

INDICE

INTRODUZIONE	pag.	3
PARTE I		
<i>Aspetti fisiopatologici generali del recettore dopaminergico ed implicazione del sistema gabaergico nel morbo di Parkinson</i>	pag.	8
RISULTATI E DISCUSSIONI		
A) <i>Sintesi di potenziali co-drugs della dopamina (DA) e della L-dopa estere etilico mediante coniugazione del neurotrasmettitore e del suo bioprecursore con l'oxazepam ed il suo derivato emisuccinato</i>	pag.	12
B) <i>Calcoli computazionali per la valutazione della capacità di permeazione della barriera ematoencefalica (BEE) da parte dei composti 1a-d, 2a-d</i>	pag.	17
C) <i>Stabilità all'idrolisi chimica ed enzimatica dei composti 1a-d, 2a-d</i>	pag.	19
D) <i>Valutazione in vitro dell'attraversamento della BEE da parte del composto 1b</i>	pag.	20
E) <i>Studi di distribuzione mediante microdialisicerebrale del coniugato 1b</i>	pag.	21
CONCLUSIONI	pag.	26
PARTE SPERIMENTALE		
1) <i>Sintesi di nuovi coniugati di dopamina e L-dopa</i>	pag.	27
2) <i>Stabilità chimica ed in soluzione fisiologica dei coniugati 1a-d, 2a-d</i>	pag.	47
A) <i>Stabilità chimica dei composti 1a-d, 2a-d</i>	pag.	47
B) <i>Stabilità in soluzione fisiologica dei coniugati composti 1a-d, 2a-d</i>	pag.	47
3) <i>Parte sperimentale biologica</i>	pag.	48
A) <i>Esperimenti in vivo di micro dialisi del composto 1b</i>	pag.	48
B) <i>Colture cellulari MDCKII-MDR1</i>	pag.	48
C) <i>Studi di trasporto su monostrati cellulari MDCKII-MDR1</i>	pag.	49
PARTE II		
A) <i>Ruolo fisiopatologico della proteina di translocazione (TSPO) e caratteristiche dei ligandi a struttura imidazopiridinica</i>	pag.	50
B) <i>Preparazione di sistemi nanoparticellari modificati con ligandi del TSPO potenzialmente utili per la veicolazione ed il rilascio mirato del fluorouracile nella terapia dei tumori cerebrali</i>	pag.	59
1) <i>Parte sperimentale tecnologica-formulativa</i>	pag.	64
A) <i>Materiali</i>	pag.	64
B) <i>Apparecchiatura</i>	pag.	64
C) <i>Preparazione di sistemi nanoparticellari secondo la metodica dell'evaporazione del solvente O/W</i>	pag.	64
D) <i>Caratterizzazione fisico-chimica delle formulazioni particellari</i>	pag.	66
E) <i>Determinazione della quantità di 5-FU e del composto 1 incorporato nelle NP</i>	pag.	66
F) <i>Studi di rilascio in vitro</i>	pag.	66
2) <i>Parte sperimentale biologica</i>	pag.	67

A) <i>Colture cellulari</i>	pag.	67
B) <i>Analisi della vitalità cellulare mediante MTT</i>	pag.	67
C) <i>Microscopia per fluorescenza</i>	pag.	68
D) <i>Analisi statistiche</i>	pag.	68
RISULTATI E DISCUSSIONI	pag.	69
A) <i>Preparazione e caratterizzazione dei sistemi nanoparticellari</i>	pag.	69
B) <i>Rilascio in vitro del 5-FU dalle formulazioni particellari</i>	pag.	72
C) <i>Studi biologici di citotossicità e di uptake su linee cellulari C6 di glioma di ratto</i>	pag.	73
CONCLUSIONI	pag.	75
PARTE III		
<i>Aspetti generali relativi all'epilessia nelle donne in gravidanza e formulazione di nanovettori potenzialmente utili per il delivery al SNC dell'oxcarbazepina</i>	pag.	76
1) <i>Parte sperimentale tecnologica-formulativa</i>	pag.	78
A) <i>Materiali</i>	pag.	78
B) <i>Apparecchiature</i>	pag.	78
C) <i>Preparazione di sistemi nanoparticellari secondo la metodica solvent displacement</i>	pag.	79
D) <i>Caratterizzazione fisico-chimica delle formulazioni particellari</i>	pag.	79
E) <i>Determinazione della efficienza di incapsulazione (EE%) di Oxcarbazepina nelle nanoparticelle</i>	pag.	80
F) <i>Studi di rilascio in vitro</i>	pag.	80
2) <i>Parte sperimentale biologica</i>	pag.	81
A) <i>Colture cellulari e trasporto placentare su monostrati cellulari BeWo</i>	pag.	81
B) <i>Colture cellulari e trasporto su monostrati cellulari hCMEC/D3</i>	pag.	82
RISULTATI E DISCUSSIONI		
A) <i>Preparazione e caratterizzazione dei sistemi nanoