono stati aggiunti progressivamente metanolo (15 ml), PVP e polimero. Dopo solubilizzazione completa del polimero, la miscela è stata concentrata sotto

continua agitazione e posta in essiccatore fino a completa evaporazione del solvente. La matrice solida ottenuta è stata frantumata, polverizzata ed essiccata a temperatura ambiente per 24 h.

La determinazione quantitativa del farmaco nella matrice è stata effettuata nel modo seguente: 2,5 mg di matrice, esattamente pesati, sono stati trasferiti in un matraccio tarato da 10 ml e solubilizzati in metanolo. Il contenuto in ROP è stato determinato spettrofotometricamente, utilizzando l'opportuno bianco e la relativa curva di taratura ($\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$, $E1\% = 0.346$ in metanolo). Alle concentrazioni utilizzate, il PVP, l'Eudragit RS 100 ed RL 100 in soluzione non interferiscono con l'assorbimento UV del ROP. La percentuale di farmaco contenuta nella matrice è risultata pari al $90\% \pm 0,2$ (media di 6 lotti).

3.3.3.2 Preparazione delle compresse matriciali cariche di Ropirinolo

Lotti di compresse matriciali sono stati ottenuti mediante compressione diretta della matrice contenente ROP. La matrice è stata introdotta nella comprimitrice e sottoposta ad una pressione di 10 tonnellate per 30 secondi. Le compresse così ottenute ($40 \pm 0,2 \text{ mg}$; media di 6 lotti) sono state ricoperte con acido stearico (10 mg) e sottoposte ad un secondo processo di compressione, al fine di ottenere un sottile strato impermeabilizzante su una delle due facce della compressa. Le compresse finali ($50 \pm 0,2 \text{ mg}$; media di 6 lotti) sono risultate uniformi e compatte e mostrano una superficie di $0.19625 \pm 0,00008 \text{ cm}^2$ (media di 6 lotti) e un diametro 0.25 cm.

3.3.3.3 Test di swelling delle compresse matriciali cariche di Ropirinolo

I test di swelling delle compresse sono stati effettuati valutando l'indice di rigonfiamento. Un campione di compresse, posto su un vetrino con la faccia impermeabilizzata rivolta verso l'alto, viene bagnato con 0.1 ml di saliva artificiale pH 6.8. Dopo 1 e 2 ore rispettivamente, è stato aspirato l'eccesso di saliva e misurato l'indice di Swelling mediante l'equazione:

Grado di Swelling = (peso umido - peso secco originale)/peso secco originale
(Mohamed S. *et al.* 2012)

L'eccesso di saliva, dopo aspirazione, è stato diluito in 1 ml di saliva artificiale ed il contenuto in farmaco è stato determinato quantitativamente mediante analisi spettrofotometrica UV, utilizzando l'opportuno bianco e la relativa curva di taratura ($\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$, $E1\% = 0.304$ in saliva artificiale pH 6.8; range di concentrazione 0.025-0.5 mg/mL).

3.3.3.4 Test di mucoadesione in vitro delle compresse matriciali cariche di Ropirinolo

La forza mucoadesiva della compressa è stata misurata su tre compresse matriciali rappresentative di ciascun lotto di preparazione, utilizzando una bilancia analitica modificata (Figura 34) secondo il metodo descritto in letteratura (Mohamed S. *et al.* 2012).

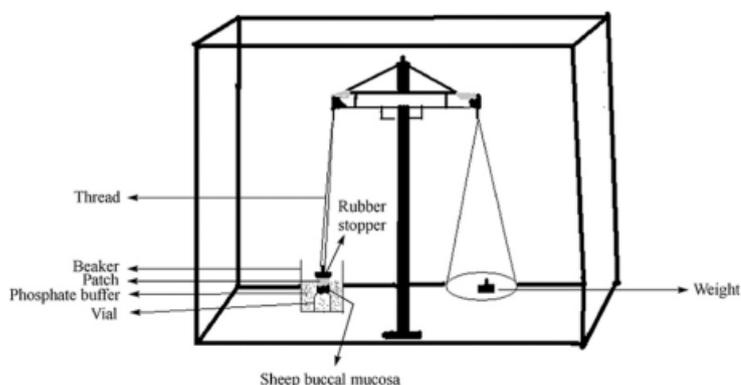


Figura 34. Schema bilancia fisica usata per misurare la forza di mucoadesione

Una porzione di mucosa buccale porcina, condizionata per 30' a 38 °C in saliva artificiale, viene posta in una capsula di Petri contenente una quantità di saliva artificiale (pH 6.8, preriscaldata a 38 °C) sufficiente a mantenere costantemente bagnata la superficie del tessuto mucosale per tutto il periodo dell'esperimento. Le

compresse matriciali (non rivestite) sono state fissate con colla sul lato inferiore di un tappo di gomma e poste a contatto con la superficie della mucosa. La forza adesiva espressa come massa (g) necessaria per distaccare le compresse dalla superficie della mucosa è stata calcolata secondo l'equazione:

$$\text{Forza adesiva (N): } (g * 9.81)/1000$$

3.3.3.5 Rilascio in vitro del Ropinirolo dalle compresse matriciali

Le prove di liberazione del farmaco dalle compresse matriciali sono state condotte utilizzando il sistema schematizzato in Figura 35 e una opportuna cella di flusso. Il sistema è costituito da un compartimento, contenente saliva artificiale (100 mL), dal quale il liquido viene forzato a raggiungere la cella (camera cilindrica di altezza 1.6 mm e diametro 1.16 cm), all'interno della quale è posta la compressa in esame; la superficie impermeabilizzata è rivolta verso l'ingresso del fluido salivare. Il flusso di saliva è stato fissato a 0.01 mL/min, mediante regolazione di una pompa peristaltica (Biorad economo pump, USA) annessa al sistema, ed è stato mantenuto costante durante tutta la durata dell'esperimento. All'interno della cella, il film di saliva che bagna la compressa ha all'incirca uno spessore di 0.1 mm. La temperatura è stata mantenuta costante ($37 \pm 0.2^\circ\text{C}$), immergendo la cella ed il compartimento contenente saliva artificiale in un bagno termostato.

Frazioni di 2 ml di fluido accettore sono state raccolte ed il contenuto in farmaco è stato determinato quantitativamente mediante analisi spettrofotometrica UV, utilizzando l'opportuno bianco e la relativa curva di taratura ($\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$, $E1\% = 0.304$ in saliva artificiale pH 6.8; range di concentrazione 0.025-0.5 mg/mL). Alle concentrazioni utilizzate, i componenti della soluzione tampone non interferiscono con l'assorbimento UV del ROP.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti per circa 6 ore ed i risultati ottenuti sono stati riportati come media di 5 prove.

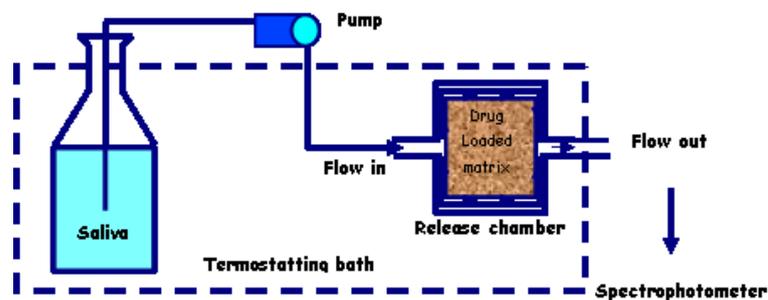


Figura 35. Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per la determinazione della liberazione di farmaco dalle compresse matriciali

Per ogni campione testato è stata determinata la quantità di farmaco residuo nelle compresse sottoposte alle prove di rilascio. La somma di tale quantità e di quella rilasciata durante gli esperimenti è risultata pari al contenuto di farmaco iniziale nelle matrici ($\pm 2\%$).

La quantità di ROP rilasciata dalle compresse è stata riportata su grafico in funzione del tempo.

3.3.3.6 Preparazione della mucosa buccale porcina per gli esperimenti di permeazione

I campioni di mucosa buccale porcina, prelevati subito dopo il sacrificio di maiali domestici dell'età media di 12 mesi, sono stati ricavati dal tessuto rimosso dall'area vestibolare del trigone retro molare. In seguito, sono stati trasferiti in contenitori refrigerati presso i laboratori del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) entro 1 h. Prima dell'uso, i campioni di mucosa sono stati sottoposti a separazione dell'epitelio mucosale dal tessuto adiposo e dal connettivo submucosale, mediante shock termico. La separazione dell'epitelio è stata realizzata ponendo il campione in soluzione isotonica, alla temperatura di 60°C , per circa 2 minuti, ottenendo così porzioni mucosali aventi spessore pari a $250 \pm 25 \mu\text{m}$. (Diaz Del Consuelo I. et al., 2005). Il trattamento a caldo non comporta alcuna modificazione della permeabilità ed integrità della mucosa orale (De Caro V. et al., 2012).

3.3.3.7 Test di permeazione ex vivo di Ropinirolo dopo somministrazione di compresse matriciali

Gli esperimenti di permeazione del Ropinirolo dopo somministrazione di compresse matriciali sono stati condotti utilizzando una cella di diffusione verticale tipo Franz (diametro foro 9 mm, volume compartimento accettore 15 ml, SES GmbH - Analysesysteme, Bechenheim, Germany). In questo caso l'epitelio mucosale, dopo la sua asportazione è stato sottoposto a condizionamento in soluzione isotonica, a temperatura ambiente, per 24 h.

Sul tessuto *ex vivo* è stata quindi applicata una compressa matriciale, ponendo sulla mucosa la superficie non rivestita e aggiungendo un volume di saliva artificiale (pH 6.8) sufficiente a bagnare la stessa (0,1 mL). Il compartimento accettore è stato riempito con 15 mL di plasma artificiale non enzimatico (pH 7.4).

La quantità di ROP permeata attraverso la mucosa buccale per unità di superficie, è stata riportata in funzione del tempo come media di 7 esperimenti.

La quantità di farmaco permeata è stata valutata mediante analisi spettrofotometrica UV, utilizzando l'opportuno bianco e la relativa curva di taratura ($\lambda_{\max} = 249.60$ nm, $E1\% = 0.295984$ in plasma artificiale; range di concentrazione 0.003-0.1 mg/mL).

3.3.3.8 Permeazione ex vivo di Ropinirolo dopo somministrazione di compresse matriciali mediante co-somministrazione di enhancers chimici

Gli esperimenti di permeazione sono stati condotti come descritto nel precedente paragrafo. In questo caso, sulla faccia non impermeabilizzata della compressa bioadesiva è stata aggiunta una opportuna quantità di promotore di assorbimento (enhancer) chimico, prima di posizionarla nel compartimento donatore.

Come enhancers chimico è stato applicato il limonane (2 μ l) che non possiede un significativo assorbimento UV che possa interferire con le successive determinazioni quantitative del ROP.

3.3.3.9 Analisi dei dati

Il valore del flusso (J_s) attraverso la membrana è stato calcolato allo *steady state* per unità di area utilizzando l'analisi *della regressione lineare* dei dati di permeazione attraverso la relazione

$$J_s = Q/At \text{ (mg/cm}^2\text{h)}$$

dove Q è la quantità di LDME che attraversa la mucosa e raggiunge il compartimento accettore, A è l'area della sezione attiva disponibile per la diffusione ($0,6358 \text{ cm}^2$) e t è il tempo di esposizione (h).

3.3.2.10 Estrazione del ROP dalla mucosa buccale porcina

Al termine di ogni esperimento di permeazione, al fine di determinare la quantità di ROP, eventualmente intrappolato nel tessuto mucosale, è stata effettuata l'estrazione del farmaco dal campione.

La mucosa, prelevata alla fine di ogni esperimento, è stata lavata con plasma artificiale fresco, per eliminare gli eventuali residui di ROP decantati sulla superficie della mucosa. In seguito, la mucosa è stata posta in metanolo, alla temperatura di 50°C per 5 minuti.

La quantità di farmaco estratta è stata valutata mediante analisi spettrofotometrica UV, utilizzando l'opportuno bianco e la relativa curva di taratura ($\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$, $E1\% = 0.346$ in metanolo).

4. APPROCCIO SINTETICO AL MIGLIORAMENTO DELLA BIODISPONIBILITA' DI FARMACI PER IL PD

4.1. Premessa

Tre sono gli obiettivi che si possono raggiungere con la progettazione razionale di un profarmaco: (Rautio J. *et al.* 2008) (Huttunen K. M. *et al.* 2011)

1. Farmaceutico: migliorare la solubilità in acqua o nei lipidi di membrana, migliorare la stabilità chimica; diminuire l'irritazione e/o il dolore dopo la somministrazione locale; mascherare odore e/o sapore sgradevoli; ridurre i problemi connessi con la formulazione della forma di dosaggio contenente il principio attivo.
2. Farmacocinetico: migliorare l'assorbimento (orale e non); diminuire il metabolismo pre-sistemico; aumentare la distribuzione selettiva organo/tessuto del principio attivo.
3. Farmacodinamico: diminuire la tossicità e migliorare l'indice terapeutico.

Per facilitare il trasporto dei farmaci nel SNC, sono state finora utilizzate diverse strategie *prodrug*: (Zawilska J. B. *et al.* 2013), (Vlieghe P., Khrestchatisky M. 2013)

- I. la modifica strutturale del principio attivo allo scopo di aumentare la sua permeabilità nei confronti della BBB per diffusione passiva (la cosiddetta lipidization of molecules);
- II. il potenziamento del trasporto carrier- o recettore-mediato attraverso la BBB: profarmaci con una stretta somiglianza strutturale con i substrati endogeni dei trasportatori di influsso possono essere riconosciuti da questi ed essere trasportati nel cervello.
- III. Il blocco dei sistemi di efflusso attivo del farmaco dal cervello al sangue.

La lipidizzazione di una molecola attiva rappresenta uno degli approcci *prodrug* più utilizzati. Come sopra citato, il trasporto di composti attraverso la via

transcellulare richiede rigorose caratteristiche fisico-chimiche ed è ristretta ad alcune piccole molecole organiche liposolubili.

Per prevedere la capacità di diffusione passiva di una nuova molecola attraverso le barriere fisiologiche, può essere sfruttata la “*regola del cinque*” di Lipinski (Lipinski C. A., 2004; Lipinski C. A. *Et al.*, 2012). Tale regola descrive le caratteristiche che deve possedere una molecola affinché possa superare le barriere biologiche, quali la mucosa gastrointestinale.

Tuttavia quando si vuole predire l’attraversamento della BBB da parte di un farmaco, tale regola subisce delle restrizioni. E’ stato infatti riportato (Vlieghe P., Khrestchatisky M. 2013) che, affinché una molecola possa raggiungere il SNC mediante diffusione passiva, deve possedere i seguenti parametri:

- Peso Molecolare (PM) < 450 Da. Molecole troppo voluminose e pesanti sono difficilmente assimilabili e diffondono con difficoltà;
- Nella struttura molecolare non devono essere presenti più di 3 gruppi donatori di legame ad idrogeno. Troppi ponti idrogeno rendono la molecola eccessivamente polare, impedendone la diffusione;
- Nella struttura molecolare non devono essere presenti più di 7 gruppi accettori di legame ad idrogeno (di solito atomi di ossigeno e azoto);
- La molecola deve avere un $\log P < 2,7$ (dove $\log P$ è il logaritmo del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua).
- La molecola deve possedere una *polar surface area*, (PSA) < 70 Å². (La PSA di una molecola è definita come la somma della superficie di tutti gli atomi polari, principalmente ossigeno e azoto, compresi i loro idrogeni legati).

Per le molecole che fuoriescono da più di uno di tali parametri è possibile supporre che esse non siano dei buoni candidati per il delivery nel SNC.

Esiste, inoltre, una correlazione generale tra la velocità con cui una molecola entra nel SNC e il suo **coefficiente di distribuzione apparente** o $D_{pH7.4}$ espresso come $\log D_{pH7.4}$. Tale parametro indica il grado di ripartizione ottanolo/tampone a pH 7,4 del farmaco. A differenza del $\log P$, che si riferisce

esclusivamente alla ripartizione della quota indissociata di una molecola, il $\log D_{pH7.4}$ include sia le specie neutre che quelle ionizzate della molecola presente in soluzione. (Abbott N. J. *et al.* 2010)

Due sono i metodi che possono essere sfruttati per aumentare la lipofilia di un farmaco (Vlieghe P., Khrestchatisky M. 2013):

- (i) la riduzione dei legami H attraverso la coniugazione di gruppi lipofili ai gruppi funzionali polari del farmaco;
- (ii) la coniugazione del farmaco ad un opportuno “mezzo di trasporto temporaneo” o *carrier* lipidico.

Quest'ultimo metodo consiste nella coniugazione temporanea del farmaco ad uno specifico *carrier* attraverso un legame covalente bioreversibile. Il profarmaco, in virtù delle sue caratteristiche chimico-fisiche, penetra attraverso la BBB, raggiunge il SNC, e subisce biotrasformazione, rilasciando il *parent drug* ed il *carrier* (Figura 36). (Vlieghe P., Khrestchatisky M. 2013)

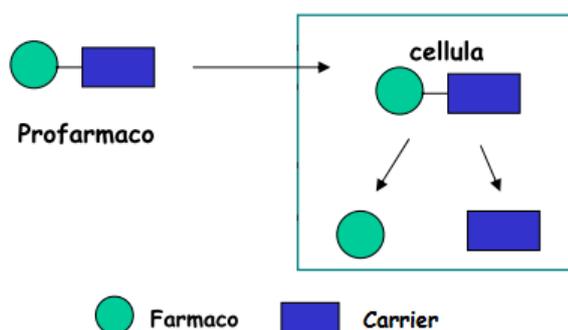


Figura 36. Schema di funzionamento del profarmaco

Per la realizzazione di tali profarmaci si deve inizialmente identificare un enzima specifico che sia presente solo, o in prevalenza, nel sito in cui si vuole indirizzare il farmaco e, di conseguenza, sintetizzare un profarmaco dove tra il “*parent drug*” ed il carrier, ci sia un legame scindibile da quell'enzima.

I legami esterei ed ammidici sono i maggiormente suscettibili all'idrolisi enzimatica *in vivo*. Le ammidi, rispetto agli esteri, hanno il vantaggio di essere meno sensibili all'idrolisi, a causa della minore diffusione delle amidasi nell'organismo umano. Ciò può far aumentare il tempo necessario al ripristino del

farmaco padre e quindi favorire l'arrivo di una maggiore quantità di principio attivo al sito bersaglio. (Stanczak A., Ferra A., 2006)

Per incrementare il grado di lipofilia di un farmaco contenente funzioni amminiche, si può, quindi, derivatizzare queste funzioni in ammidi tramite la coniugazione con acidi carbossilici; esse saranno poi facilmente ripristinate *in vivo* grazie alla presenza nell'organismo delle amidasi (Figura 37).

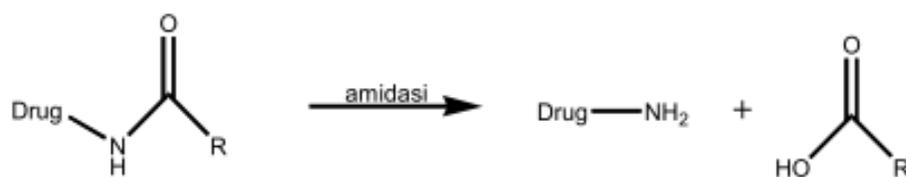


Figura 37.

E' importante però sottolineare che la lipidizzazione delle molecole può generare anche a degli inconvenienti: se da un lato l'aumento della lipofilia può incrementare la velocità di trasporto attraverso la BBB, dall'altro, essa spesso comporta un maggiore legame alle proteine plasmatiche e, di conseguenza, una riduzione della concentrazione di farmaco libero nel sangue capace di attraversare le BCECs. Come risultato, una sostanza con elevata lipofilia può essere sequestrata dal letto capillare e non raggiungere il suo bersaglio (Banks W. A., 2009). Inoltre, la maggiore lipofilia della molecola tende anche a favorirne la distribuzione nei tessuti periferici, causando accumulo e riducendo, a sua volta, la concentrazione del farmaco nel sangue. (Rasheed A. *et al.*, 2010)

Per di più, la modificazione chimica del farmaco padre porta inevitabilmente ad un incremento del peso molecolare del profarmaco. Qualunque incremento del PM oltre 400 Da può avere degli effetti negativi sulla penetrazione nel CNS.

Nella progettazione di una nuova molecola che deve, prima, superare la BBB, e poi accedere al parenchima cerebrale diviene critico il bilancio tra l'ottimizzazione delle proprietà chimico-fisiche del farmaco candidato, da un lato, ed il suo profilo farmacocinetico, dall'altro. Per tutte queste ragioni, è estremamente difficile progettare piccole molecole che siano capaci di superare la BBB e che abbiano: attività farmacologica, accettabili proprietà di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione/eliminazione, e profili favorevoli

farmacocinetici e farmacodinamici. Questo spiega perchè molti potenziali farmaci per il SNC, quando vengono somministrati *in vivo* per via sistemica, non raggiungono concentrazioni terapeutiche efficaci nel SNC. (Vlieghe P., Khrestchatisky M., 2013).

Risulta evidente che la scelta dell'opportuno gruppo o *carrier* lipidico da utilizzare giochi ruolo determinante. Idealmente, il *carrier* scelto dovrebbe essere non immunogeno, stabile nelle condizioni di somministrazione del profarmaco e, non dovrebbe dare luogo a fenomeni di accumulo.

Per queste ragioni, gli aminoacidi essenziali possono rappresentare una efficace categoria di molecole che ben si presta ad essere utilizzata quali “mezzi di trasporto temporanei”. Infatti, essendo composti “bifunzionali”, possono facilmente formare legami peptidici con molecole attive contenenti gruppi funzionali carbossilici o aminici liberi. A differenza di altri carriers, le molecole aminoacidiche rientrano nei normali cicli metabolici, dopo aver liberato il *parent drug* all'interno del SNC, evitando fenomeni di accumulo e di conseguenza tossicità (Krylov I. S. *et al.*, 2013). Inoltre, i capillari cerebrali, rispetto ai capillari di organi periferici, presentano sistemi di trasporto aventi affinità verso gli aminoacidi neutri. Essendo tali trasportatori bidirezionali, contribuiscono a ridurre la permanenza dell'aminoacido a livello cerebrale qualora la sua presenza risultasse in eccesso.

Sulla base di queste considerazioni i profarmaci aminoacidici potrebbero superare facilmente la BBB, liberando il principio attivo mediante reazione di idrolisi nel sito d'azione. In questo modo, il farmaco, liberatosi dal carrier e non potendo retro-diffondere, rimane intrappolato nel SNC, esplicando la sua azione nel sito di rilascio. Il farmaco attivo, in genere, può essere rilasciato dal carrier prima, durante o, addirittura, dopo l'interazione con il sito bersaglio. (Zawilska J. B. *et al.*, 2013)

Per le ragioni finora esposte, la progettazione di profarmaci aminoacidici può essere sfruttata per la terapia di alcune malattie del SNC.

4.2. Progettazione di due profarmaci della Dopamina: L-Leucine β -(3,4-dihydroxyphenyl) etilamide (DA-Leu) ed L-Tryptophan β -(3,4-dihydroxyphenyl) etilamide (DA-Tryp)

In considerazione dei limiti della terapia convenzionale e dell'impossibilità di somministrare la Dopamina come farmaco, l'interesse è stato rivolto alla progettazione di un nuovo profarmaco della Dopamina in grado di trasportare il neurotrasmettitore all'interno del SNC. A tale scopo, è stata sfruttata la modificazione chimico-strutturale. In particolare, per aumentarne il grado di lipofilia, la Dopamina è stata coniugata ad un carrier aminoacidico attraverso un legame amidico bioreversibile.

In qualità di carrier sono stati selezionati ed impiegati la L-Leucina, un aminoacido essenziale apolare a catena ramificata, e l' L-Triptofano un aminoacido essenziale neutro a nucleo indolico. Quest'ultimo all'interno del S.N.C. viene convertito enzimaticamente a 5-idrossitriptofano e successivamente a serotonina. Recenti studi hanno dimostrato che il PD è associato anche ad una perdita di serotonina, che appare tra le cause responsabili dei tremori; pertanto, si può ipotizzare che l'uso del triptofano come mezzo temporaneo di trasporto possa essere utile nel trattamento del PD (Bart S. *et al.*, 2006).

I nuovi coniugati, aminoacido-dopamina, dovrebbero superare la BBB e liberare il principio attivo per scissione enzimatica all'interno del SNC. Una volta scisso il legame, la L-Leucina e l' L-Triptofano rientrano nei normali cicli metabolici e non dovrebbero dare fenomeni di accumulo e di conseguente tossicità; la Dopamina rilasciata, trovando difficoltà nel retrodiffondere attraverso la BBB, per le sue caratteristiche chimico-fisiche, dovrebbe rimanere intrappolata nel SNC dove può esplicare la sua azione.

La scelta è ricaduta su tali molecole poiché ben si prestano ad una derivatizzazione mediante formazione di un legame amidico con la Dopamina. Inoltre, tali aminoacidi, posseggono le seguenti caratteristiche:

- dimensioni molecolari sufficientemente ridotte;
- sono in grado di attraversare la BBB;

▪ rientrano nei cicli metabolici cerebrali, evitando fenomeni di accumulo e tossicità.

Come primo step della ricerca è stato valutato se queste nuove molecole potessero soddisfare la “*regola del cinque*” di Lipinski, modificata secondo Vlieghe e Khrestchatisky per molecole che devono raggiungere il SNC, ovvero:

- Peso Molecolare (PM) < 450 Da.
- Nella struttura molecolare non devono essere presenti più di 3 gruppi donatori di legame a idrogeno;
- Nella struttura molecolare non devono essere presenti più di 7 gruppi accettori di legame ad idrogeno
- Log P < 2,7
- *Polar surface area*, (PSA) < 70 Å².

Applicando opportuni modelli computazionali per mezzo di software specifici (Chemspider.com, Chemicalize.org) è stato valutato che il prodotto desiderato possiede le seguenti caratteristiche (Tabella 13):

	L-leucina-β-(3,4-diidrossifenil) etilamide	L-triptofano-β-(3,4-diidrossifenil) etilamide
PM	266.33 g/mol	339.38 g/mol
accettori di legami H	4	4
donatori di legami H	0	0
CLogP	1,22	1.78
PSA	95,58 Å ²	111.37 Å ²

Tabella 13. Caratteristiche dei prodotti desiderati calcolati per mezzo di software specifici

Quattro dei cinque fondamenti dimostrano che le nuove molecole che si vogliono realizzare sono potenzialmente in grado di raggiungere il SNC. Solo la PSA ha un valore leggermente superiore, tuttavia rientra nei limiti della “regola

dei cinque” di Lipinski per l’attraversamento delle biomembrane, pertanto si è proceduto a mettere a punto l’ottimale via di sintesi.

4.2.1. Sintesi e caratterizzazione

Per la realizzazione dei profarmaci L-Leucina- β -(3,4-didrossifenil) etilamide (DA-Leu) ed L-Triptofano- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide (DA-Tryp) è stato realizzato un legame covalente tra la funzione amminica libera della Dopamina con il gruppo carbossilico libero dell’aminoacido.

La sintesi è stata condotta utilizzando esclusivamente gli enantiomeri L. Tale scelta deriva dalla dimostrazione che il sistema L (LAT1) è il principale trasportatore degli aminoacidi con catene laterali neutre ed è espresso abbondantemente sia sul lato luminale che su quello basale delle BCECs. Quest’ultima caratteristica è fondamentale per il mantenimento della ottimale concentrazione di aminoacidi nel cervello. (Omidi Y. *et al.*, 2008).

Recenti studi hanno dimostrato che, *in vivo*, le affinità relative di LAT1 per gli aminoacidi sono le seguenti: L-Leu > L-Phe > L-Cys > L-Ser > L-Asn > L-Ala > L-Gly (Valdovinos-Flores C., Gonsebatt M. E., 2012); pertanto, in seguito all’idrolisi selettiva del DA-Leu nel SNC, il LAT1 medierebbe l’efflusso della L-Leucina dal parenchima cerebrale al sangue qualora la concentrazione dell’aminoacido risultasse in eccesso.

L-Triptofano all’interno del SNC viene convertito enzimaticamente a 5-idrossitriptofano e successivamente a serotonina.

Per evitare condensazioni crociate e impedire la formazione di zwitterioni non reattivi, che comporterebbero un significativo abbassamento delle rese e la formazione di prodotti indesiderati, la funzione amminica dell’aminoacido scelto è stata preventivamente protetta.

Attualmente, uno dei più usati protettori del gruppo amminico in α è il *tert*-butil-ossi-carbonile, conosciuto con l’acronimo “Boc”. E’ un protettore di tipo uretanico che inibisce la reattività del gruppo amminico trasformandolo in una amide e difende dalla racemizzazione il Boc-amminoacido attivato al carbossile, impedendo la formazione di ossazoloni. Inoltre, esso mostra buona stabilità durante la reazione di condensazione e può essere successivamente rimosso in

condizioni blande, assicurando l'integrità del legame peptidico neoformatosi. (Sorokina Y. M *et al.*, 2012). Per la reazione di condensazione sono stati pertanto utilizzati la N-Boc-L-leucina (Figura 38) e l' N-Boc-L-triptofano (Figura 39).

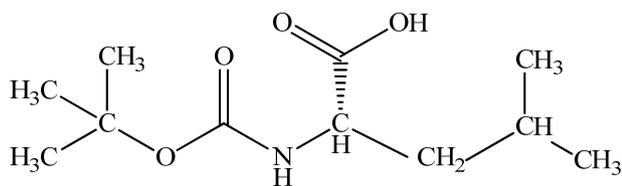


Figura 38. N-Boc-L-Leucina (2)

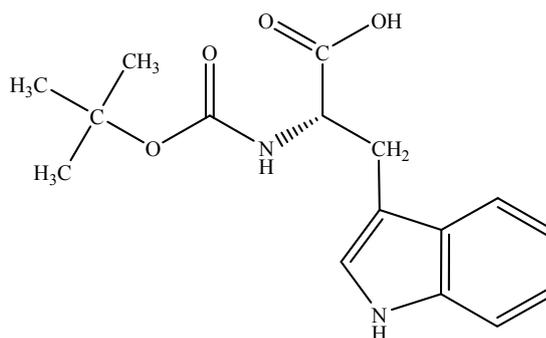


Figura 39. N-Boc-L-Triptofano (3)

A causa della elevata instabilità della Dopamina cloridrato alla luce ed all'ossigeno, è stato scelto ed impiegato un suo derivato disponibile in commercio dotato degli opportuni requisiti di stabilità chimico-fisica: la 3,4-dimetossifenilettilamina (**1**).

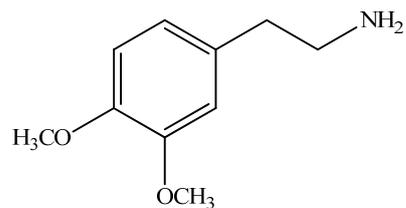
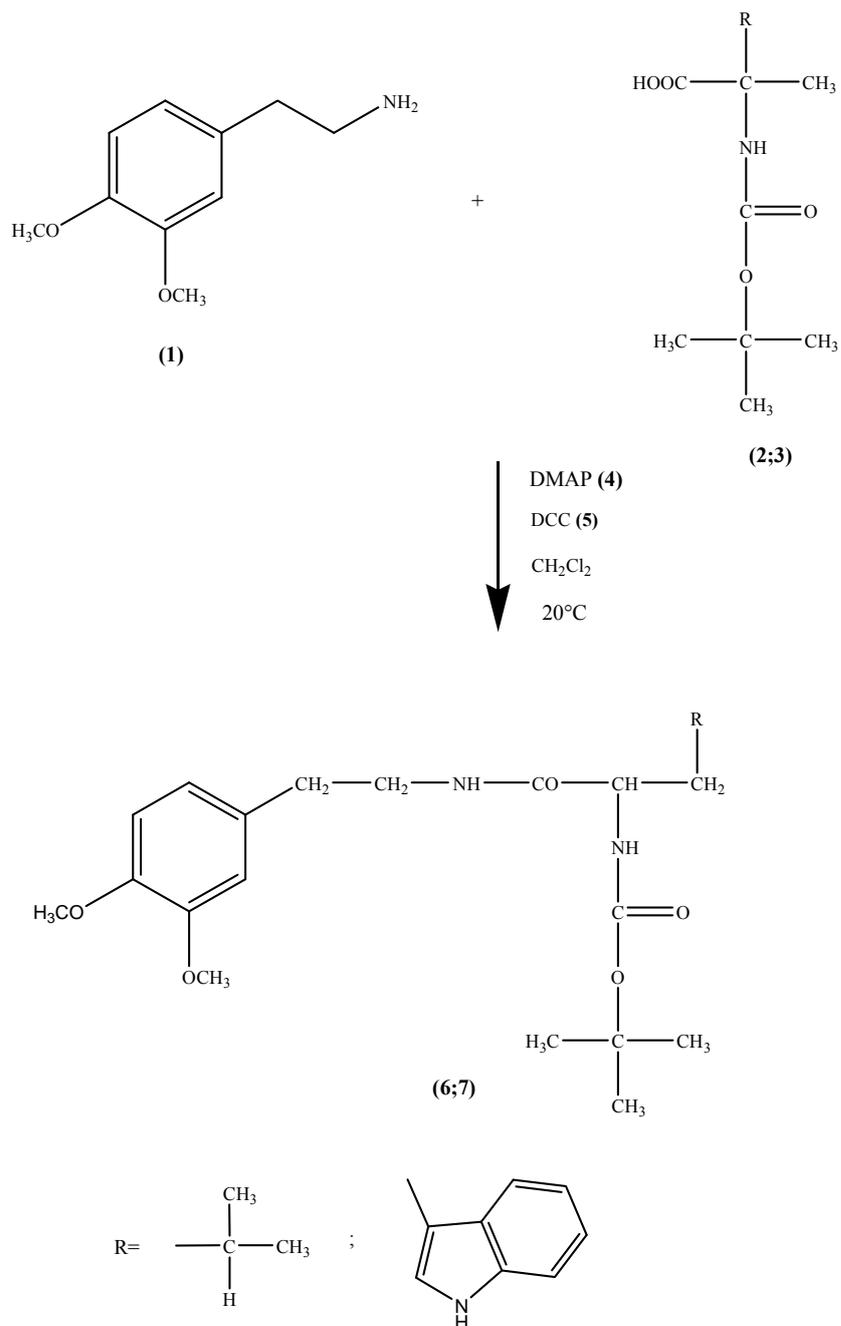


Figura 40. 3,4-dimetossifenilettilamina (1)

La reazione di sintesi del profarmaco (**Schema 1**) è stata condotta per 4 ore, a temperatura ambiente e sotto agitazione, ponendo la 3,4-dimetossifenilettilamina (**1**) a reagire con il derivato aminoacidico (**2 o 3**) in presenza di: un agente condensante la dicicloesilcarbodiimmide (DCC) (**5**) e un catalizzatore di reazione la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (**4**). I migliori risultati, in termini di resa del prodotto finale, sono stati ottenuti utilizzando diclorometano anidro come solvente.



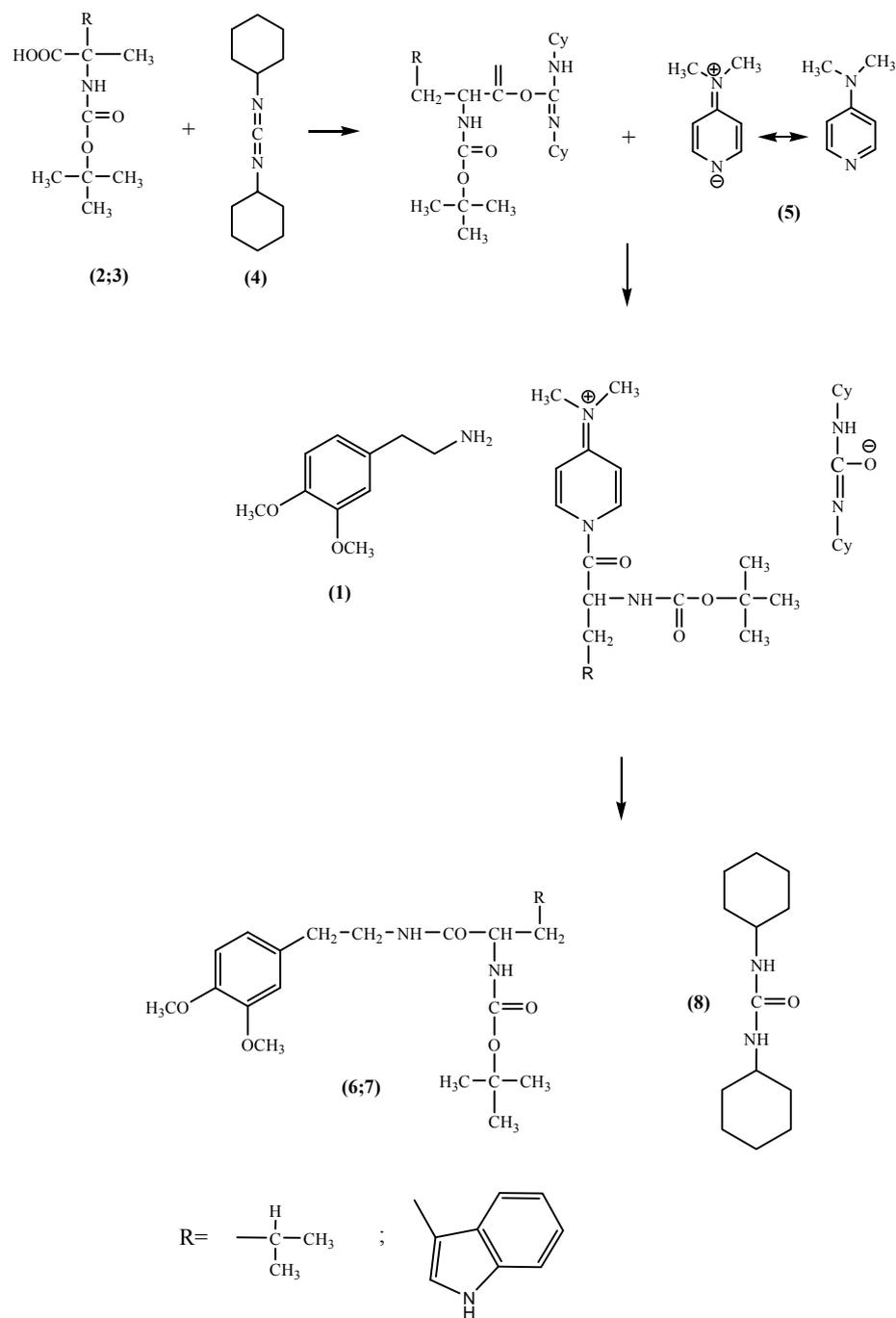
Schema 1. Sintesi dell’N-Boc-L-Leucina-β-(3,4-dimetossifenilettilamide) e dell’N-Boc-L-Triptofano-β-(3,4-dimetossifenilettilamide).

La scelta di utilizzare DCC e DMAP è il risultato di numerose evidenze in letteratura secondo le quali tale associazione, permette di aumentare le rese finali

e di ridurre la formazione di prodotti secondari. (Giraud M., *et al.* 2001) (Wang J. *et al.* 2012)

Durante la reazione di condensazione, infatti, se viene utilizzata la DCC, quale unico agente condensante, quest'ultima trasformandosi in dicicloesilurea (DCU) può, a sua volta, comportarsi da agente nucleofilo ed attaccare l'N-Boc-L-aminoacido, dando vita alla formazione di prodotti secondari, che compromettono irreversibilmente la resa del prodotto desiderato.

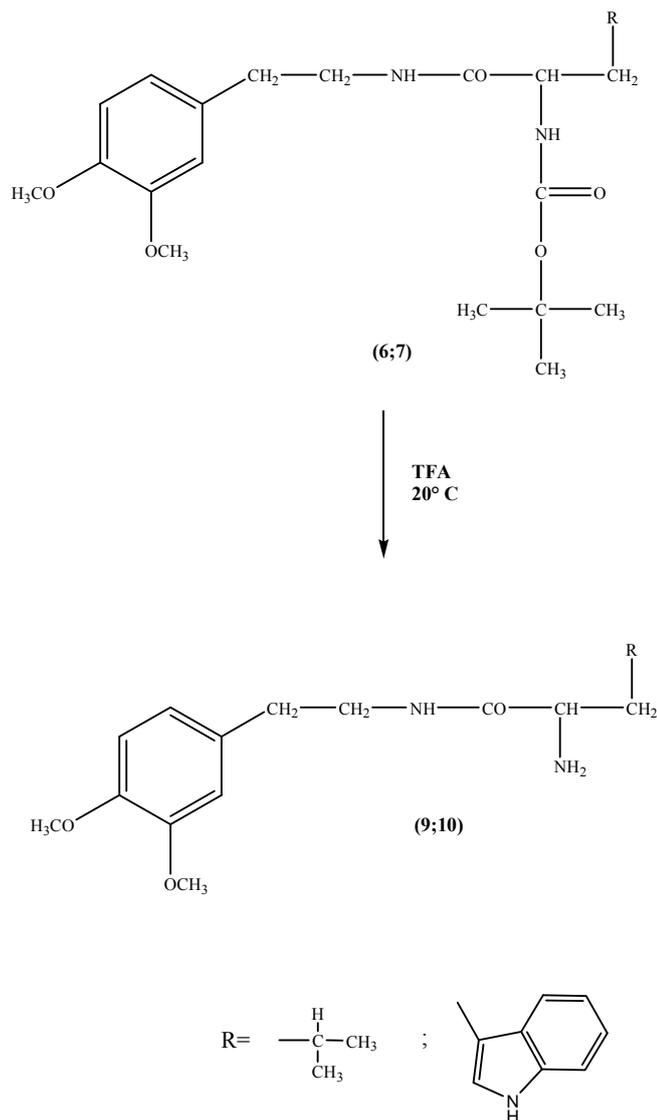
L'associazione DMAP/DCC attiva la funzione aminica della 3,4-dimetossifenilettilamina verso la sostituzione nucleofila, preserva i reagenti da eventuali perdite di chiralità in sede di reazione e nello stesso tempo, evita la formazione di prodotti indesiderati (Han S. Y., Kim Y. A. 2004) (Wang J. *et al.* 2012) (**Schema 2**)



Schema 2. Attivazione della 3,4-dimetossifeniletilamina.

Dopo aver purificato e isolato i prodotti di sintesi **(6;7)** per cristallizzazione con opportuno solvente, si è proceduto alla liberazione della funzione amminica dell'aminoacido dal gruppo protettore t-butilossicarbonato (Boc). (**Schema 3**)

Il Boc è labile in ambiente acido e viene staccato con acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano in rapporto 1:1. La sua labilità agli acidi dipende dal fatto che sono presenti due ottimi gruppi uscenti: la CO₂, che si sottrae all'equilibrio come gas, e il catione terzbutilico che è relativamente stabile in ambiente acido. (Sorokina Y. M *et al.* 2012)



Schema 3. Idrolisi dell’N-Boc-L-Leucina-β-(3,4-dimetossifeniletamide) e dell’N-Boc-L-Triptofano-β-(3,4-dimetossifeniletamide).

I prodotto di idrolisi (9;10) sono stati, infine, sottoposti a reazione di demetilazione al fine di liberare gli ossidrili fenolici della porzione dopaminica ed

ottenere il composto desiderato.

Quale agente demetilante è stato scelto il tribromuro di boro (BBr_3) in un rapporto molare 4:1 (BBr_3 /prodotto). Rapporti molari inferiori hanno comportato una demetilazione incompleta (Giannola L.I. *et al.* 2008) (Roth H.J., Kleemann A. 1988).

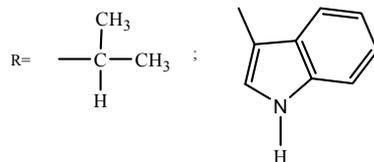
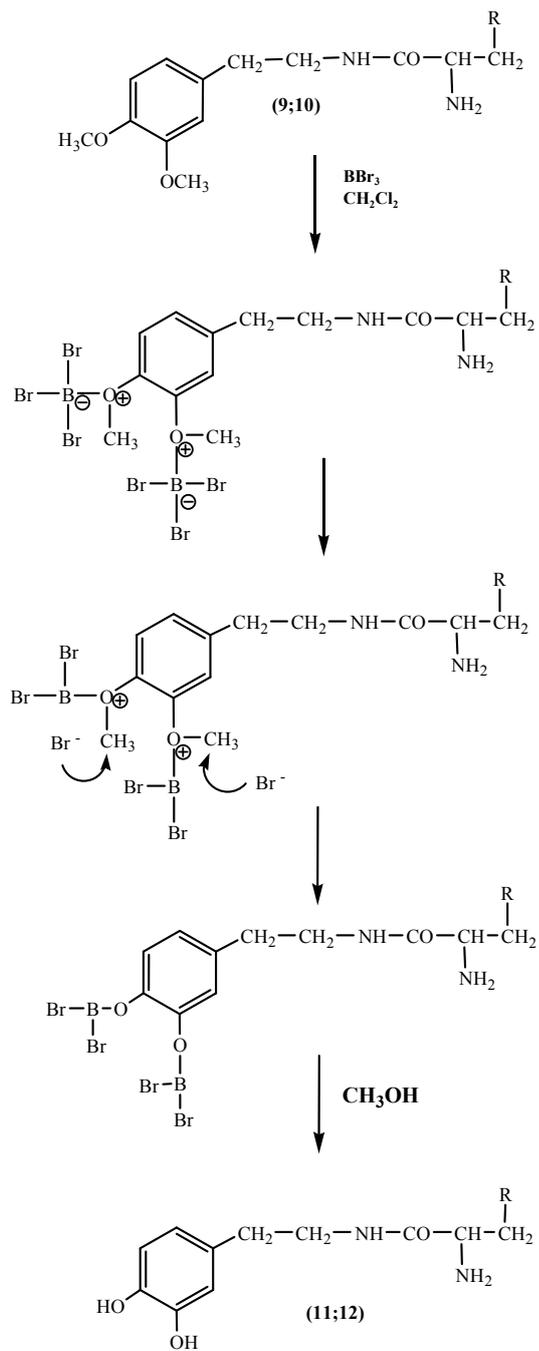
La reazione di demetilazione avviene mediante due step. Il primo step implica una reazione acido-base tra il BBr_3 (acido di Lewis) ed il gruppo etero (base di Lewis) dei prodotti **8** e **9**, seguita dalla perdita dello ione bromuro. Quest'ultimo partecipa ad una reazione di sostituzione nucleofila, attaccando il carbonio del gruppo metilico e determinando la liberazione di bromuro di metile (CH_3Br). (**Schema 4**)

Il secondo step, prevede invece l'idrolisi del legame O-B che, consente la liberazione del gruppo ossidrilico fenolico e la formazione del trimetilborato [$\text{B}(\text{OCH}_3)_3$]. (**Schema 4**)

Tale idrolisi può essere effettuata aggiungendo al mezzo di reazione una soluzione acquosa alcalina o metanolo (Chen H. J. C. *et al.* 1998) (Ragot J.P. *et al.* 1999). I risultati migliori sono stati ottenuti impiegando il metanolo, in volume pari a quello del mezzo di reazione.

Tra i prodotti di reazione è presente il trimetilborato, un liquido avente punto di ebollizione pari a 67-68°C; tale sostanza forma un azeotropo con il metanolo [70% $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$ + 30% CH_3OH], con punto di ebollizione pari a 52-54°C. L'impiego del CH_3OH presenta, quindi, il vantaggio di consentire il facile allontanamento del trimetilborato dal grezzo di reazione. Di contro, le reazioni di idrolisi del legame O-B condotte in ambiente acquoso alcalino comportano un difficile recupero dei prodotti desiderati dal grezzo di reazione e una rapida degradazione degli stessi.

I prodotti di demetilazione (**11;12**), sono stati in seguito isolati e purificati per cristallizzazione con opportuno solvente.



Schema 4 . Demetilazione dell'L-Leucina-β-(3,4-dimetossifeniletamide) e dell'L-triptofano-β-(3,4-dimetossifeniletamide).

I dati strutturali ricavati mediante spettrofotometria UV e IR, spettrometria ^{13}C ed ^1H NMR indicano che i prodotti ottenuti sono l'**L-Leucina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide (DA-Leu)** e l'**L-Triptofano- β -(3,4-dimetossifenil)etilamide (DA-Tryp)**.

Lo spettro UV del **DA-Leu** mostra un massimo di assorbimento a $\lambda = 282.0$ nm, riconducibile alla porzione dopaminica. La porzione aminoacidica infatti non possiede alcun tipo di assorbimento spettrofotometrico. In Figura 41 sono riportati gli spettri UV di uno dei reagenti (la 3,4-dimetossifenilettilamina) e dei prodotti ottenuti da ogni singolo step di reazione. Gli spettri di assorbimento mostrano un andamento pressoché simile in termini di massimi di assorbimento, indice che la porzione cromofora è rimasta inalterata.

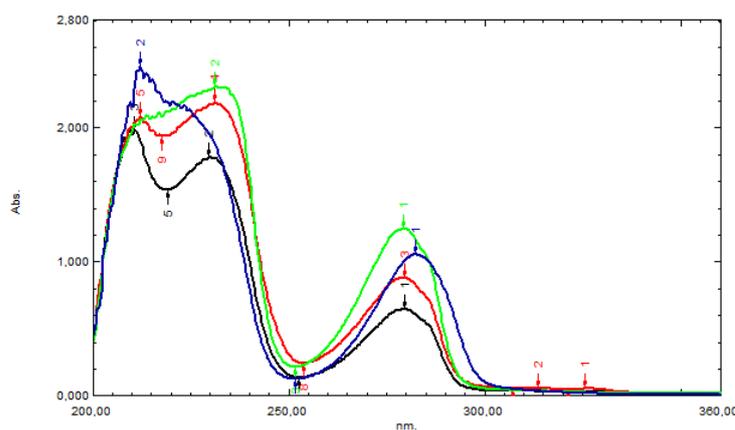


Figura 41. Spettro UV in metanolo di soluzioni 0.1 mg/ml di:
— 3,4-dimetossifenilettilamina (1);
— N-Boc-L-Leucina- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (6);
— L-Leucina- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (9);
— L-Leucina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide (11).

E' stata effettuata una ulteriore analisi degli spettri di assorbimento utilizzando la tecnica della derivata seconda (Figura 42); questo per avere una indicazione più precisa delle variazioni all'assorbimento che può avere il DA-Leu, rispetto ai suoi precursori, dovute alla liberazione degli ossidrili fenolici.

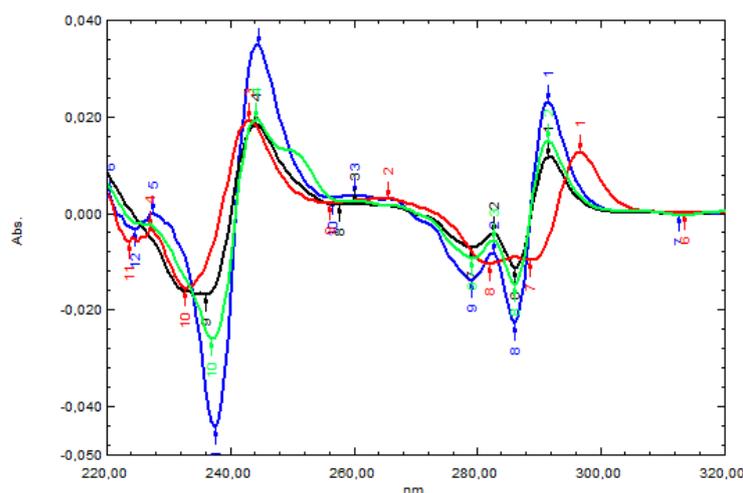
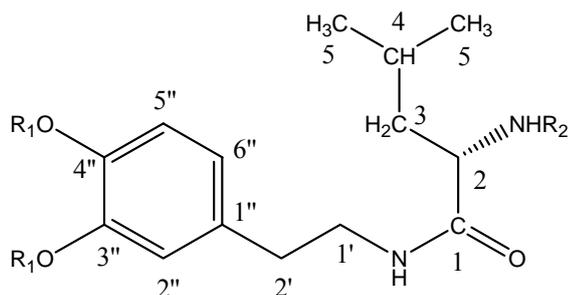


Figura 42. Tracciati in derivata II degli spettri UV in metanolo di:
 — 3,4-dimetossifenilettilamina (1);
 — N-Boc-L-Leucina- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (6);
 — L-Leucina- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (9);
 — L-Leucina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide (11).

E' possibile osservare infatti uno spostamento dei minimi del **DA-Leu** a 288 e 313 nm (rispetto a 279 e 286 nm per tutti gli altri composti) dovuti ad una variazione della coniugazione.

Lo spettro IR del **DA-Leu** presenta una banda larga compresa tra 3400 e 3200 cm^{-1} relativa allo stretching degli OH fenolici, dell'NH indolico, dell'NH amidico e del gruppo aminico, una banda a $\sim 1670 \text{ cm}^{-1}$ corrispondente allo stretching del carbonile amidico, ed una banda a $\sim 1520 \text{ cm}^{-1}$ corrispondente al banding dell'NH amidico.

Ulteriore conferma della struttura del prodotto desiderato è stata ottenuta attraverso spettrometria ^1H e ^{13}C NMR. In tabella 14 sono riportati i dati di chemical shift per il **DA-Leu** e per i prodotti provenienti dagli step intermedi di reazione (6 e 9)



	Prodotto 6	Prodotto 9	Prodotto11
	R1=Me, R2=Boc	R1=Me, R2=H	R1=R2=H
C-1	172.4	----	170.4
C-2	53.1		53.1
H-2	4.90 d br.	4.85	4.90
C-3	41.4		42.1
H-3	1.61 m	1.53	1.55 m
C-4	25.5		25.4
H-4	1.65 m	N O	1.55 m
C-5	21.9 , 22.8		22.3, 22.9
H-5	0.89 , 0.91	0.90, 0.93	0.92, 0.94
C-1'	40.7		40.8
H-1'	3.49 m	3.64	3.54 m
C-2'	35.2		35.5
H-2'	2.75 t	2.78	2.73 m
C-1''	131.2	----	131.6
C-2''	111.8 *		116.9 *
H-2''	6.71 m	6.73	6.52
C-3''	147.7 °	----	144.9 °
C-4''	149.0 °	----	146.3 °
C-5''	111.3 *		116.4 *
H-5''	6.71 m	6.85	6.67 m
C-6''	120.5		121.1
H-6''	6.79 dd	6.86	6.67 m
2 X CH3O-	55.8 3.86, 3.86	3.80 , 3.82	----
(CH3)CCO-	155.6	----	----
(CH3)C \bar{C} CO-	28.2	----	----
	1.41		
(\bar{C} H3)CCO-	33.8	----	----

Tabella 14. Valori di chemical shift di ^{13}C - e ^1H - NMR dei prodotti 6, 9 e 11 in soluzione di CD_3OD

Al prodotto di demetilazione **11** è stata attribuita inequivocabilmente la struttura di **L-Leucina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide**.

Lo spettro UV del **DA-Tryp (12)** mostra un massimo di assorbimento a $\lambda = 280.0$ nm, riconducibile alla porzione dopaminica ed un andamento caratteristico delle sostanze a struttura indolica.

In figura 43 sono riportati gli spettri UV dei reagenti e dei prodotti ottenuti da ogni singolo step di reazione.

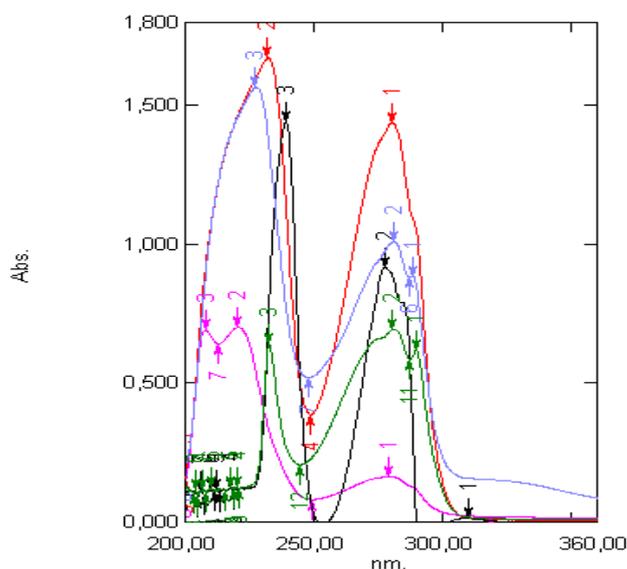


Figura 43. Spettro UV in metanolo (0.05mg/ml) di: - 3,4-dimetossifeniletilamina (1);
- N-Boc-L-triptofano (2); - N-Boc-L-triptofano- β -(3,4-dimetossifenil)etilamide (7);
- L-triptofano- β -(3,4-dimetossifenil)etilamide (10);
- L-triptofano- β -(3,4-diidrossifenil)etilamide (12)

Lo spettro IR del **DA-Tryp** presenta una banda larga compresa tra 3400 e 3200 cm^{-1} relativa allo stretching degli OH fenolici, dell'NH indolico, dell'NH amidico e del gruppo aminico, una banda a ~ 1660 cm^{-1} corrispondente allo stretching del carbonile amidico, ed una banda a

~ 1520 cm⁻¹ corrispondente al banding dell'NH amidico. Dall'analisi IR si evince la presenza di bande caratteristiche per ogni gruppo funzionale, in accordo con la struttura proposta.

Ulteriore conferma della struttura del prodotto desiderato è stata ottenuta attraverso spettrometria ¹H e ¹³C NMR. I dati di chemical shift per il profarmaco sono riportati nelle seguenti tabelle:

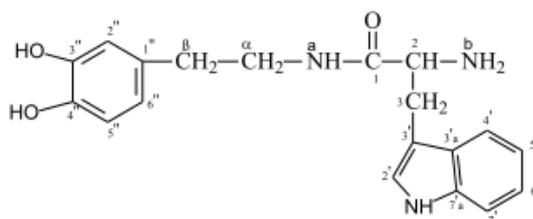


Tabella 1

Valori di chemical shift di ¹³C e (¹H) - NMR del Profarmaco in soluzione di CD₃OD

C-1	157.90
C-2	52 (3.92)
C-3	27.1 (3.08)
α	41.8 (2.45)
β	34 (3.28)
C-1''	127.4
C-2''	119.6 (6.45)
C-3''	144.8
C-4''	143.3
C-5''	121.5 (6.51)
C-6''	118.8 (6.28)
OH	Protoni che scambiano rapidamente

Tabella 1a

C-2'	125.2 (7.10)
C-3'	106.7
C-3'a	129.5
C-4'	115.8 (7.53)
C-5'	116.3 (6.89)
C-6'	118.8 (7.00)
C-7'	111.6 (7.25)
C-7'a	136.0

Al prodotto **12** è stata attribuita inequivocabilmente la struttura di **L-triptofano- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide**.

Una volta ottenuto il prodotto desiderato sono stati intrapresi gli studi al fine di valutare alcune caratteristiche chimico-fisiche idonee per il raggiungimento del SNC.

4.2.2 Determinazione del coefficiente di distribuzione a pH 7.4

Un parametro fondamentale, che indica la capacità di un composto di attraversare le membrane biologiche, è rappresentato dal coefficiente di ripartizione (P) ovvero la tendenza del farmaco a ripartirsi tra una fase organica apolare e una fase acquosa polare. Infatti, il logaritmo del coefficiente di partizione P ($\log P$) tra queste due fasi si riferisce al grado di lipofilia del farmaco. Di solito, farmaci lipofili sono ben assorbiti dopo somministrazione orale e si distribuiscono in vari tessuti, tra cui il SNC; farmaci idrofili, invece, sono assorbiti poco o per nulla e non raggiungono il SNC.

Occorre però precisare che mentre la matrice delle membrane cellulari è costituita essenzialmente da lipidi, il citoplasma e gli spazi extracellulari sono di natura acquosa. Pertanto, un farmaco deve possedere sufficiente carattere lipofilo affinché riesca ad attraversare la matrice della membrana cellulare, ma deve essere dotato anche di proprietà idrofile che ne favoriscano la necessaria solubilità nei liquidi extra- ed intracellulari.

Il $\log P$ è uno dei cinque parametri fondamentali della regola di Lipinski con la quale è possibile prevedere la diffusione passiva di una molecola di farmaco attraverso le barriere fisiologiche.

Gli acidi e le basi deboli sottoposti a ripartizione tra due solventi non miscibili partecipano a due equilibri simultanei:

- quello di ripartizione della specie neutra tra la fase acquosa e la fase organica;
- quello acido-base che ha luogo esclusivamente nella fase acquosa.

Il primo equilibrio dipende dal coefficiente di ripartizione (P) del soluto. Il secondo equilibrio dipende dal pKa del soluto e dal pH della fase acquosa.

La ripartizione complessiva che risulta dai due equilibri è espressa dal coefficiente di distribuzione (**D**). Per un dato soluto, il valore di **P** è una proprietà intrinseca (della specie neutra), mentre il valore di **D** varia in funzione del pH.

E' stato, pertanto, determinato sperimentalmente il coefficiente di distribuzione, espresso come **LogD** (logaritmo di D), quale indice dell'attitudine posseduta dal profarmaco all'attraversamento della BBB. Di norma, questo parametro viene valutato utilizzando, come fase lipofila ottanolo e come fase idrofila una soluzione tampone a pH 7.4. Quando la ripartizione assume valori superiori a uno, il composto è tendenzialmente lipofilo, mentre, se assume valori negativi, prevale il carattere idrofilo.

Il valore medio di **logD** ottenuto è risultato pari a 0.18 per il **Da-Leu** e 0.5 per il **DA-Tryp**. Tali valori indicano che i composti ottenuti possiedono una lipofilia opportuna per la permeazione attraverso le biomembrane. Dall'osservazione della struttura delle molecole, infatti, si può notare come la coniugazione della dopamina con l'aminoacido scelto ha determinato:

- l'accrescimento complessivo delle dimensioni molecolari senza superare i limiti previsti dalla regola "dei cinque" per l'attraversamento della BBB;
- il mascheramento della funzione amminica libera della dopamina;
- l'inserimento di una porzione lipofila.

4.2.3. Stabilità chimica del DA-Leu e del DA-Tryp.

Allo scopo di ipotizzare un'eventuale somministrazione per *os* dei profarmaci sintetizzati è stata verificata la loro stabilità chimica nel range di pH dell'ambiente gastrointestinale. Sono stati condotti studi del comportamento chimico a 37°C, in soluzione acquosa, nell'intervallo di pH compreso tra 1.3 e 8. La valutazione della stabilità è stata effettuata monitorando nel tempo il comportamento di **DA-Leu** e **DA-Tryp** in fluido gastrointestinale simulato, mediante analisi spettrofotometrica UV ed analisi cromatografica HPLC.

L'analisi spettrofotometrica UV è stata eseguita nel range di lunghezza d'onda 200 ÷ 800 nm. Al tempo zero, gli spettri delle soluzioni acquose del **DA-Leu** ai vari intervalli di pH (Figure 44, 45, 46 e 47) mostrano un massimo di

assorbimento nel range di λ 280.0 \div 280.5 nm, in dipendenza del pH, e non si osservano assorbimenti significativi tra 360 e 800 nm.

L'andamento dello spettro di assorbimento rimane invariato nel tempo per le soluzioni di profarmaco a pH 1.1 e 6.5.

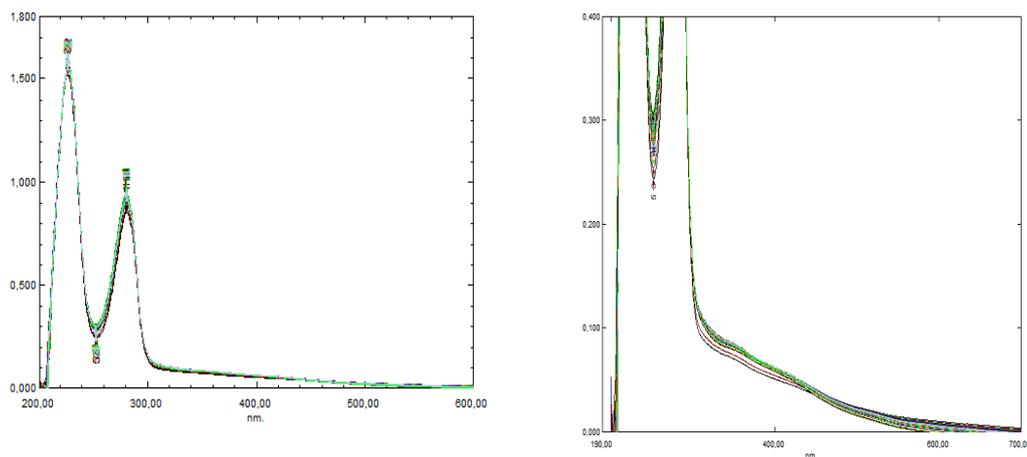


Figura 44 e 44 a (ingrandimento). Andamento temporale dei profili di assorbimento delle soluzioni acquose di DA-Leu (0.10 mg/ml), a pH 1.1.

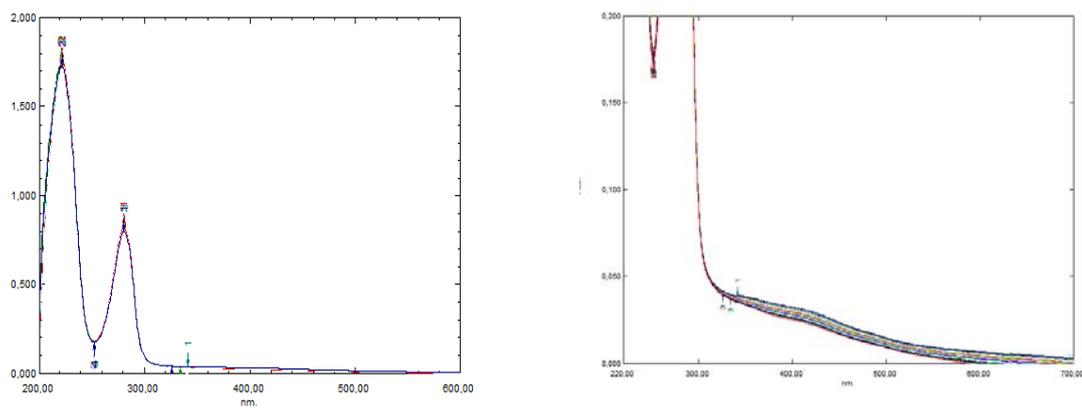


Figura 45 e 45 a (ingrandimento). Andamento temporale dei profili di assorbimento delle soluzioni acquose del DA-Leu (0.10 mg/ml), a pH 6.5.

Tuttavia, e soltanto a valori di pH superiori a 7.4, dopo circa 40 minuti dall'inizio dell'esperimento, si osserva la comparsa di un picco slargato e centrato 450 nm, la cui intensità cresce progressivamente nel tempo, indicando la presenza di un prodotto di degradazione.

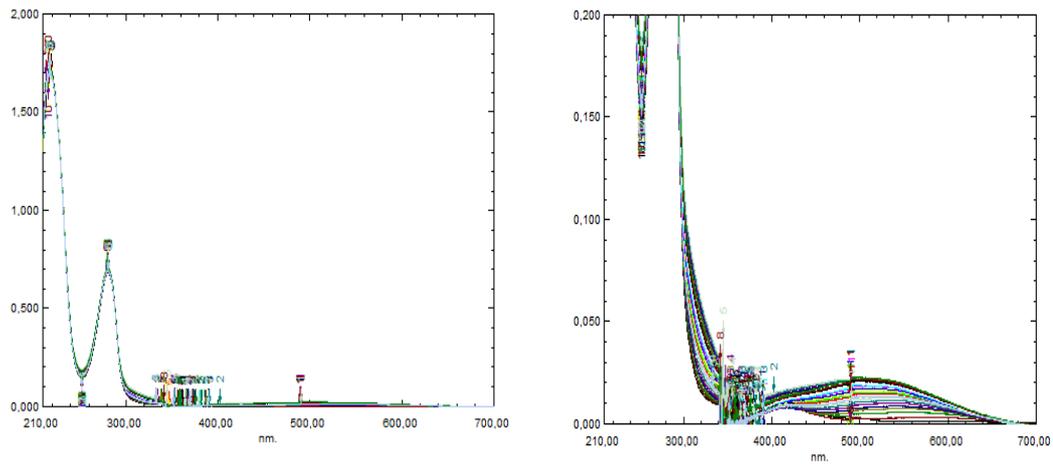


Figura 46 e 46 a (ingrandimento). Andamento temporale dei profili di assorbimento delle soluzioni acquose del DA-Leu (0.10 mg/ml), a pH 7.4.

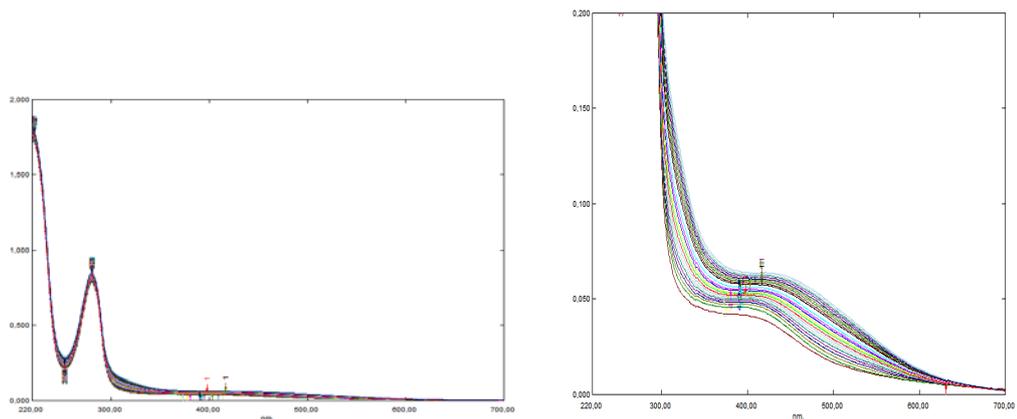


Figura 47 e 47 a (ingrandimento). Andamento temporale dei profili di assorbimento delle soluzioni acquose del DA-Leu (0.10 mg/ml), a pH 8.0.

Al tempo zero, gli spettri delle soluzioni acquose del **DA-Tryp** (Figura 48) mostrano un massimo di assorbimento nel range di λ 278.0 ÷ 280.5 nm, in dipendenza del pH, e non si osservano assorbimenti significativi tra 360 e 800 nm. Anche in questo caso:

- l'andamento dello spettro di assorbimento rimane invariato nel tempo per le soluzioni di profarmaco a pH 1.1 e 6.5;
- a valori di pH superiori a 7.4 (dopo circa 50 minuti) si osserva la comparsa del picco a 450 nm, la cui intensità cresce progressivamente nel tempo, indicando la presenza di un prodotto di degradazione.

Da un'attenta analisi è, inoltre, possibile evincere che l'assorbanza specifica di tale prodotto cresce al diminuire del pH, probabilmente per l'effetto di stabilizzazione della coniugazione conseguente alla protonazione della molecola.

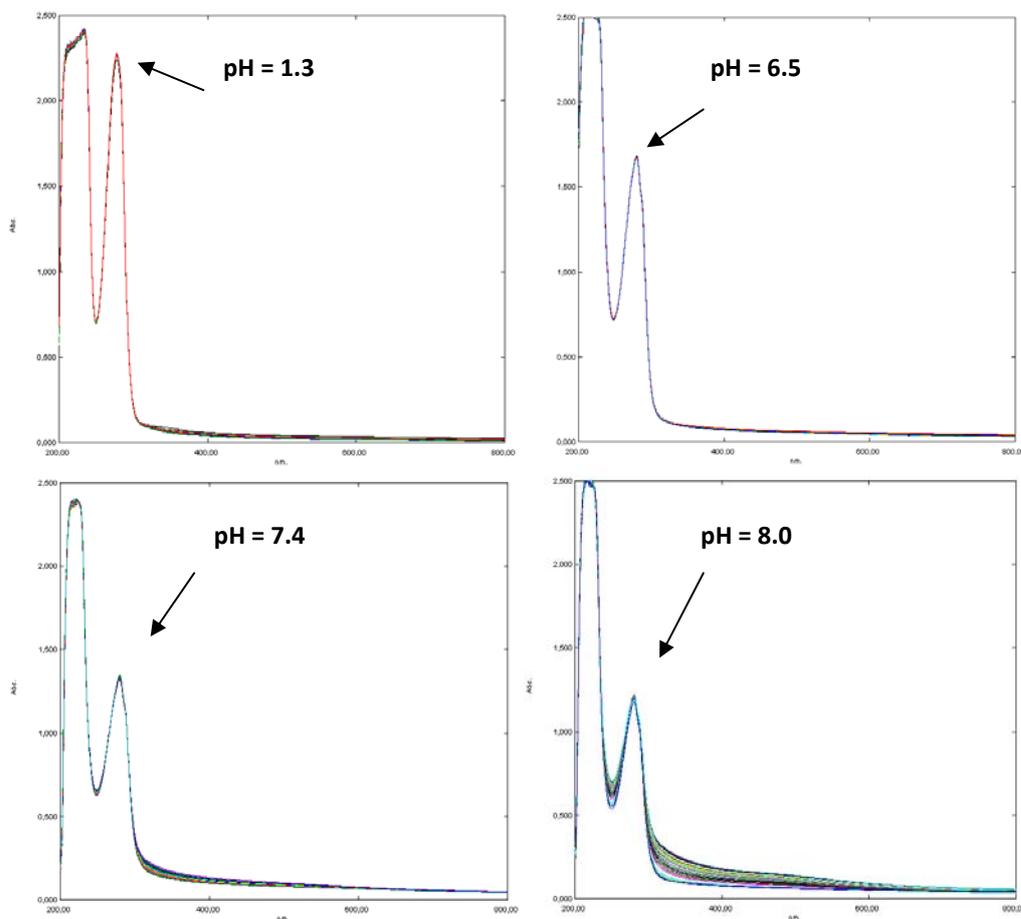


Figura 48. Andamento temporale dei profili di assorbimento delle soluzioni acquose del DA-Tryp (0.15 mg/ml), ai diversi pH.

Allo scopo di stabilire l'eventuale scissione idrolitica dei profarmaci, le soluzioni acquose ai diversi pH, sono state sottoposte anche ad analisi HPLC. Le analisi di campioni prelevati ad opportuni intervalli di tempo, hanno dimostrato che nel range di pH 1.3 ÷ 8 non vi è liberazione di dopamina, confermando la stabilità chimica del legame dopamina-aminoacido.

4.2.4. Stabilità del DA-Leu e del DA-Tryp in plasma umano

Un principio attivo, per poter esplicare il suo effetto farmacologico, deve raggiungere una adeguata concentrazione nel torrente sanguigno e possedere una opportuna emivita plasmatica. Composti instabili a livello plasmatico tendono infatti ad avere una rapida clearance, una emivita breve ed una scarsa performance *in vivo*

(Di L. *et al.* 2005). Pertanto, al fine di valutare la stabilità del legame peptidico dei nuovi profarmaci a livello del circolo sistemico, sono stati condotti studi *in vitro* utilizzando plasma umano.

Campioni di sangue, prelevati da un donatore sano, sono stati trattati con EDTA, centrifugati e la porzione corpuscolata è stata separata dal plasma.

Ad ogni aliquota di plasma è stata aggiunta una quantità nota di **DA-Leu** o di **DA-Tryp** ed i campioni sono stati posti a 37 °C sotto agitazione. Ad opportuni intervalli di tempo sono stati effettuati prelievi di plasma che sono stati subito analizzati mediante HPLC. E' stato possibile osservare che nel tempo i profarmaci subiscono scissione enzimatica. L'interpretazione cinetica del processo enzimatico è stata effettuata mediante l'impiego di opportuni modelli. I dati sperimentali sono stati sottoposti ad elaborazione matematica, mediante l'impiego del software "Curve Expert 1.3 for Windows". I fits numerici hanno evidenziato che la migliore correlazione è stata ottenuta applicando il modello di Michaelis-Menten (MMF), per il quale il coefficiente di correlazione è pari a 0.995 (S.E. 0.0026).

L'idrolisi del profarmaco segue, pertanto, una cinetica enzimatica di saturazione, di Michaelis-Menten, che può essere rappresentata dall'equazione :

$$\frac{dM_t}{dt} = \frac{V_{\max} - M_t}{K_m + M_t}$$

in cui:

dM_t/dt rappresenta la velocità di scomparsa del substrato,

V_{\max} è la velocità massima della reazione,

K_m la costante di Michaelis-Menten,

M_t la concentrazione di substrato che può subire trasformazione.

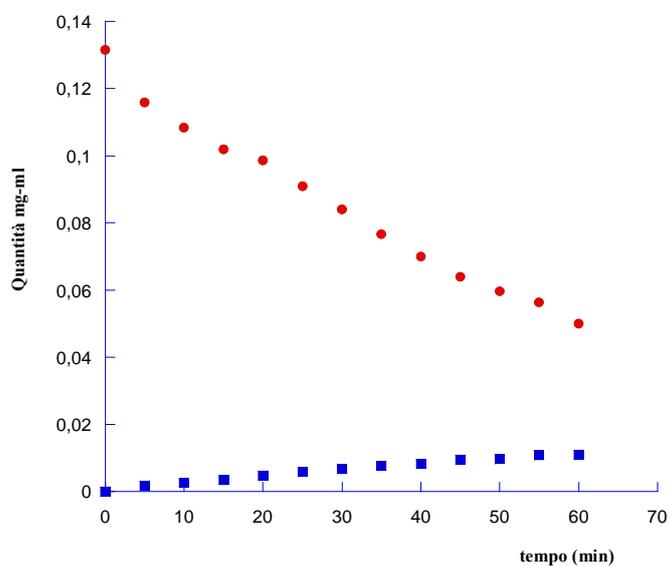


Figura 49. Andamento cinetico dell'idrolisi enzimatica in plasma umano del DA-Leu e contemporanea liberazione della Dopamina

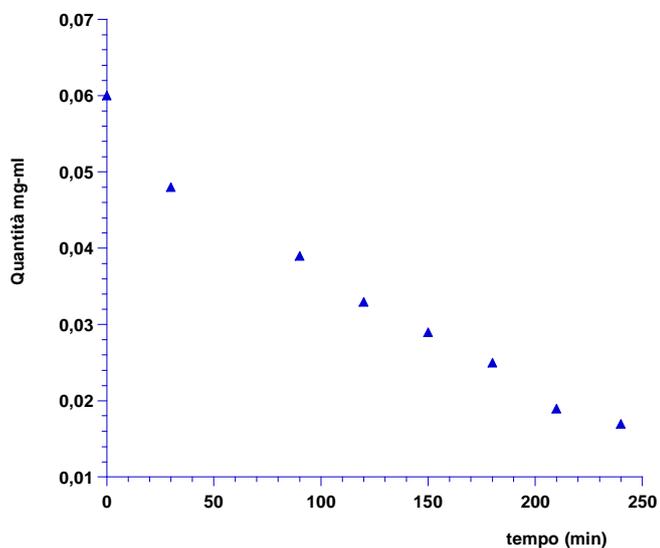


Figura 50. Andamento cinetico dell'idrolisi enzimatica in plasma umano del DA-Tryp

Dai risultati ottenuti in plasma umano, riportati in Figure 49 e 50 si può notare che il legame peptidico del profarmaco viene scisso in maniera veloce e costante con una

cinetica di tipo enzimatico. Dall'analisi HPLC dei campioni prelevati ai vari intervalli di tempo, inoltre, si osserva la comparsa del picco relativo alla dopamina liberata dalla scissione del legame amidico, in concomitanza con la riduzione del picco relativo al profarmaco.

Il $t_{1/2}$ del profarmaco, ovvero il tempo in cui si osserva il dimezzamento della sua concentrazione plasmatica, dovuto al rilascio di dopamina, calcolato per estrapolazione geometrica, è risultato pari a 46 minuti per il **DA-Leu** e 120 minuti per il **DA-Tryp**.

Il valore di $t_{1/2}$ del **DA-Leu** risulta uguale rispetto a quello riportato per la Levodopa, la cui decarbossilazione plasmatica e conseguente liberazione della dopamina periferica è pari a 30-60 min (White HS., 2000). Il **DA-Tryp** invece mostra un valore di $t_{1/2}$ maggiore rispetto a quello calcolato per la Levodopa.

4.2.5. Stabilità del DA-Leu e del DA-Tryp in omogenato di cervello di ratto.

Allo scopo di valutare la capacità del profarmaco di rilasciare dopamina, dopo “uptake” da parte del cervello, sono stati condotti studi di idrolisi enzimatica *in vitro* in presenza di omogenato di cervello di ratto.

Aliquote di frazione citosolica di omogenato di cervello sono state incubate, alla temperatura di 37 °C, in presenza di una soluzione dei profarmaci. L'evoluzione della scissione del profarmaco ad opera degli enzimi è stata monitorata anche in questo caso mediante analisi HPLC.

I grafici (Figure 51 e 52), che riportano la concentrazione del profarmaco e della dopamina in funzione del tempo, mostrano l'andamento dell'idrolisi enzimatica dei profarmaci e la relativa comparsa di dopamina.

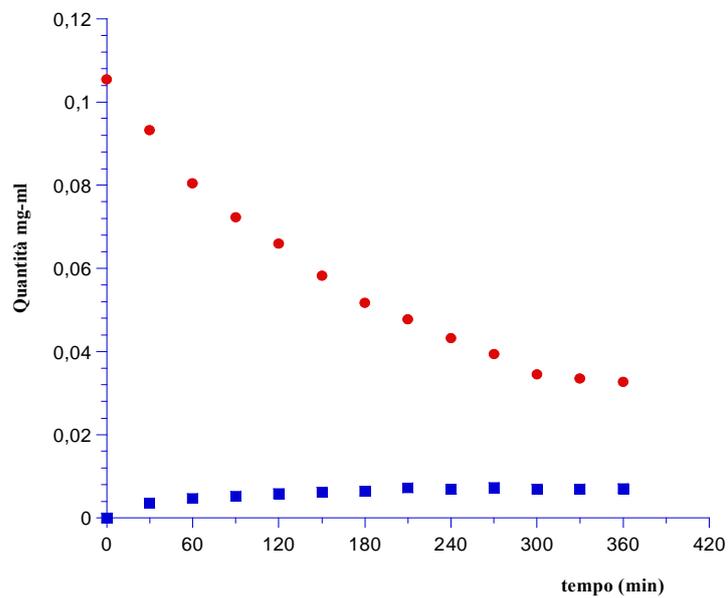


Figura 51. Andamento dell'idrolisi enzimatica in omogenato di cervello del ● DA-Leu e contemporanea liberazione della ■ Dopamina.

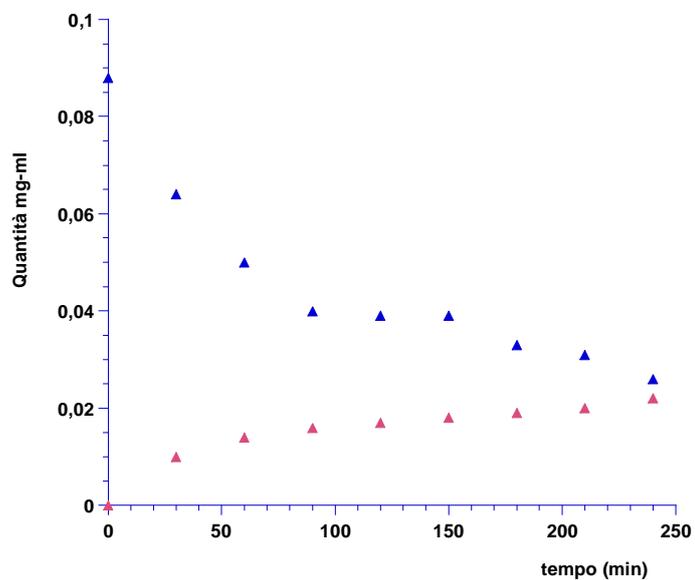


Figura 52. Andamento dell'idrolisi enzimatica in omogenato di cervello del ▲ DA-Tryp e contemporanea liberazione della ▲ Dopamina

Successivamente si è proceduto, all'interpretazione cinetica del processo di scissione di profarmaci. Anche in questo caso i dati sperimentali sono stati sottoposti ad elaborazione matematica, mediante l'impiego del software "Curve Expert 1.3 for Windows". I fits numerici hanno evidenziato che la migliore correlazione è stata ottenuta applicando il modello di Michaelis-Menten (MMF) (coefficiente di correlazione pari a 0.997 (S.E. 0.0016) per il **DA-Leu** e 0.998 (S.E. 0.0019) per il **DA-Tryp**)

I risultati dell'idrolisi enzimatica dei profarmaci in omogenato di cervello di ratto, mostrati nelle Figure 51 e 52 che:

- ✓ la dopamina viene rilasciata in maniera lenta e costante con una cinetica di Michaelis-Menten;
- ✓ la riconversione enzimatica avviene da parte delle amidasi/proteasi localizzate nella frazione citosolica del cervello;
- ✓ il $t_{1/2}$ del profarmaco, calcolato per estrapolazione geometrica, è pari a 193 minuti per il **DA-Leu**.
- ✓ il $t_{1/2}$ del profarmaco, calcolato per estrapolazione geometrica, è pari a 80 minuti per il **DA-Tryp**.

Alla luce di quanto osservato, i coniugati **DA-Leu** e **DA-Tryp** dovrebbero superare la BBB e liberare il principio attivo per scissione enzimatica all'interno del SNC.

4.3 Valutazione *in vitro* dell'attraversamento della barriera emato-encefalica

Nelle prime fasi della sperimentazione riguardante molecole di nuova sintesi con potenziale attività farmacologica a livello del sistema nervoso centrale, diviene necessario valutarne l'attitudine a permeare attraverso la BBB.

A tal fine, negli ultimi anni, l'attenzione della ricerca si è focalizzata sulla progettazione e sullo sviluppo di nuovi modelli, quali strumenti predittivi in grado di velocizzare e direzionare il processo di "Drug Discovery".

Questi modelli possono essere classificati in due gruppi principali: modelli *in vivo* e modelli *in vitro*.

Nonostante l'elevata precisione, i modelli *in vivo* risultano essere poco indicativi soprattutto nelle fasi iniziali della sperimentazione, quando il quantitativo di prodotto da testare è limitato, e quando, allo scopo di selezionare i prodotti migliori, devono essere testate diverse serie di composti.

Pertanto nel corso dell'ultimo decennio sono stati elaborati efficienti modelli *in vitro* capaci di mimare, con la buona accuratezza, la permeazione dei farmaci *in vivo* attraverso la BBB (Mensch J. *et al.*, 2010b).

Alcuni modelli *in vitro* sono stati realizzati utilizzando colture di cellule endoteliali cerebrali (BCEC_S). Tra le più impiegate, vi sono le colture endoteliali primarie (bovine o porcine) e le cellule endoteliali cerebrali immortalizzate (RBE4, MBEC, TR-BBB). Le prime, se lasciate crescere in coltura per tempi brevi, mantengono la maggior parte delle caratteristiche della BBB. Le cellule immortalizzate, invece, mostrano la capacità, innata o indotta mediante manipolazione genetica, di ritardare la morte cellulare; esse posseggono elevata velocità di proliferazione e vanno incontro a numerosi cicli cellulari; pertanto risultano più convenienti, da coltivare e conservare.

Tra i modelli *in vitro* di BBB, di più recente realizzazione, vi sono sistemi di co-coltura che prevedono l'impiego di BCEC_S di ratto e neuroni e/o astrociti (Savettieri G. *et al.*, 2000; Cestelli A. *et al.*, 2001; Schiera G. *et al.*, 2003; Schiera G. *et al.*, 2005).

In alternativa, possono essere impiegate linee cellulari di origine non endoteliale. Tra queste le più utilizzate sono la ECV304, derivante da carcinoma vescicale umano, la MDR1-MDCK (I o II) e la linea cellulare Caco-2 derivante da carcinoma umano del colon (Abbott N.J., 2004, Mensch J. *et al.*, 2009; Garberg P. *et al.*, 2005; Nicolazzo J.A. *et al.*, 2006; Terasaki T. *et al.*, 2003; Lundquist S. e Renftel M., 2002; Gumbleton M. e Audus K.L., 2001).

A differenza degli enterociti, le cellule Caco-2 sono immortalizzate e si replicano rapidamente dando origine a monostrati. Raggiunta la confluenza, esse cominciano a polarizzare e formare giunzioni strette creando un sistema ideale per gli studi di permeabilità. Tale modello permette di valutare la diffusione di molecole attraverso meccanismi sia di tipo passivo sia *carrier* mediato. Durante il processo di differenziazione esse esprimono, inoltre, sul versante apicale del monostrato, molti

trasportatori tra i quali le proteine associate alla resistenza multipla ai farmaci (MRPs) e la P-glicoproteina (Li C. *et al.* 2008). Quest'ultimo trasportatore, presente anche a livello cerebrale, regola l'efflusso di molti composti ed è implicato, pertanto, nei meccanismi di difesa del SNC da farmaci potenzialmente nocivi.

I modelli basati sull'impiego di colture cellulari tengono conto di diversi fenomeni, quali:

3. processi di diffusione transcellulare e paracellulare;
4. metabolismo enzimatico;
5. processi di trasporto attivo;
6. Interazioni tra farmaco e materiale cellulare (Gumbleton M. e Audus K.L., 2001).

Essi, rispetto ai modelli di permeazione *in vivo*, mostrano diversi vantaggi:

- minore quantità di composto necessario per gli studi;
- possibilità di valutare i meccanismi di trasporto implicati;
- valutazione immediata dei segni di tossicità cellulare;
- possibilità di valutare il meccanismo di azione molecolare;
- convalida di teorie sulle relazioni struttura-attività;
- costi minori (Lundquist S. e Renftel M., 2002).

Di contro i modelli *in vitro* mostrano anche alcune limitazioni:

- il tempo e le risorse tecniche necessarie per l'isolamento del tessuto, la raccolta e la semina delle cellule (in particolare per i modelli che utilizzano colture di cellule endoteliali cerebrali);
- la variabilità nelle caratteristiche fenotipiche delle cellule appartenenti a diversi lotti di origine;
- le differenze morfologiche e funzionali delle linee cellulari di origine non cerebrale rispetto alla BBB (Di Li *et al.*, 2009).

Per mimare la selettività chimico-fisica della BBB, una promettente tecnologia è rappresentata dai Parallel Artificial Membrane Permeability Assays (PAMPA). Si tratta di modelli *in vitro*, basati sull'impiego di membrane artificiali, non biologiche, imbibite con opportune miscele lipidiche.

Per l'applicazione del modello si fa uso di un sistema a sandwich costituito da due piastre in policarbonato con 96 pozzetti Transwell. Si tratta di sistemi a due compartimenti chiusi in cui la membrana che separa i due compartimenti, generalmente in polivinilidenefluoruro (PVDF), viene imbibita con miscele lipidiche, al fine di simulare i domini idrofili e lipofili caratteristici della BBB (Figura 53).

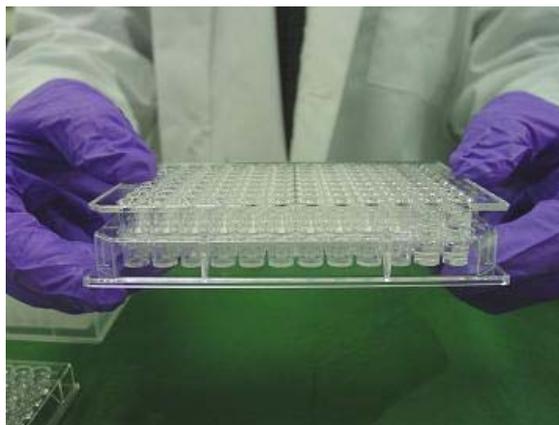


Figura 53. Sistemi transwell in policarbonato

Il primo modello PAMPA è stato descritto da Kansy et al., con l'obiettivo di studiare l'assorbimento gastro-intestinale di diverse molecole, utilizzando filtri impregnati di una soluzione lipofila di lecitina (Kansy M. *et al.*, 2001).

Modificando la composizione della fase lipidica delle membrane artificiali, sono stati sviluppati diversi modelli PAMPA, utili per predire con elevata accuratezza, la capacità dei composti di raggiungere il SNC (Mensch J. *et al.*, 2010a).

Uno studio del 2010, condotto da Mensch et al., ha messo a confronto diversi modelli PAMPA, allo scopo di individuare quale tra questi riuscisse a mimare, con maggiore precisione, le caratteristiche di permeabilità della BBB.

I quattro modelli analizzati sono stati:

- PAMPA-BLM (black lipid membrane);
- PAMPA-DS (double-sink);
- PAMPA-BBB (blood-brain barrier);
- PAMPA-BBB-UWL (unstirred water layer).

I risultati ottenuti, messi a confronto con i valori di LogBB, derivanti dagli esperimenti *in vivo*, e con i dati ottenuti dagli studi di permeazione utilizzando colture cellulari del tipo Caco-2, hanno dimostrato che i modelli PAMPA-BBB e PAMPA-BLM sono i più adatti a raggiungere tale scopo; in tali sistemi PAMPA, le membrane di PVDF venivano imbibite rispettivamente con:

- PBL (polar brain lipid), un estratto lipidico cerebrale porcino solubilizzato in dodecano (20 mg/ml), avente composizione riportata nella seguente tabella:

<i>Componenti</i>	<i>%</i>
Fosfatidiletanolamina	33.1
Fosfatidilserina	18.5
Fosfatidilcolina	12.6
Acido fosfatidico	0.8
Fosfatidilinositolo	4.1
Cerebrisidi, solfatidi, pigmenti	30.9

Tabella 15. Composizione del Polar Brain Lipid o PBL

- BLM (black lipid membrane), una soluzione di dioleoilfosfatidilcolina in dodecano, al 2 % (w/v).

In particolare, il modello PAMPA-BBB ha permesso di predire e discriminare con più accuratezza i farmaci in grado di permeare attraverso la BBB, definiti BBB+ e farmaci, invece, con scarsa attitudine ad attraversarla, definiti BBB-.

Esso ha mostrato, inoltre, diversi vantaggi quali:

- semplicità e velocità nella sperimentazione;
- bassi costi;
- elevata riproducibilità (Di Li *et al.*, 2003).

In generale, i modelli PAMPA, consentono di valutare soltanto la diffusione passiva, per via transcellulare, dei composti; è necessario quindi integrare i risultati ottenuti con quelli derivanti da altre tecniche *in vitro*.

4.3.1 Valutazione dell'attitudine di un nuovo derivato aminoacidico della dopamina (DA-Phen) ad attraversare la BBB

In precedenza, nel medesimo laboratorio dove è stata svolta questa tesi di Dottorato, è stato sintetizzato un nuovo derivato, l'L-fenilalanina- β -(3,4-diidrossifenil)etilamide (**DA-Phen**) (Figura 54) allo scopo di superare i limiti di permeabilità imposti dalla BBB nei confronti di farmaci attivi a livello del SNC. Esso, ottenuto mediante coniugazione del neurotrasmettitore dopamina con l'aminoacido essenziale L-Fenilalanina, potrebbe rappresentare un ottimo candidato per il trattamento della malattia di Parkinson.

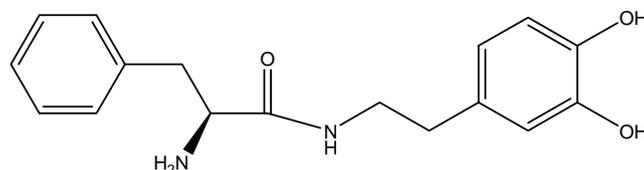


Figura 54. Struttura chimica dell' L-Fenilalanina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide (DA-Phen)

Studi di stabilità in omogenato di cervello di ratto hanno mostrato che il nuovo derivato si comporta da *profarmaco*: esso subisce attivazione da parte degli enzimi cerebrali, con lenta e costante liberazione di dopamina (Giannola L.I. *et al.*, 2008).

Il composto presenta un valore di *logD* di 0,76. Come è noto, il valore del coefficiente di distribuzione può dare importanti informazioni sull'attitudine di una

molecola a permeare le membrane biologiche. Recenti studi riportati in letteratura indicano, infatti, che valori di log D compresi tra 0 e 3 rappresentano una caratteristica ottimale per l'attraversamento della BBB (Giannola L.I. *et al.*, 2008; Gimenez F. *et al.*, 2004; De Caro V. *et al.*, 2011).

Sulla base di tali considerazioni, ci si è proposti di valutare la permeabilità *in vitro* del nuovo derivato **DA-Phen**, precedentemente sintetizzato, alla BBB. Per indagare i meccanismi di trasporto coinvolti in tale passaggio, ci si è avvalso dell'impiego sia del modello PAMPA-BBB che della linea cellulare Caco-2.

Ad ogni modo, data l'elevata complessità funzionale della BBB, le informazioni di permeazione, sia passiva che *carrier* mediata, derivanti dagli studi *in vitro* dovranno, nelle fasi successive della sperimentazione, essere integrate con gli studi *in vivo* (Abbott N.J., 2004).

4.3.1.1. Studi di permeabilità mediante modello PAMPA-BBB

Tra una serie di modelli *in vitro* descritti in letteratura per lo studio dell'attraversamento della BBB, è stato selezionato il PAMPA-BBB (Mensch J. *et al.*, 2010b). Esso consente di valutare l'attitudine delle molecole a permeare attraverso la BBB mediante diffusione passiva, per via transcellulare.

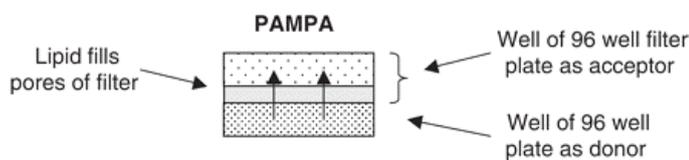


Figura 55. Rappresentazione schematica del modello PAMPA

Riprodurre con esattezza la composizione lipidica delle membrane endoteliali della BBB risulta estremamente difficile, a causa della sua complessità e variabilità (età, specie, sesso ed altri fattori). Tuttavia, l'estratto lipidico di cervello porcino (PBL) mostra, approssimativamente, gli stessi rapporti in componenti fosfolipidici presenti *in vivo* nell'uomo. Pertanto, l'utilizzo di tale estratto permette di mimare la composizione lipidica delle membrane endoteliali della BBB e di ottenere risultati affidabili in modo semplice, riproducibile e con bassi costi (Di Li *et al.*, 2003).

Al fine di verificare la validità del modello prescelto, sono stati condotti esperimenti di permeazione utilizzando due diverse molecole standard, la carbamazepina e la teofillina, il cui profilo di permeazione attraverso la BBB è riportato in letteratura; la scelta è ricaduta su tali molecole in quanto esse rappresentano esempi di molecole rispettivamente BBB+ e BBB-. Sono state testate soluzioni di carbamazepina e teofillina alle concentrazioni riportate in letteratura (Mensch J. *et al.*, 2010b; Di Li *et al.*, 2009). Gli esperimenti sono stati condotti per 18 ore alla temperatura di $22 \pm 0,5$ °C e sotto costante agitazione. La valutazione della quantità di farmaco permeata è stata effettuata mediante analisi spettrofotometrica UV-Vis. E' stata, quindi, calcolata la permeabilità effettiva (P_e).

La carbamazepina mostra un valore di P_e pari a $8,42 \cdot 10^{-6}$ e la teofillina un valore di $0,15 \cdot 10^{-6}$. I suddetti valori, risultano perfettamente sovrapponibili a quelli riportati in letteratura (Mensch J. *et al.*, 2010b; Di Li *et al.*, 2009), evidenziando così la validità del modello scelto.

Al fine di valutare preliminarmente il comportamento del **DA-Phen** nelle condizioni sperimentali delle PAMPA, sono stati condotti studi preliminari di stabilità del composto in soluzione acquosa, mediante analisi spettrofotometriche UV-Vis ed analisi HPLC. In particolare, è stata valutata la stabilità chimica in soluzione tampone pH 7.0 nel range di lunghezza d'onda compreso tra 200 e 800 nm per 6 ore. Al tempo zero, lo spettro UV del profarmaco mostra un massimo di assorbimento a 281 nm e non si osservano assorbimenti significativi tra 360 e 800 nm. Tale andamento rimane invariato fino a 60 minuti. Dopo circa 1 ora dall'inizio dell'esperimento, si osserva un lento ma graduale aumento dell'assorbanza specifica a $\lambda = 281$ nm, indice di una progressiva degradazione del prodotto. E' noto, infatti, che le soluzioni acquose dei derivati della dopamina subiscono degradazione ossidativa pH dipendente (Giannola L.I. *et al.*, 2008). Le analisi HPLC hanno confermato tali risultati: dopo circa 90 minuti si assiste ad una lenta e costante riduzione del picco cromatografico relativo al **DA-Phen**.

Al fine di stabilizzare il **DA-Phen** in soluzione acquosa a pH 7.0, sono state scelte ed impiegate molecole note per la loro capacità antiossidante quali N-acetilcisteina (NAC) e trealosio (TRH) (Giandalia G. *et al.*, 2001; Aitio M-L., 2006). Sono state,

quindi, preparate e testate soluzioni di **DA-Phen** in presenza di NAC in diversi rapporti. Un rapporto DA-Phen /NAC pari a 20/1 consente di mantenere il profarmaco stabile fino ad 1 ora. Riducendo il rapporto DA-Phen /NAC a 10/1 e 2/1 si assiste ad una stabilizzazione progressiva fino a 3 ore, che pertanto non è stata ritenuta sufficiente ai fini degli esperimenti PAMPA da condurre.

Parallelamente, è stata valutata la capacità stabilizzante del trealosio (TRH), aggiunto al 20% (w/v), alla soluzione di **DA-Phen**. In queste condizioni, il profarmaco rimane stabile fino a 24 ore.

Alla luce dei risultati di stabilità chimica, per gli esperimenti di permeazione impiegando il modello PAMPA-BBB nel compartimento donatore è stata posta una soluzione di **DA-Phen** in soluzione tampone pH 7.0 con aggiunta di TRH al 20%, poiché quest'ultimo è in grado di stabilizzare il profarmaco per il tempo necessario a condurre gli esperimenti. Gli esperimenti sono stati condotti alla temperatura di $22 \pm 0,5$ °C e sotto costante agitazione, utilizzando come fase accettrice la soluzione tampone pH 7.0 in presenza di TRH.

Sono state testate soluzioni del profarmaco a due diverse concentrazioni: 200 e 400 μM .

Per poter valutare se l'andamento della permeazione potesse essere influenzato dal tempo di incubazione, sono state condotte due serie di esperimenti: una prima serie per 18 ore ed una seconda per 24 ore.

La quantità di **DA-Phen** permeata nel compartimento accettore e la quantità residua nel compartimento donatore, è stata determinata mediante analisi HPLC, utilizzando la relativa curva di taratura.

I valori di P_e (espressi come media di 6 esperimenti) sono stati calcolati e riportati nella seguente tabella (Tabella 16)

<i>Tempo di incubazione</i>	<i>P_e (cm/s) DA-Phen 200 μM</i>	<i>P_e (cm/s) DA-Phen 400 μM</i>
18 h	$3,02 * 10^{-7}$	$5,30 * 10^{-7}$
24 h	----	$6,50 * 10^{-7}$

Tabella 16. Valori di P_e calcolati sperimentalmente

Dai dati riportati si evince che il tempo di incubazione non influenza significativamente il processo di permeazione. Dal calcolo del bilancio di massa tra la quota permeata nell'accettore e quella residua nel donatore si è, inoltre, osservato che circa il 5-10% del **DA-Phen** rimane ritenuto in membrana.

4.3.1.2. Studi di permeabilità mediante modello Caco-2

Al fine di ricavare informazioni sulla possibile implicazione di trasportatori di membrana nel processo di permeazione della molecola, sono stati condotti studi di permeazione *in vitro* impiegando la linea cellulare Caco-2. Tale linea cellulare, derivante da carcinoma umano del colon, in coltura, si differenzia in monostrati enterocita-like polarizzati; a differenza degli enterociti, è una linea di cellule immortalizzate in grado di replicarsi rapidamente dando origine a monostrati. Raggiunta la confluenza, queste cellule formano giunzioni strette, creando un sistema ideale per gli studi di permeabilità.

Durante il processo di differenziazione le cellule Caco-2 esprimono, inoltre, sul versante apicale del monostrato, diversi sistemi di trasporto, coinvolti sia nei processi di influsso sia in quelli di efflusso di vari substrati (Li C. *et al.*, 2008).

Tale modello, pertanto, consente di studiare la diffusione di molecole attraverso meccanismi sia di tipo passivo che *carrier* mediato; l'impiego di tale modello può fornire, inoltre, informazioni utili sugli eventuali meccanismi di resistenza della BBB anche nei confronti del DA-Phen.

Al fine di evitare l'eventuale shock osmotico a carico delle cellule, dovuto alla soluzione ipertonica di TRH al 20%, si è scelto di condurre gli esperimenti di permeazione *in vitro* impiegando le soluzioni di **DA-Phen**: secondo quanto osservato dagli studi di stabilità chimica, infatti, nelle 2 ore necessarie a condurre gli esperimenti, il processo degradativo del nuovo derivato può essere considerato irrisorio.

Preliminarmente agli esperimenti di permeazione, sono stati condotti studi per verificare possibili fenomeni di tossicità del **DA-Phen** nei confronti della linea cellulare Caco-2.

Sono state testate soluzioni in un range di concentrazione di profarmaco compreso tra 50 μM e 200 μM (soluzione di DA-Phen 200, 100 e 50 μM)

I monostrati cellulari sono stati incubati in presenza di tali soluzioni per un tempo pari a 2 ore, al termine del quale è stato eseguito l'MTT test. L'MTT è un saggio di vitalità cellulare di tipo colorimetrico che valuta l'attività delle deidrogenasi mitocondriali presenti in cellule vive. Tale test si basa, infatti, su un indicatore metabolico, il sale solubile di tetrazolio (MTT) di colore giallo che, a livello dei mitocondri delle cellule vitali, viene ridotto a formazano, un cristallo di colore porpora e insolubile in acqua (Figura 56).

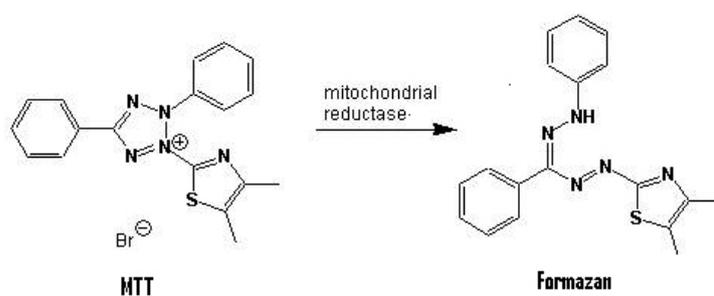


Figura 56. Riduzione del sale di tetrazolio in formazano

L'aumento o la diminuzione del numero delle cellule vitali determina una variazione nella quota di formazano prodotta. I risultati, riportati come media di 3 esperimenti per ogni soluzione testata, sono stati espressi come valori di assorbanza (Abs) e riportati in funzione della concentrazione. I dati sono stati messi a confronto con i valori di assorbanza ottenuti per il controllo (soluzione tampone isotonica pH 7.0).

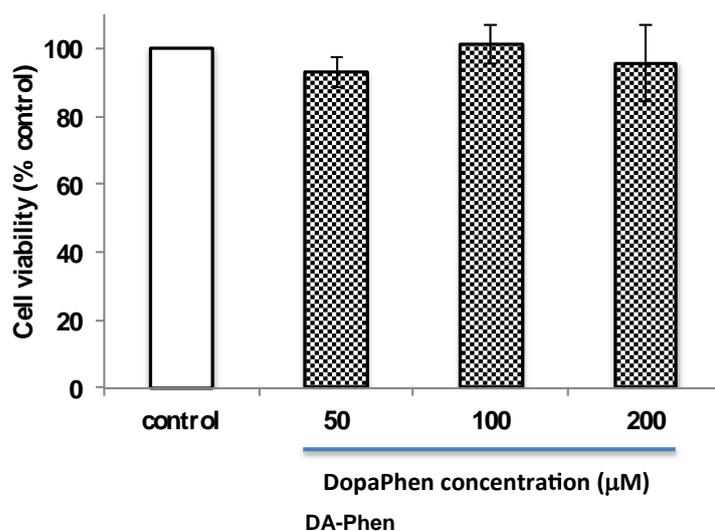


Figura 57. Vitalità delle cellule Caco-2 differenziate, dopo 2 ore di esposizione al DA-Phen nel range di concentrazione 50-200 µM

Comparando il controllo con le soluzioni testate non si assiste ad una significativa riduzione della vitalità cellulare. In particolare, come si evince dalla figura.....le soluzioni del **DA-Phen** non determinano alterazioni della vitalità cellulare a tutte le concentrazioni testate, indice che eventuali prodotti di degradazione del profarmaco non risultano essere tossici.

Alla luce dei risultati ottenuti, sono stati effettuati studi di permeazione del **DA-Phen** impiegando la linea cellulare Caco-2; in particolare, è stata testata la soluzione di **DA-Phen** 100 µM.

Gli studi sono stati condotti utilizzando dispositivi Transwell a 12 pozzetti, analoghi a quelli descritti per il modello PAMPA. In particolare essi sono costituiti da un compartimento apicale (A) separato da quello basolaterale (B) per mezzo di una membrana permeabile, su cui viene coltivato il monostrato cellulare (Figura 58).

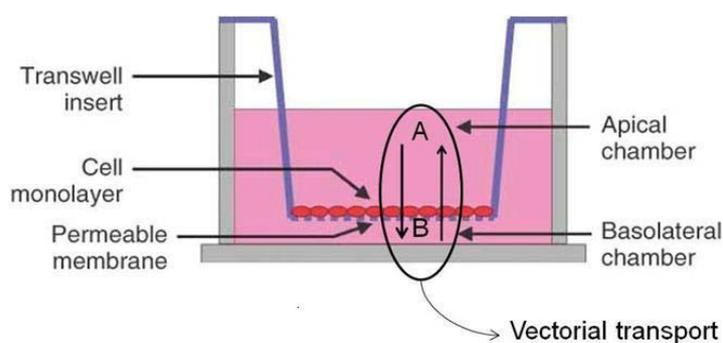


Figura 58. Rappresentazione schematica del sistema Transwell

Mediante tale sistema, è stato valutato sia il trasporto dal versante apicale a quello basolaterale (A→B) che l'eventuale fenomeno di efflusso del profarmaco dal versante basolaterale a quello apicale (B→A).

Gli esperimenti sono stati condotti alla temperatura di 37 °C per un tempo di 2 ore. Al fine di mantenere le condizioni “sink”, ad ogni *time point* (15 minuti), l'intero volume della soluzione accettrice è stato prelevato ed immediatamente rimpiazzato con l'opportuno fluido fresco. Trascorse le 2 ore, il sistema è stato disassemblato e tutti i campioni sono stati analizzati mediante analisi HPLC utilizzando la relativa curva di taratura.

Dai risultati ottenuti il valore di permeabilità apparente è stato calcolato pari a $3.36 \pm 0.02 \cdot 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$.

Per gli esperimenti di efflusso del profarmaco dal versante basolaterale a quello apicale, è stato calcolato un valore di P_{app} di $1.75 \pm 0.07 \cdot 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$

E' stato, quindi calcolato il valore di *efflux ratio*.

Da quanto riportato in letteratura, si evince che se il valore di *efflux ratio* risulta superiore a 2, la molecola è classificabile come substrato per i sistemi di efflusso mediati dalla P-glicoproteina (Mensch J. *et al.*, 2010). Il valore di *efflux ratio* calcolato per il **DA-Phen** è risultato pari a $0.52 \pm 0,02$, indice, quindi, di una bassa affinità per la proteina di efflusso.

Infine, comparando i valori di permeabilità, ottenuti utilizzando rispettivamente il modello PAMPA-BBB e la linea cellulare Caco-2, si osserva che il trasporto del DA-Phen attraverso la linea cellulare risulta 100 volte maggiore rispetto a quanto osservato per il modello PAMPA-BBB (Tabella 17).

	P_e (cm/s)	$P_{app} A \rightarrow B$ (cm/s)
<i>DA-Phen 100 μM</i>	$3,02 \cdot 10^{-7}$	$3,36 \cdot 10^{-5}$

Tabella 17. Confronto tra i valori di permeabilità ottenuti con il modello PAMPA-BBB e la linea cellulare Caco-2

Dalla combinazione dei risultati ottenuti sfruttando i due modelli di permeazione *in vitro*, è possibile ipotizzare che l'attraversamento della BBB da parte del DA-Phen avvenga mediante una combinazione di due diversi meccanismi: diffusione passiva e trasporto carrier-mediato.

Inoltre, i risultati degli esperimenti di efflusso hanno dimostrato che la molecola non è classificabile come substrato per i sistemi di efflusso mediati dalla P-glicoproteina.

4.4 PARTE SPERIMENTALE DELL'APPROCCIO SINTETICO

4.4.1 Materiali e apparecchiature

I componenti utilizzati per la preparazione delle soluzioni tampone sono stati acquistati presso la ditta VWR International (Leuven, Belgium), il trealosio (TRH) presso la ditta Hayashibara Shojj (Hayashibara Shojj inc., Okayama, Giappone), il Polar Brain Lipid Porcin Extract (PBL, Avanti Polar Lipids Inc.) presso la ditta Spectra 2000 Srl (Roma, Italy), l'n-dodecano presso la ditta Merck (Hohenbrunn, Germany). La 3,4-dimetossifenilettilamina (**1**) presso la ditta Sigma-Aldrich (Germania), l'N-Boc-L-Leucina (**2**) l'N-Boc-L-Triptofano (**3**) presso la ditta Nova-Biochem, la 4-dimetil-amino-piridina (DMAP) (**4**) e la dicicloesilcarbodiimmide (DCC) (**5**) presso la ditta Acros Organics (USA), l'acido trifluoroacetico (TFA) e il tribromuro di boro (BBr₃) presso la ditta Alfa Aesar (Germania).

Il composto L-fenilalanina-β-(3,4-diidrossifenil) etilamide (**DA-Phen**) è stato sintetizzato nei laboratori presso cui ho svolto il mio lavoro di ricerca, afferenti al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF) (Giannola L.I. *et al.*, 2008)

L'analisi TLC è stata condotta utilizzando lastre di gel di silice da 0.20 mm, stratificate su lamine di alluminio, contenenti indicatore di fluorescenza F254, prodotte da Merck KGaA (Germany) e visualizzate usando una lampada UV a $\lambda = 254$ nm.

Gli spettri FT-IR sono stati registrati in un range di 4000-400 cm⁻¹, utilizzando uno spettrofotometro Perkin-Elmer RX I, operante in trasformata di Fourier. Le frequenze sono state misurate con media di 20 scansioni.

Gli spettri UV sono stati registrati con uno spettrofotometro a doppio raggio Shimadzu UV-Vis mod. 1700 PharmaSpec.

Gli spettri ¹³C ed ¹H N.M.R. sono stati registrati con uno spettrometro Bruker Avance Series 300, operante in trasformata di Fourier a 300 MHz per gli spettri del protone e a 75,4 MHz per gli spettri del carbonio, in soluzione di CD₃OD. I valori di ¹H ed ¹³C chemical shift sono stati misurati relativamente ai segnali del CD₃OD, centrati rispettivamente a 5.10 e 49.00 ppm a campi più bassi del TMS.

I punti di fusione sono stati determinati, in capillare, con una apparecchiatura Büchi 530.

Gli studi di trasporto mediante metodo PAMPA-BBB sono stati condotti utilizzando un sistema Transwell a sandwich costituito da due piastre in policarbonato con 96 pozzetti, Millipore MultiScreen-IP PAMPA (cat.MAIPNTR10 e MATRNPS50, Billerica, Massachussets).

La temperatura e l'agitazione nelle prove di trasporto sono state regolate utilizzando un incubatore Thermo-Shaker PHMP/PHMP-4 Grant-Bio (Shepreth, Cambridgeshire).

La soluzione tampone pH 7.0 è stato preparata solubilizzando 7,3 g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 3,81 g di KH_2PO_4 in un litro di acqua distillata.

Le analisi HPLC sono state effettuate con un apparecchio HPLC Agilent dotato di un sistema a quattro pompe VL 1260 Infinity e un detector UV 1260 VL+ Infinity, un loop da 20 μl e un sistema di integrazione computerizzato (OpenLAB CDS ChemStation Workstation). La separazione cromatografia è stata realizzata su una colonna a fase inversa Gemini – NX 5 μm C18 110A (Phenomenex 150 x 4.6 mm, 5 μm), utilizzando come fase mobile una miscela di acido trifluoroacetico (0,01%) e metanolo (gradiente: 95:5→70:30→95:5). Il flusso della fase mobile è stato settato ad 1 ml/min. In queste condizioni il tempo di ritenzione del **DA-Phen**, della dopamina e dell'L-leucina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide sono rispettivamente di 7,2, 1,9 e di 8,6 minuti. Per integrare l'area dei picchi è stata utilizzata l'opportuna curva di calibrazione; questa è stata ottenuta in un range di concentrazione compreso tra 0.02 e 0.12 mg/ml sia per il **DA-Leu** che per il **DA-Phen**, ed in un range compreso tra 0.002-0.10 mg/ml per la Dopamina.

Le analisi HPLC relative al **DA-Tryp** sono state effettuate con un apparecchio Shimadzu LC-10AD_{VP} (Giappone), dotato di un sistema a due pompe LC-10AD_{VP}, un detector UV a diodi SPD-M20A, un loop da 20 μl e un sistema di integrazione computerizzato (EZ start 7.3 software). La separazione cromatografia è stata realizzata su una colonna a fase inversa Gemini – NX 5 μm C18 110A (Phenomenex 150 x 4.6 mm, 5 μm), utilizzando come fase mobile una miscela di acido trifluoroacetico (0,01%) e acetonitrile (gradiente: 95:5→ 93:7→70:30→95:5). Il flusso della fase mobile è stato settato ad 1 ml/min. In queste condizioni il tempo di ritenzione del L-Triptofano- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide, dell'L-Triptofano e della dopamina sono rispettivamente di 14,8, 9 e 2.4 minuti. Per integrare l'area dei picchi è stata utilizzata l'opportuna

curva di calibrazione; questa è stata ottenuta in un range di concentrazione compreso tra 0.02 e 0.12 mg/mL per il DA-Tryp, ed in un range compreso tra 0.005-0.05 mg/mL per l' L-Triptofano e la Dopamina.

4.4.2 Metodi

4.4.2.1. Sintesi dell'L- Leucina - β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (DA-Leu)

4.4.2.1.1 Sintesi dell' N-Boc-L-Leucina - β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

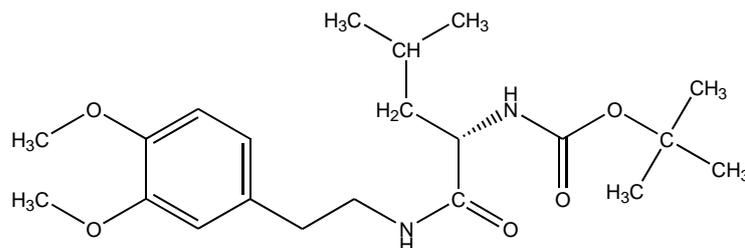
1,25 g (0,005 moli) di N-Boc-L-Leucina (**2**) e 0,061g (0,0005 moli) di DMAP (**4**) vengono solubilizzati in 30 ml di diclorometano. Dopo 10 minuti, alla soluzione si aggiungono 0,92 g (0,005 moli) di 3,4-dimetossifenilettilamina (**1**) e dopo ulteriori 30 minuti si aggiungono 1.03 g (0,005 moli) di DCC (**5**). La reazione viene mantenuta a temperatura ambiente, sotto agitazione ed al riparo dalla luce per 4 h. L'andamento della reazione viene monitorato mediante TLC (miscela eluente: etile acetato/metanolo/cloroformio nel rapporto 50/20/30). Al termine di tale intervallo, alla miscela di reazione vengono aggiunti 0.5 ml di acqua, al fine di far reagire la DCC in eccesso e trasformarla tutta in dicitocloesilurea (DCU) (**8**). In tal modo si dà termine alla reazione di sintesi.

La miscela di reazione viene quindi trattata con Na₂SO₄ anidro e filtrata, per allontanare le eventuali tracce d'acqua presenti. La fase organica viene successivamente evaporata a pressione ridotta fino a totale eliminazione del solvente. Il risultante materiale grezzo viene lavato con 2 x 40 ml di acetone freddo (0°C), per eliminare buona parte della DCU, che essendo insolubile in acetone freddo viene allontanata per filtrazione. Il filtrato, dopo evaporazione a pressione ridotta forma un residuo oleoso che viene cristallizzato a caldo da cloroformio/cicloesano in rapporto 1/7. Per raffreddamento, si separa un prodotto bianco pulverulento, con le seguenti caratteristiche:

- p.f. 91 – 93 °C;
- UV (metanolo): $\lambda_{\max} = 279.5$ nm;
- IR (nujol): 3400-3348 (-NH indolico + -NH amidico), 1680 (C=O amidico), 1656 (C=O uretanico), 1518 (-NH amidico), 1264 e 1159 (C-O-C) cm⁻¹;

I dati relativi agli spettri ¹³C ed ¹H-NMR sono riportati nella tabella 14.

Al prodotto viene assegnata la struttura di:



N-Boc-L-Leucina- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (6).

La resa della reazione è del 62 %.

4.3.2.1.2. Idrolisi dell' N-Boc-L- Leucina - β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

250 mg (0,006 moli) dell'addotto (6) vengono solubilizzati in 3 ml di diclorometano e successivamente trattati con 3 ml di acido trifluoroacetico (TFA) concentrato.

La miscela viene lasciata a reagire per 24 ore, sotto agitazione alla temperatura di 20°C.

L'andamento della reazione viene monitorato mediante TLC (miscela eluente: etile acetato/metanolo/cloroformio nel rapporto 50/20/30). Al termine della reazione si aggiunge, goccia a goccia, una soluzione acquosa satura di bicarbonato di sodio, fino al raggiungimento di un pH pari a 8. La miscela viene di seguito filtrata e vengono separate le due fasi. La frazione organica, ricca in prodotto desiderato, viene deumidificata per trattamento con Na₂SO₄ anidro. Dopo filtrazione, la soluzione organica viene evaporata a pressione ridotta, fino all'ottenimento di un residuo oleoso.

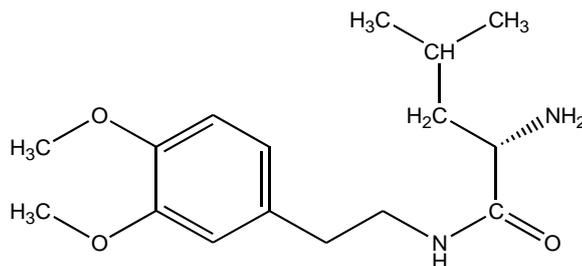
Tale residuo, viene solubilizzato a temperatura ambiente in etile acetato per favorire la precipitazione del sale sodico dell'acido trifluoroacetico, presente nel grezzo.

Dopo filtrazione la fase organica viene evaporata sotto vuoto. Si ottiene un residuo oleoso che viene cristallizzato a caldo con etile acetato. Per successivo raffreddamento, si separa un prodotto bianco pulverulento, con le seguenti caratteristiche:

- p.f. 135 – 137 °C;
- UV (metanolo): $\lambda_{\text{max}} = 279.5 \text{ nm}$;
- IR (nujol): 3400-3200 (-NH indolico + -NH amidico + NH₂), 1672 (C=O amidico), 1459 (-NH amidico).

I dati relativi agli spettri ¹³C ed ¹H-NMR sono riportati nella tabella 14

Al prodotto ottenuto viene assegnata la struttura di:



L-Leucina- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (9).

La resa della reazione è del 64 %.

4.3.2.1.3. Demetilazione dell'*L*-Leucina - β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

1,00 g (0,0035 moli) del prodotto (9) viene solubilizzato in 80 ml di diclorometano anidro e posto a reagire con 14 ml (0,014 moli) di una soluzione 1 M di tribromuro di boro (BBr_3) in diclorometano.

La reazione viene condotta a riflusso di solvente alla temperatura di 60°C , sotto continua agitazione ed al riparo della luce, per 2 h. Successivamente, vengono aggiunti 20 ml di metanolo e si lascia reagire per ulteriori 2 ore.

L'andamento della reazione viene monitorato ogni 30 minuti mediante TLC (miscela di eluizione: cloroformio/metanolo 80/20). Trascorso il dovuto intervallo di tempo, la soluzione risultante viene evaporata sotto vuoto.

Allo scopo di allontanare il trimetilborato $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$, presente nel grezzo di reazione, il residuo ottenuto viene nuovamente solubilizzato in metanolo ed evaporato sotto vuoto; in questo modo il $\text{B}(\text{OCH}_3)_3$ viene allontanato sfruttando la sua capacità di formare una miscela azeotropica con il metanolo. Successivamente, il residuo viene riscaldato al fine di allontanare il bromuro di metile (CH_3Br) e l'acido bromidrico (HBr), formatisi durante la reazione.

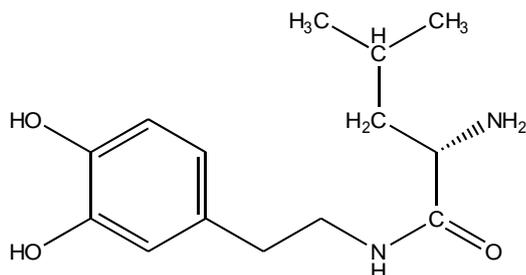
Infine, il residuo oleoso ottenuto viene cristallizzato da metanolo/diclorometano in rapporto 1: 7.

Il solido, separato per filtrazione, mostra le seguenti caratteristiche:

- p.f. 145°C ;
- UV (metanolo): $\lambda_{\text{max}} = 282 \text{ nm}$;
- IR (nujol): 3400-3200 (-NH indolico + -NH amidico + NH_2), 1671 ($\text{C}=\text{O}$ amidico), 1516 (-NH amidico).

I dati relativi agli spettri ^{13}C ed ^1H -NMR sono riportati nella tabella 14

Al prodotto è assegnata la seguente struttura:



L-Leucina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide (11).

La resa della reazione è del 70 %.

4.4.2.2. Sintesi dell' *L*-Tryptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (*DA-Tryp*)

4.4.2.2.1. sintesi dell' *N*-Boc-*L*-Tryptofano- β -(3,4-dimetossifenil)etilamide

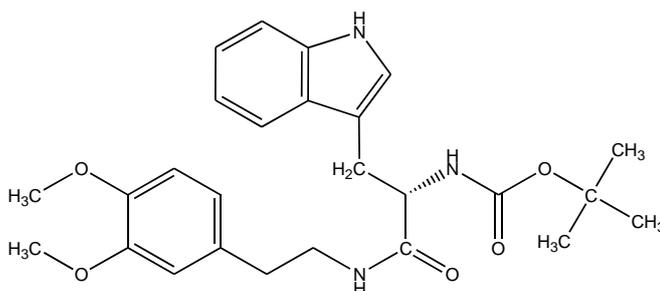
1,52 g (0,005 moli) di *N*-Boc-*L*-Tryptofano (**3**) e 0,061g (0,0005 moli) di DMAP (**4**) vengono solubilizzati in 30 ml di diclorometano. Dopo 10 minuti, alla soluzione si aggiungono 0,92 g (0,005 moli) di 3,4-dimetossifeniletilamina (**1**) e dopo ulteriori 30 minuti si aggiungono 1,03 g (0,005 moli) di DCC (**5**). La reazione viene mantenuta a temperatura ambiente, sotto agitazione ed al riparo dalla luce per 2 h e 30 minuti. Dopo tale intervallo di tempo, il grezzo di reazione subisce gli stessi trattamenti illustrati nel paragrafo 4.4.2.1.1.

Il prodotto finale, ottenuto per cristallizzazione in etile acetato, mostra le seguenti caratteristiche:

- p.f. 118 - 120;
- UV (metanolo): $\lambda_{\max} = 277.4$ nm;
- - IR ((nujol)): 3400-3348 (-NH indolico + -NH amidico), 1684 (C=O amidico), 1645 (C=O uretanico), 1524 (-NH amidico), 1271 e 1158 (C-O-C) cm^{-1} .

I dati relativi agli spettri ^{13}C ed ^1H -NMR sono riportati nella tabella 1/1a.

Al prodotto viene assegnata la struttura di:



N-Boc-L-triptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (7).

La resa della reazione è del 60 %.

4.4.2.2.2. Idrolisi dell' N-Boc-L-triptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

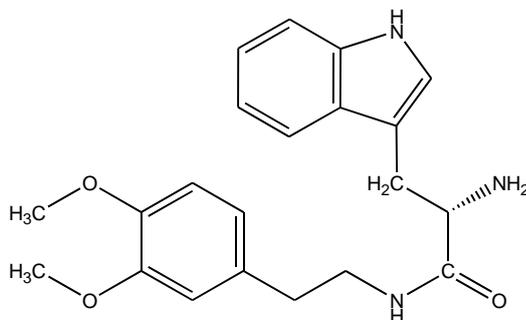
200 mg (0,0004 moli) dell'addotto (7) vengono solubilizzati in 1 ml di cloroformio e successivamente addizionati con 3 ml di acido trifluoroacetico (TFA).

L'andamento della reazione viene monitorato ogni 30 minuti mediante TLC (miscela di eluizione: etile acetato/metanolo/cloroformio nel rapporto 50/20/30). La miscela si lascia reagire per 4 ore, sotto agitazione ed alla temperatura di 20°C. Dopo tale intervallo di tempo, il grezzo di reazione subisce gli stessi trattamenti illustrati nel paragrafo 4.4.2.1.2.

Per cristallizzazione in cicloesano, si ottiene un prodotto solido bianco, con le seguenti caratteristiche:

- p.f. 90-92°C
- UV (metanolo): $\lambda_{\max} = 279.2$ nm;
- - IR (nujol): 3400-3200 (-NH indolico + -NH amidico + NH₂), 1682 (C=O amidico), 1457 (-NH amidico).

Al prodotto ottenuto viene assegnata la struttura di:



L-Triptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide (10).

La resa della reazione è del 70 %.

4.4.2.2.3 Demetilazione dell' L-Triptofano- β -(3,4-dimetossifenil) etilamide

200 mg (0,00054 moli) del prodotto (10) vengono solubilizzati in 20 ml di diclorometano anidro e posti a reagire con 2.0 ml (0,00216 moli) di una soluzione 1 M di tribromuro di boro (BBr₃).

La reazione viene condotta a riflusso alla temperatura di 60°C, sotto continua agitazione ed al riparo della luce, per 2 h. Successivamente, vengono aggiunti 20 ml di metanolo e si lascia reagire per altre 2 ore. Dopo tale intervallo di tempo, il grezzo di reazione subisce gli stessi trattamenti illustrati nel paragrafo 4.4.2.1.3.

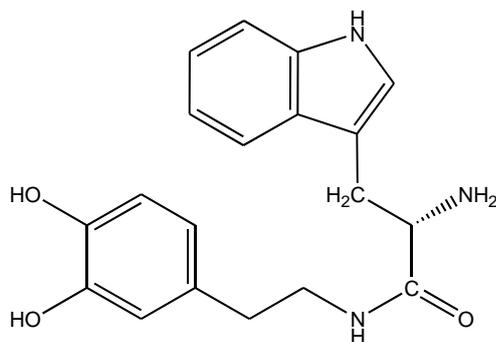
Il prodotto finale viene cristallizzato da acetato di etile/cloroformio in rapporto 1: 6.

Il solido, separato per filtrazione, mostra le seguenti caratteristiche:

- UV (metanolo): $\lambda_{\max} = 281.0$ nm;
- IR (nujol): 3400-3200 (-NH indolico + -NH amidico + NH₂), 1668 (C=O amidico), 1526 (-NH amidico).
- MS: m/z 339.9 (M⁺), 159, 137, 130, 116, 91.

I dati relativi agli spettri ¹³C ed ¹H-NMR sono riportati nelle tabelle 1/1a.

Al prodotto è assegnata la seguente struttura:



L-Triptofano-β-(3,4-diidrossifenil) etilamide (12).

La resa della reazione è del 70 %.

4.4.2.3. Determinazione del coefficiente di distribuzione a pH 7.4

Il Coefficiente di Distribuzione (D pH 7.4) dell'L-Leucina- β-(3,4-diidrossifenil) etilamide (11) e dell'L-Triptofano- β-(3,4-diidrossifenil) etilamide (12), è stato determinato a temperatura ambiente ed a una pressione di 1.013•10 Pa ed è stato espresso come **Log D**.

2.5 mg dei composti **Da-Leu** e **Da-Tryp**, vengono disciolti in una miscela bifasica composta da 20 ml di soluzione tampone fosfato a pH 7.4 e 20 ml di n-ottanolo.

Per favorire l'intimo contatto fra le due fasi e la ripartizione del prodotto, la miscela viene posta in un imbuto separatore ed agitata per 30 min. Dopo la completa separazione delle due fasi, la fase organica è stata separata da quella acquosa.

La determinazione quantitativa viene effettuata in entrambe le fasi, mediante analisi spettrofotometrica UV, utilizzando l'opportuno bianco e le relative curve di taratura.

Il valore di $D_{pH 7.4}$ è stato calcolato secondo l'equazione:

$$D_{pH 7.4} = \frac{C_i - C_w}{C_w} \left(\frac{V_w}{V_o} \right)$$

dove C_i e C_w rappresentano rispettivamente la concentrazione del farmaco prima e dopo la ripartizione, mentre V_w e V_o sono i volumi della fase acquosa e della fase organica rispettivamente.

Gli esperimenti sono stati ripetuti 3 volte e i risultati sono riportati come media ed espressi come $\text{Log } D_{pH 7.4}$.

4.4.2.4. Stabilità chimica del DA-Leu e del DA-Tryp in ambiente fisiologico

La stabilità chimica dell' L-Leucina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide e dell'L-Triptofano- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide è stata valutata ad una temperatura di 37 ± 0.5 °C utilizzando soluzioni 0.1mg/ml del relativo profarmaco in soluzione tampone (F.U. XII ed.) a diversi valori di pH:

- soluzione tampone a pH 1.3;
- soluzione tampone a pH 6.5;
- soluzione tampone a pH 7.4;
- soluzione tampone a pH 8.0.

Al fine di valutare l'eventuale scissione dell'aminoacido dalla dopamina o la formazione di prodotti di degradazione, ad intervalli di 60 minuti sono stati prelevati 25 μ l di soluzione campione, ed immediatamente analizzati mediante tecnica HPLC. I valori ottenuti sono stati valutati in riferimento alla relativa curva di taratura. Gli esperimenti sono stati condotti per 6 ore e ripetuti tre volte.

Parallelamente è stato effettuato uno studio spettrofotometrico UV-Vis nel range di λ compreso tra 200 e 800 nm per 12 ore.

Le scansioni sono state effettuate ad intervalli di 15 minuti. Ogni esperimento è stato ripetuto 3 volte.

4.4.2.5. Stabilità del DA-Leu e del DA-Tryp in plasma umano

Al fine di valutare la stabilità dei derivati in plasma umano, sono stati prelevati campioni di sangue da un donatore sano. Questi sono stati successivamente trattati con EDTA e centrifugati a 60.000 g per 10 minuti, alla temperatura di 4°C. Il plasma, dopo essere stato separato dalla frazione corpuscolata, è stato diluito al 20% con tampone fosfato (PBS) a pH 7,4.

Le miscele contenenti il relativo profarmaco in plasma vengono mantenute in un bagno termostato a 37 ± 0.5 °C e sotto costante agitazione. Ad opportuni intervalli di tempo, sono stati prelevati campioni da 25 µl ed addizionati a 25 µl di metanolo allo scopo di inattivare gli enzimi plasmatici. La miscela è stata immediatamente centrifugata a 14.000 rpm (Cenrifuge 5415 C Eppendorf, Germany) per 4 minuti. Il surnatante è stato analizzato mediante analisi HPLC. Tutti gli esperimenti di stabilità sono stati ripetuti 3 volte.

Le differenti condizioni sperimentali per i due profarmaci sono di seguito riportate:

- 100 µl di una soluzione di **DA-Leu** 1mg/ml in PBS a pH 7.4, vengono addizionati a 800 µl di plasma umano preconditionato (37 ± 0.5 °C); prelievi ogni 5 min; durata dell'esperimento 1 h.
- 100 µl di una soluzione di **DA-Tryp** 1mg/ml in PBS a pH 7.4, vengono addizionati a 800 µl di plasma umano preconditionato (37 ± 0.5 °C); prelievi ogni 30 min; durata dell'esperimento 4 h.

4.4.2.6. Stabilità del DA-Leu e del DA-Tryp in presenza di enzimi cerebrali

Il cervello espantato da ratti maschi adulti del ceppo Wistar (utilizzati secondo l'attuale normativa sugli animali da esperimento), è stato omogeneizzato in tampone di lisi (nuclei buffer NB, contenente: 50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM KCl, 0.15 mM spermina, 0.15 mM spermidina, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA) supplementato con saccarosio (0.32 M). L'omogeneizzazione è stata effettuata utilizzando un sistema di omogeneizzazione semiautomatico con rotore meccanico e potter, alla velocità di 3600 rpm per un totale di 15 colpi. Dopo aver omogeneizzato il cervello, il contenuto del potter è stato prontamente travasato in provette e centrifugato

a 60.000 g per 10 minuti, alla temperatura di 4°C. Dopo centrifugazione, il surnatante è stato frazionato in aliquote da 400 µl ciascuna che sono state conservate ad una temperatura di -20 °C fino al momento dell'utilizzo.

Le miscele contenenti il relativo profarmaco in omogenato cerebrale vengono mantenute in un bagnomaria termostato a 37± 0.5°C sotto costante agitazione. Ad opportuni intervalli di tempo, sono stati prelevati campioni da 25 µl ed addizionati a 25 µl di acetonitrile allo scopo di inattivare gli enzimi cerebrali. La miscela è stata immediatamente centrifugata a 14.000 rpm per 4 minuti (Cenrifuge 5415 C Eppendorf, Germany). Il surnatante è stato analizzato mediante HPLC. Tutti gli esperimenti di stabilità sono stati ripetuti 3 volte.

Le differenti condizioni sperimentali per i due profarmaci sono di seguito riportate::

- 100 µl di una soluzione di **DA-Leu** 1mg/ml in PBS a pH 7.4, vengono addizionati a 800 µl di omogenato di cervello di ratto preconditionati (37± 0.5 °C); prelievi ogni 30 min; durata dell'esperimento 6 h.
- 100 µl di una soluzione di **DA-Tryp** 1mg/ml in PBS a pH 7.4, vengono addizionati a 800 µl di omogenato di cervello di ratto preconditionati (37± 0.5 °C); prelievi ogni 30 min; durata dell'esperimento 4 h.

4.4.2.7. Valutazione in vitro dell'attraversamento della barriera emato-encefalica

4.4.2.7. 1. Studi di trasporto mediante modello PAMPA-BBB

4.4.2.7.2.1. Stabilità chimica dell'L-fenilalanina-β(3,4-diidrossifenil) etilamide (DA-Phen)

Gli esperimenti di stabilità chimica sono stati effettuati solubilizzando 1,0 mg di **DA-Phen** in 10 ml delle seguenti soluzioni:

- soluzione tampone pH 7,0;
- soluzione tampone pH 7.0, addizionata di TRH al 20% (w/v);
- soluzione tampone pH 7.0, addizionata di NAC in rapporto Dopa-Phen/NAC 20/1, 10/1 e 2/1.

Gli esperimenti sono stati condotti alla temperatura di 37°C.

E' stato effettuato uno studio spettrofotometrico UV-Vis nel range di lunghezza d'onda compreso tra 200 e 800 nm per 24 ore. Le scansioni sono state effettuate ad intervalli di 15 minuti. Ogni esperimento è stato ripetuto 3 volte.

Per avere maggiori informazioni relative agli esiti dei risultati ottenuti con la spettrofotometria UV-Vis, le soluzioni sono state analizzate in HPLC ad intervalli di 15 minuti. Gli esperimenti hanno avuto una durata variabile tra le 6 e le 24 ore a seconda dei composti presi in esame.

4.4.2.7.2.2. Assemblaggio del sistema PAMPA-BBB

Gli studi trasporto PAMPA-BBB sono stati condotti utilizzando un sistema a sandwich, in policarbonato, da 96 pozzetti. Il sistema è formato da due piastre: una inferiore (rappresentante il compartimento donatore) e una superiore (rappresentante il compartimento accettore), separate da un filtro in polivinilidenefluoruro (PVDF) con dimensione dei pori pari a 0,45 μm .

Nel compartimento donatore sono stati posti 270 μl della soluzione da valutare. Successivamente, i filtri in PVDF del compartimento accettore sono stati imbibiti con 4 μl di una soluzione 20 mg/ml di PBL in dodecano; infine la piastra superiore è stata collocata sulla quella inferiore e riempita con 200 μl di soluzione tampone pH 7.0. Il sistema così assemblato è stato posto ad incubare alla temperatura di $22 \pm 0,5$ °C, sotto costante agitazione, per 18 e 24 ore.

4.4.2.7.1.3 Validazione del modello PAMPA-BBB

Per validare il sistema, sono state testate soluzioni di carbamazepina e teofillina, rispettivamente alla concentrazione di 0,025 mg/ml (105 μM) e 0,009 mg/ml (50 μM). Come fase accettrice è stata utilizzata una soluzione tampone pH 7.0. Il sistema assemblato (v. paragrafo 4.4.2.7.2) è stato incubato per 18 ore, alla temperatura di $22 \pm 0,5$ °C, sotto costante agitazione (Mensch J. *et al.*, 2010a). Il sistema è stato, quindi, disassemblato e le soluzioni accettrici e donatrici sono state analizzate mediante spettrofotometria UV-Vis, ed HPLC utilizzando l'opportuno bianco e la relativa curva di taratura. In Tabella 18 sono riportati i valori λ_{max} ed $E_{1\%}$ di carbamazepina e teofillina in soluzione tampone pH 7.0. Gli esperimenti sono stati ripetuti 8 volte.

<i>Farmaco</i>	λ_{max} (nm)	$E_{1\%}$
Carbamazepina	285	0,541

Teofillina	271,5	0,536
------------	-------	-------

Tabella 18. λ_{\max} ed $E_{1\%}$ di carbamazepina e teofillina.

4.4.2.7.1.4 *Studi di permeabilità dell’L-fenilalanina- β -(3,4-diidrossifenil) etilamide (DA-Phen)*

Le soluzioni donatrici sono state preparate solubilizzando il **DA-Phen** in soluzione tampone pH 7.0 addizionata di TRH al 20% w/v. Sono state testate soluzioni di **DA-Phen** a due differenti concentrazioni: 400 μ M (0,12 mg/ml) e 200 μ M (0,06 mg/ml). Come fase accettrice è stata utilizzata la soluzione tampone pH 7.0 addizionata di TRH al 20% w/v.

Gli esperimenti di trasporto sono stati condotti, sotto costante agitazione, alla temperatura di $22 \pm 0,5$ °C per un tempo pari a 18 h per entrambe le concentrazioni e per un tempo di 24 h per la concentrazione 400 μ M. Dopo tale tempo di incubazione, il sistema è stato disassemblato e le soluzioni accettrici e donatrici sono state analizzate in HPLC mediante utilizzando l’opportuno bianco e della relativa curva di taratura. Gli esperimenti sono stati ripetuti 8 volte.

Sono state eseguite due curve di taratura di **DA-Phen**, in soluzione tampone pH 7.0 addizionata di una soluzione al 20% w/v di TRH, una per l’analisi delle soluzioni accettrici nel range di concentrazioni 0,0025-0,035 mg/ml e l’altra, per l’analisi delle soluzioni donatrici. nel range 0,035-0,14 mg/ml

4.4.2.7.1.5. *Analisi dei dati*

Per gli esperimenti di trasporto mediante modello PAMPA-BBB, è stato calcolato il valore di permeabilità effettiva, espresso come P_e , secondo la seguente equazione (Eq.....):

$$\log P_e = \log \left\{ C \bullet - \ln \left(1 - \frac{[drug]_{acceptor}}{[drug]_{equilibrium}} \right) \right\}$$

$$\text{con } C = \left(\frac{V_d \bullet V_a}{(V_d + V_a) A \bullet t} \right)$$

dove V_d e V_a sono rispettivamente il volume del compartimento donatore e accettore (ml), A l'area della membrana (cm^2), t il tempo di incubazione (s); $[\text{drug}]_{\text{acceptor}}$ la concentrazione (mg/ml) del composto nel compartimento accettore al completamento del saggio e $[\text{drug}]_{\text{donor}}$ la concentrazione (mg/ml) del composto al punto di teorico equilibrio.

4.4.2.7.2. Colture cellulari Caco-2

Le cellule Caco-2 (American Type Culture Collection Rockville, MD), tra il 27° e il 31° passaggio, sono state seminate ad una densità di $1,25 \times 10^5$ cellule/ cm^2 in piastre da coltura (24 pozzetti) per gli studi di citotossicità e in sistemi Transwell (12 pozzetti, Corning Inc. Costar 3462 Clear, NY USA) per gli esperimenti di trasporto. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's modified Eagle medium arricchito con glutammina (DMEM+GlutaMax-1, Gibco Life Technologies, Grand Island, NY), addizionato con siero bovino fetale al 10% (Gibco, Grand Island, NY), aminoacidi non essenziali all'1% (Sigma, Steinheim, USA), HEPES 10mM (Sigma, Steinheim, USA), penicillina 50 unità/ml (Sigma, Steinheim, USA), streptomina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma, Steinheim, USA) e gentamicina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gibco, Grand Island, NY). Le cellule sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO_2 ed il mezzo di coltura è stato cambiato 3 volte a settimana. In tali condizioni sperimentali le cellule raggiungono la confluenza dopo 5 giorni dalla semina. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti ventuno giorni dopo il raggiungimento della confluenza, un tempo al quale, da evidenze morfologiche e metaboliche, è dimostrato che le cellule hanno già raggiunto il completo differenziamento in cellule enterocita-*like* (Ellwood K.C. et al., 1993). Prima dell'inizio degli esperimenti, le cellule sono state lavate con soluzione tampone isotonica pH 7.0 (7,3 g/L di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 3,81 g/L di KH_2PO_4 e 4,65 g/L di NaCl) e trattate come di seguito indicato.

4.4.2.7.2.1. Test di tossicità su linea cellulare Caco-2

Preliminarmente, è stata valutata la potenziale citotossicità del DA-Phen mediante saggio colorimetrico con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) (Sigma, Steinheim, USA).

Sono state preparate e testate le seguenti soluzioni (in tampone pH 7,0):

- soluzione di **DA-Phen** 200, 100 e 50 μM

Dopo 2 ore di incubazione le soluzioni sono state rimpiazzate con una soluzione 5mg/ml di MTT in volume pari ad 1/5 del volume di mezzo di coltura originariamente presente. Dopo 30 h di incubazione, il formazano formatosi è stato solubilizzato in 100 μl di DMSO (Sigma, Steinheim, USA) sotto agitazione. Le soluzioni così ottenute, sono state analizzate mediante un *microplate reader* (Biorad) alla lunghezza d'onda di 550 nm.

4.4.2.7.2.2. Studi di trasporto bidirezionale attraverso linea cellulare Caco-2

Per gli studi di trasporto dal versante apicale a quello basolaterale (A→B), il mezzo di coltura è stato rimpiazzato con 500 μl della soluzione di DA-Phen 100 μM sul versante apicale (A) mentre il contenuto del compartimento basolaterale (B) è stato sostituito con 1 ml di soluzione tampone isotonica pH 7.0.

Per gli studi di trasporto dal versante basolaterale a quello apicale (B→A), il mezzo di coltura è stato rimpiazzato con 500 μl di soluzione tampone isotonica pH 7.0 sul versante apicale (A), mentre il contenuto del compartimento basolaterale (B) è stato sostituito con 1 ml della soluzione di DA-Phen 100 μM .

Il sistema è stato posto ad incubare per 120 minuti a 37 °C, in atmosfera di CO₂ del 5% e sotto costante agitazione.

Per gli studi di trasporto dal versante apicale a quello basolaterale (A→B), la quantità di DA-Phen accumulata nel compartimento basolaterale (B) è stata determinata a differenti *time points*: 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minuti. Ad ogni *time point*, l'intero volume di fluido di tale compartimento è stato prelevato e rimpiazzato con 1 ml di fluido fresco.

Allo stesso modo, per gli studi di trasporto dal versante basolaterale a quello apicale (B→A) agli stessi *time points*, l'intero volume del compartimento apicale (A) è stato aspirato e sostituito con 500 μl di fluido fresco.

Dopo il tempo di incubazione, il sistema è stato disassemblato e la quantità di DA-Phen è stata determinata mediante analisi HPLC utilizzando l'opportuna curva di taratura.

La curva di taratura è stata eseguita utilizzando soluzioni standard di DA-Phen in tampone isotonico pH 7.0 in un range di concentrazione compreso tra 0,003 mg/ml e 0,12 mg/ml.

Gli effetti del DA-Phen sull'integrità degli strati cellulari di Caco-2 è stata valutata mediante analisi della TEER (trans-epithelial electrical resistance, Millicell-ERS voltohmeter) all'inizio ed alla fine di ogni esperimento. Nelle condizioni sperimentali utilizzate, il trattamento delle cellule con il DA-Phen non ha mostrato di modificare i valori di resistenza o l'integrità della barriera.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in duplicato.

4.4.2.7.2.3. Analisi dei dati

Il valore del flusso (J) ed il coefficiente di permeabilità apparente (P_{app}) in entrambe le direzioni sono stati calcolati allo steady-state per unità di superficie mediante la regressione lineare dei risultati ottenuti dagli studi di permeazione (Ohtsuki S and Terasaki T, 2007).

Il valore di flusso J ($\text{nmol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) è stato calcolato secondo l'equazione:

$$J = (1/A) \times dQ/dt,$$

E il coefficiente di permeabilità apparente P_{app} (cm s^{-1}) secondo l'equazione :

$$P_{app} = (1/A C_0) \times dQ/dt$$

dove A è l'area superficiale della membrana (4.71 cm^2), C_0 è la concentrazione iniziale nel compartimento donatore e dQ/dt è la velocità di permeazione attraverso il monolayer allo steady-state, e rappresenta la pendenza della curva ottenuta plottando la quantità di DA-Phen permeata nel compartimento donatore contro il tempo.

Per gli esperimenti di trasporto attraverso la linea cellulare Caco-2 sono stati calcolati i valori di permeabilità apparente $P_{app} A \rightarrow B$ e $P_{app} B \rightarrow A$, impiegando la seguente relazione:

$$P_{app} = \frac{Q_r}{AtC_d} \quad (cms^{-1})$$

dove Q_r è la quota di DA-Phen accumulata nel compartimento accettore (μg), A l'area del tappeto cellulare (cm^2), t il tempo di esposizione (s) e C_d la concentrazione iniziale di DA-Phen nel compartimento donatore ($\mu g/ml$).

E' stato, infine, calcolato il valore di *efflux ratio*, secondo la seguente relazione:

$$Efflux \ Ratio = \frac{P_{app} B \rightarrow A}{P_{app} A \rightarrow B}$$

(Del Amo EM, et al., 2009)

5. BIBLIOGRAFIA

Abbott N. J., “Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery”, *J Inherit Metab Dis* (2013)

Abbott N. J., Patabendige A. A., Dolman D. E., Yusof S. R., Begley D. J., "Structure and function of the blood-brain barrier", *Neurobiol Dis*, (2010), Vol. 37; 13-25

Abbott N.J., Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models”, *Drug Discovery Today: Technologies*, 1 (2004) 407-416.

Aitio M-L., “N-acetylcysteine – passe-partout or much ado about nothing?”, *Br J Clin Pharmacol.*, 61(1) (2006) 5-15

Alter S.P., Lenzi G.M., Bernstein A. I., Miller G.W., “Vesicular Integrity in Parkinson’s Disease” *Curr Neurol Neurosci Rep* (2013) (7) 13-362

Annunziato L., Di Renzo G., “Trattato di Farmacologia” Idelson-Gnocchi (2010)

Ballabh P., Braun A., Nedergaard M., The blood-brain barrier: an overview. Structure, regulation, and clinical implications, *Neurobiol. Disease*. 16, (2004)1-13.

Banks W. A., “Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier”, *BMC Neurology* (2009), Vol. 9 (Suppl 1):S3

Bart Scholtissen, Frans R.J. Verhey, Jos J. Adam, Jos Prickaerts, Albert F. G. Leentjens “ Effects of acute tryptophan depletion on cognition, memory and motor performance in Parkinson’s disease “ *Journal of the Neurological Sciences* 248 (2006) 259 – 265).

Bettini R., Acerbi D., Caponetti G., Musa R., Magi N., Colombo P., Cocconi D., Santi P., Catellani P.L., Ventura P., “Influence of layer position on in vitro and in vivo

release of levodopa methyl ester and carbidopa from three-layer matrix tablets” *Eur J Pharm Biopharm* (2002) (53) 227–232

Boddupalli B. M., Mohammed Z N. K., Ravinder A. N., Banji D. “Mucoadhesive drug delivery system: An overview” *J Adv Pharm Technol Res.* (2010) 1 381–387

Bosco D., Plastino M., Bosco F., Fava A., Rotondo A., “Daily motor performance after switching levodopa to melevodopa: An open-label on advanced Parkinson's disease with "delayed-on" and/or "wearing-off"” *Minerva Medica* (2011) (102) 125-132

Brown P., Williams D., “Basal ganglia local field potential activity: character and functional significance in the human” *Clin Neurophysiol* (2005) (116) 2510-2519

Campisi C. Paderni, R. Saccone, Fede O. Di, A. Wolff, L. I. Giannola “Human buccal mucosa as an innovative site of drug delivery” *Curr Pharm Des.* 16, 641-652 (2010)

Cestelli A., Catania C., D’agostino S., Di Liegro I., Licata L., Schiera G., Pitarresi G.L., Savettieri G., De Caro V., Giandalia G., Giannola L.I., “Functional feature of a novel model of blood-brain barrier: studies on permeation of test compounds”, *J. Controlle Rel.*, 76 (2001) 139-147.

Chaturvedi R. K., Beal M., “Mitochondria targeted therapeutic approaches in Parkinson's and Huntington's diseases” *Molecular and Cellular Neuroscience* (2013) (55) 101-114

Chaudhary A., Nagaich U., Gulati N., Sharma V.K., Khosa R.L., “Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review” *J Adv Pharm Edu Res* (2012) (2) 2249-3379

Chemicalize.org

Chemspider.com

Chen H. J. C., Applewhite T., Jayachandran B., Kirk K.L., “Synthesis of 4,6-difluoro-5-hydroxy-(α -methyl)tryptamine and 4,6-difluoro-5-hydroxy-(β -methyl)tryptamine as potential selective monoamine oxidase B inhibitor”, *Journal of Fluorine Chemistr*,92 (1998) 41-44.

Chun I.K., Lee Y.H. , Lee K.E., Gwak H.S., “Design and Evaluation of Levodopa Methyl Ester Intranasal Delivery Systems” *J Parkinson’s Dis* (2011) (1) 101–107

Contin M., Martinelli P., “Pharmacokinetics of levodopa” *J Neurol* (2010) (257) 253–261

Dalvi A., “Parkinsonism” *Disease-a-Month* (2012) (58) 690-707

Davie C.A., “A review of Parkinson’s disease” *Br Med Bull* (2008) (86) 109-127

De Caro V., Giandalia G., Siragusa M.G., Lamartina L., Friscia S., Sardo P., Carletti F., Rizzo V., Ferraro G. e Giannola L.I., “N-Valproyl-L-Tryptophan for CNS-Targeting: Synthesis, Characterization and Efficacy *In Vitro* Studies of a New Potential Antiepileptic Drug”, *Medicinal Chemistry* 7 (2011) 9-17.

De Caro V., Giandalia G., Siragusa M.G., Sutera F.M., Giannola L.I. “New prospective in treatment of Parkinson's disease: studies on permeation of ropinirole through buccal mucosa”. *Int J Pharm.* (2012) 429, 78-83

Del Amo EM,Heikkinen AT,Mönkkönen J, .In vitro-in vivo correlation in P-glycoprotein mediated transport in intestinal absorption. *Eur J Pharm Sci.*(2009) 36(2-3):200-11.

Dhiman M.K., Dhiman A., Sawan K. (March 2009), Transbuccal Delivery of 5-Fluorouracil: Permeation Enhancement and Pharmacokinetic Study, *AAPPS PharmScitech*, Vol. 10: No.1.

Di Li, Kerns E.H., Bezar I.F., Petusky S.L. e Huang Y., “Comparison of Blood-Brain Barrier Permeability Assays: In Situ Brain Perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (2009) 1980-1991.

Di Li, Kerns E.H., Fan K., McConnell O.J. e Carter G.T., “High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38 (2003) 223-232.

Di Stefano A., Carafa M., Sozio P., Pinnen F., Braghiroli D., Orlando G., Cannazza G., Ricciutelli M., Marianecchi C., Santucci E., Evaluation of rat striatal L-dopa and DA concentration after intra-peritoneal administration of L-Dopa prodrugs in liposomal formulations. *J Control Release* 99 (2004) 293–300

Di Stefano A., Sozio P., Cerasa L.S., “Antiparkinson Prodrugs” *Molecules* (2008) (13) 46-68

Diaz Del Consuelo I., Pizzolato G., Falson, F., Guy R.H., Jacques Y., “Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue.” *J Pharm Sci* (2005) (94) 2777-2788

Djaldetti R., Melamed E., “New therapies for Parkinson’s disease” *J Neurol* (2001) (248) 357–362

Ellwood K.C., Chatzidakis C., Failla M.L., “Fructose utilization by the human intestinal epithelial cell line Caco-2”, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202 (1993) 440-446.

Fernandez C., Nieto O., Fontenla J.A., de Ceballos M.L., Fernandez-Mayoralas A., Synthesis of glycosyl derivatives as dopamine prodrugs: interaction with glucose carrier GLUT-1. *Org. Biomol. Chem.*, 7, (2003), 767-771

Gabathuler R., “Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases”, *Neurobiology of Disease*, (2010), Vol. 37; 48-57

Garberg P., Ball M., Borg N., Cecchelli R., Fenart L., Hurst R.D., Lindmark T., Mabondzo A., Nilsson J.E., Raub T.J., Stanimirovic D., Terasaki T., Öberg J.-O., Österberg T., “In vitro models for the blood-brain barrier”, *Toxicology in vitro*, 19 (2005) 299-334.

Gershanika O., Jenner P., “Moving from continuous dopaminergic stimulation to continuous drug delivery in the treatment of Parkinson’s disease”, *European Journal of Neurology* 19, 1502–1508 (2012)

Giandalia G., De Caro V., Cordone L. e Giannola L.I., “Threalse-hydroxyethylcellulose microspheres containing vancomycin for topical drug delivery”, *Eur J Pharm Biopharm.*, 52(1) (2001) 83-89.

Giannola L.I., De Caro V., Giandalia G., Siragusa M.G., Lamartina L., “Synthesis and in vitro studies on a potential dopamine prodrug”, *Pharmazie*, 63 (2008) 704-710.

Gimenez F., Fernandez C. e Mabonzo A., “Transport of HIV protease inhibitors through the blood-brain barrier and interactions with the efflux proteins, P-glycoprotein and multidrug resistance proteins”, *J. Acquir Immune Defic Syndr*, 36 (2004) 649-658.

Goole J. , Amighi K. , “Levodopa delivery systems for the treatment of Parkinson’s disease: An overview”, *Inter. .l of Pharma.* 380, 1–15 (2009)

Gumbleton M. e Audus K.L., “Progress and Limitations in the Use of In Vitro Cell Cultures to Serve as a Permeability Screen for the Blood-Brain Barrier”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (2001) 1681-1698.

Heiko B., Estifanos G., Rüb U., Bratzk H., Del Tredici K., “Stages in the development of Parkinson ’s disease-related Pathology” *Cell Tissue Res* (2004) (318) 121-134

Hersh B.P., Earl N.L., Hauser R.A., Stacy M., “Early Treatment Benefits of Ropinirole Prolonged Release in Parkinson’s Disease Patients with Motor Fluctuations”, *Movement Disorders* 25, 920–945 (2010)

Hickey P., Stacy M., “Available and emerging treatments for Parkinson’s disease: a review” *Drug Des Devel Ther.* (2011) (5) 241–254.).

Hovorka S.W., Schoneich, C., “Oxidative degradation of pharmaceuticals: Theory, mechanisms and inhibition.” *J Pharm Sci* (2001) (90) 253–269

Huttunen K. M., Raunio H., Rautio J., “Prodrugs-from Serendipity to Rational Design”, *Pharmacol Rev*, (2011), Vol. 63; 750-771

Itoh S., Oo C., “A feasibility study of differential delivery of levodopa ester and benserazide using site-specific intestinal loops in rats” *J Pharm Sci* (2010) (99) 227–233

Jost W.H., Buhmann C., Fuchs G., Greulich W., Hummel S., Korchounov A., Müngersdorf M., Schwarz M., Spiegel-Meixensberger M., “Initial experience with ropinirole PR (prolonged release)”, *J Neurol* 255, 60–63 (2008)

Kang E.J., Major S., Jork D., Reiffurth C., Offenhauser N., Friedman A., Dreier J.P., “Blood–brain barrier opening to large molecules does not imply blood–brain barrier opening to small ions”, *Neurobiology of Disease*, (2013), Vol. 52; 204–218

Kankkunen T., Huupponen I., Lahtinen K., Sundell M., Ekman K., Kontturi K., Hirvonen J., “Improved stability and release control of levodopa and metaraminol using ion-exchange fibers and transdermal iontophoresis” *Eur J Pharm Sci* (2002) (16) 273–280

Kansy M., Fischer H., Kratzat K., Senner F., Wagner B., Parrilla I. “High-throughput artificial membrane permeability studies in early lead discovery and development”, In: Testa B., Van de Waterbeemd H., Folkers G., Guy R. (Eds) *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research. Biological, Physicochemical and Computational Strategies*. Wiley-Interscience, Hoboken, (2001) 447–464.

Kao, H.D., Traboulsi A., Itoh S., Dittert L., Hussain A., “Enhancement of the Systemic and CNS Specific Delivery of L-Dopa by the Nasal Administration of Its Water Soluble Prodrugs” *Pharmaceut. Res.* 17, 978-98 (2000)

Khairnar G.A. Sayyad F.J., “Development of buccal drug delivery system based on mucoadhesive polymers” *Int J. Pharm Tech Res* (2010) (2) 719-735

Khedr E.M., El Fetoh N.A., Khalifa H., Mohamed A.A., El Beh K.M.A., “Prevalence of non motor features in a cohort of Parkinson’s disease patients Clinical” *Neurology And Neurosurgery* (2013) (115) 673–677

Koo H. J. , Yang J. E., Hyung P. J., Lee D., Seung R. P., Park J. H., D. Lee, S.R. Paik , “ α -Synuclein-mediated defense against oxidative stress via modulation of glutathione peroxidase”, *Biochimica et Biophysica Acta* 1834, 972–976 (2013)

Koprach J.B., Huot P., Fox S.H., Jarvie K., Lang A. E., Seeman P., Brotchie J.M., “The effects of fast-off-D2 receptor antagonism on L-DOPA-induced dyskinesia and psychosis in parkinsonian macaques”, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (2013) (43) 151-156

Krylov I. S., Kashemirov B. A., Hilfinger J. M., McKenna C. E., “Evolution of an Amino Acid Based Prodrug Approach: Stay Tuned”, *Mol. Pharmaceutics*, (2013), Vol. 10; 445-458

Kumar V., Aggarwal G., Zakir F., Choudhary A., “Buccal bioadhesive drug delivery - A novel technique”. *Int. J. Pharm. Bio.l Sci.* (2011) 1, 89-102

Li C., Wainhaus S., Uss A.S., Cheng K. “High-Throughput Screening Using Caco-2 Cell and PAMPA Systems”, In: Ehrhardt C. and Kim K.J. (Eds), *Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models*, Biotechnology: Pharmaceutical Aspects Vol. VII (2008) 418-429.

Lipinski C.A. “Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution” *Drug Disc. Today Tech* 2004

Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J., “ Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings” *Adv. Drug del. Rev.* (2012) 64: 4-17

Lipinski CA, “Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability” *J Pharmacol Toxicol Methods* (2000) (44) 235-249

Lo E.H., Singhal A.B., Torchilin V.P., Abbott N.J., Drug delivery to damage brain. *Brain Res. Rev.* 38, (2001),140-148.

Lundquist S. e Renftel M., “The use of in vitro cell culture models for mechanistic studies and as permeability screens for the blood-brain barrier in the pharmaceutical industry-Background and current status in the drug discovery process”, *Vascular Pharmacology*, 38 (2002) 355-364.

Maranis S., Touli S., Konitsiotis S., “Treatment of motor symptoms in advanced Parkinson's disease: A practical approach” *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* (2011) (35) 1795–1807

Mensch J., Jaroskova L L., Sanderson W., Melis A., Mackie C., Verreck G., Brewster M.E., Augustijns P., “Application of PAMPA-models to predict BBB permeability including efflux ratio, plasma protein binding and physicochemical parameters”, *International Journal of Pharmaceutics*, 395 (2010a) 182-197.

Mensch J., Melis A., Mackie C., Verreck G., Brewster M.E. e Augustijns P., “Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74 (2010b) 495-502.

Mensch J., Oyarzabal J., Mackie C. e Augustijns P., “In Vivo, In Vitro and In Silico Methods for Small Molecule Transfer Across the BBB”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (2009) 4429-4468

Mohamed S. Pendekal N, Pramod K. “Tegginamat Formulation and evaluation of a bioadhesive patch for buccal delivery of tizanidine “*Acta Pharmaceutica Sinica B* (2012) 2, 318–324

Morales J. O., Su R., McConville J. T. “The Influence of Recrystallized Caffeine on Water-Swellable Polymethacrylate Mucoadhesive Buccal Films” *AAPS PharmSciTech* (2013) 475-484

Müller T., van Laar T., Cornblath D.R., Odin P., Klostermann F., Grandas F.J., Ebersbach G., Urban P.P., Valldeoriola F., Antonini A., “Peripheral neuropathy in Parkinson’s disease: Levodopa exposure and implications for duodenal delivery” *Parkinsonism and Related Disorders* (2013) (19) 501-507

Nguyen J. H., “Blood–brain barrier in acute liver failure”, *Neurochemistry International*, (2012), Vol. 60; 676–683

Ngwuluka N., Pillay V., Du Toit L.C, Ndesendo V., Choonara Y., Modi G., Naidoo D., “Levodopa delivery systems: advancements in delivery of the gold standard” *Expt Opin Drug Del* (2010) (7) 203-224

Nicolazzo J.A., Charman S.A. e Charman W.N., “Methods to assess drug permeability across the blood-brain barrier”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 58 (2006) 281-293.

Nieuwenhuys R., van Huijzen C., Voogd J., “The Human Central Nervous System” *Springer* (2007)

Nyholm, D., Nilsson Remahl, A.I.M., Dizdar, N., Constantinescu, R., Holmberg, B., Jansson, R., Aquilonius, S.-M., Askmark, H., “Duodenal levodopa infusion monotherapy vs oral polypharmacy in advanced Parkinson disease” *Neurology* (2005) (64) 216-23

Obeso J.A., Rodríguez-Oroz M.C., Benitez-Temino B., Blesa F.J., Guridi J., Marin C., Rodríguez M., “Functional Organization of the Basal Ganglia: Therapeutic Implications for Parkinson’s Disease” *Movement Disorders* (2008) (23) 548-559

Obeso J.A., Rodríguez-Oroz M.C., Goetz C.G., Marin C., Kordower J. H., Rodríguez M., Hirsch E.C., Farrer M., Schapira A.H.V., Halliday G., “Missing pieces in the Parkinson’s disease puzzle” *Nature Medicine* (2010) (16) 653-661

Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res.* (2007);24(9):1745-58.

Olanow C.W., Tatton W.G., “Etiology And Pathogenesis of Parkinson’s Disease” *Annu Rev Neurosci* (1999) (22) 123-144

Omidi Y., Barar J., Ahmadian S., Heidari H.R., Gumbleton M., “Characterization and astrocytic modulation of system L transporters in brain microvasculature endothelial cells” *Cell Biochem Funct*, (2008), Vol. 26; 381–391

Pahwa R, Lyons K.E., “Introduction” *Int J Neurosci* (2011) (121) 1–2

Pardridge W.M. “Blood-brain barrier delivery” *Drug Discovery Today*, 12 (2007) 54-62.*ed. Chem.* 43, 2204–2216.

Park G., Park Y.J., Yang H.O., Oh M.S., “Ropinirole protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity in mice via anti-apoptotic mechanism”, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 104, 163–168 (2013)

Pavan B., Dalpiaz A., Ciliberti N., Biondi C., Manfredini S., Vertuani S., “Progress in Drug Delivery to the Central Nervous System by the Prodrug Approach”, *Molecules*, (2008), Vol. 13; 1035-1065

Perioli L., Pagano C., “Preformulation studies of mucoadhesive tablets for Carbamazepine sublingual administration”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2013) 102, 915– 922

Pezzoli G., Canesi A., Galli C., “An overview of parkinsonian syndromes: data from the literature and from an Italian data-base”. *Sleep Medicine* (2004) (5) 181-187

Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P., “Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson’s disease: Focus on metabotropic glutamate receptors.” *Neuropharmacology* (2003) (45) 45-56

Ragot J. P., Steeneck C., Alcaraz M.L., Taylor R.J.K., “The synthesis of 1,8-dihydroxynaphthalene-derived natural products: palmarumycin CP1, palmarumycin

CP2, palmarumycin C11, CJ-12,371, deoxypreussomerin A and novel analogues”, *J. Chem. Soc. Perkin Trans* , 1 (1999) 1073-1082

Rao S.S., Hofmann L.A., Shakil A., Parkinson’s Disease: Diagnosis and Treatment, *American Family Physician* 74 (2006) 2047-2054.

Rascol O, Goetz C, Koller W, Poewe W, Sampaio C., “Treatment interventions for Parkinson’s disease: an evidence based assessment” *Lancet* (2002) (359) 1589-1598

Rasheed A., Theja I., Silparani G., Lavanya Y., Ashok Kumar C. K., “CNS targeted drug delivery: current perspectives” *JITPS* (2010), Vol. 1; 9-18

Rautio J., Laine K., Gynther M., Savolainen J., “Prodrug Approaches for CNS Delivery”, *The AAPS Journal*, (2008), Vol. 10, No. 1

Rossi S., Sandri G., Caramella C.M. (2005), Buccal drug delivery: a challenge already won?, *Drug Discov. Today*, 2: 59-65.

Roth H.J., Kleemann A., *Pharmaceutical Chemistry: Drug Synthesis*, 1 (1988).

Roy S., “Strategic Drug Delivery Targeted to the Brain”, *Pelagia Research Library*, (2012), Vol. 3, No.1; 76-92

Salamat-Miller N., Nazila B., Chittchangl M., Johnston T. P., (2005), The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.* 57: 1666– 1691.

Savettieri G., Di Liegro I., Catania C., Licata L., Pitarresi G.L., D'Agostino S., Schiera G., De Caro V., Giandalia G., Giannola L.I., Cestelli A., “Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells”, *Neuroreport*, 11 (2000) 1081-1084

Schapira A., “Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson’s disease” *Lancet Neurol* (2008) (7) 97-109

Schapira A.H., Jenner P., “Etiology and Pathogenesis of Parkinson’s Disease”
Movement Disorders (2011) (26) 1049-1055

Schapira A.H.V., Bezard E., Brotchie J., Calon F., Collingridge G.L., Ferger B., Hengerer B., Hirsch E., Jenner P., Le Novère N., Obeso J.A., Schwarzschild M.A., Spampinato U., Davidai G., “Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease”, *Nature Rev Drug Discov* (2006) (5) 845–854

Scherrmann J.-M. , Drug delivery to brain via the blood-brain barrier, *Vasc. Pharmacol.*, 38 (2002) 349-354

Schiera G., Bono E., Raffa M P., Gallo A., Pitarresi G.L., Di Liegro I., Savettieri G., “Synergistic effects of neurons and astrocytes on the differentiation of brain capillary endothelial cells in culture”, *J. Cell. Mol. Med.*, 7 (2003) 165-170.

Schiera G., Sala S., Gallo A., Raffa M.P., Pitarresi G.L., Savettieri G., Di Liegro I., “Permeability properties of a three-cell type in vitro model of blood-brain barrier”, *J. Cell. Mol. Med.*, 9(2) (2005) 373-379.

Sfondrini M.F., Fraticelli D., Barbati M., Scribante A., Gandini P. “Effects of a new pharmaceutical preparation on the soft tissues healing after apthous lesions in pediatric patients” *Dental Cadmos* (2012) 80, 334-339

Shojaei A.H. (1998), Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 1: 15-30.

Smart J.D., “Lectin-mediated drug delivery in the oral cavity” *Adv Drug Del Rev* (2004) (56) 481-489

Smith Q.R., Carrier-mediated transport to enhance drug delivery to brain, *International Congress Series*, 1277 (2005) 63-74

Solla P., Cannas A., Marrosu F., Marrosu M.G., “Therapeutic interventions and adjustments in the management of Parkinson disease: role of combined

carbidopa/levodopa/entacapone (Stalevo®)” *Neuropsychiatric Disease and Treatment* (2010) (6) 483–490

Sorokina Y. M., Sladkova A. A., Popova L. A., Shadyro O. I., Knizhnikov V. A., “Synthesis of Dipeptides Based on Valine and Threonine”, *Russian Journal of Organic Chemistry*, (2012), Vol. 48, No. 10; 1297–1301

Squier C., Brogden K. A. (2011), *Human Oral Mucosa: Development, Structure and function*; John Wiley & sons, Chichester.

Squier C.A., Cox P.S., Wertz P.W., Downing D.T. (1986), The lipid composition of porcine epidermis and oral epithelium, *Arch. Oral Biol.*, 31: 741-747.

Stanczak A., Ferra A., “Prodrugs and soft drugs”, *Pharmacol Rep*, (2006), Vol. 58

Stocchi F., “Continuous dopaminergic stimulation and novel formulations of dopamine agonists”, *J Neurol* 258, 316–322 (2011)

Stocchi F., “Farmacocinetica della levodopa” relazione XXXV Congresso Nazionale LIMPE 2008

Stocchi F., Isaacson S., Edin H., “Ropinirole 24-hour prolonged release improves mood and quality of life in patients with advanced Parkinson’s disease as adjunctive therapy”, *Therapeutical Interventions: Pharmacotherapy* (2009) Rome, Italy.

Stocchi F., Vacca L., Ruggieri S., Olanow C.W., Infusion of Levodopa Methyl Ester in patients with advanced PD: a clinical and pharmacokinetic study. *Arch. Neurol.* 62 (2005) 905–910.

Stocchi F., Zappia M., Dall’Armi V., Kulisevsky J., Lamberti P., Obeso J.A., “Melevodopa/Carbidopa Effervescent Formulation in the Treatment of Motor Fluctuations in Advanced Parkinson’s Disease” *Movement Disorders* (2010) (25) 1881–1887

Sudhakar Y., Kuotsu K., Bandyopadhyay A.K.,(2006), Buccal bioadhesive drug delivery - A promising option for orally less efficient drugs, *J. Controlled Rel.* 114: 15– 40.

Terasaki T., Ohtsuki S., Hori S., Takanaga H., Nakashima E. e Hosoya K., “New approaches to *in vitro* models of blood-brain barrier drug transport”, *Drug Discovery Today*, 8 (2003) 944-954.

Teubl B.J., Absenger M., Fröhlich E., Leitinger G., Zimmer A., Roblegg E., “The oral cavity as a biological barrier system: Design of an advanced buccal *in vitro* permeability model” *Eur J Pharm Biopharm.* 84, 386-393 (2013)

The Goodman e Gilman’s Pharmacological Bases of Therapeutics, (2008) 319-336, Mc Graw Hill, New York

Tompson D.J., Vearer D., “Steady-State Pharmacokinetic Properties of a 24-Hour Prolonged-Release Formulation of Ropinirole: Results of Two Randomized Studies in Patients with Parkinson’s Disease” *MSc Clinical Pharmacokinetics, Modelling and Simulation*, GlaxoSmithKline, Harlow, Essex, United Kingdom (2007).

Tsuboi Y., “Environmental-Genetic Interactions in the Pathogenesis of Parkinson’s Disease” *Experimental Neurobiology* (2012) (21) 123-128

Valdovinos-Flores C., Gonsebatt M. E., “The role of amino acid transporters in GSH synthesis in the blood–brain barrier and central nervous system”, *Neurochemistry International* (2012), Vol. 61; 405–414

Van Eyk A.D., Van der Bijl P., “Comparative permeability of various chemical markers through human vaginal and buccal mucosa as well as porcine buccal and mouth floor mucosa” *Arch Oral Biol* (2004) (49) 387-392

Vlieghe P., Khrestchatisky M., “Medicinal Chemistry Based Approaches and Nanotechnology-Based Systems to Improve CNS Drug Targeting and Delivery” *Medicinal Research Reviews*, (2013), Vol. 33 (3); 457-516, 599-613.

Wolburg H., Lippoldt A., Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vasc. Pharmacol.* 38, (2002),323-337.

Yang X., Zheng R., Cai Y., Liao M., Yuan W, Liu Z., “Controlled-release levodopa methyl ester/benserazide-loaded nanoparticles ameliorate levodopa-induced dyskinesia in rats” *Int J Nanomed* (2012) (7) 2077–2086

Zangaglia R., Stocchi F., Sciarretta M., Antonini A., Mancini F., Guidi M., Martignoni, E., Pacchetti C., “Clinical Experiences With Levodopa Methylester (Melevodopa) in Patients With Parkinson Disease Experiencing Motor Fluctuations: An Open-Label Observational Study” *Clinical Neuropharmacology* (2010) (33) 61-66

Zawilska J. B., Wojcieszak J., Olejniczak A. B., “Prodrugs: A challenge for the drug development”, *Pharmacological Reports*, (2013), Vol. 65; 1-14

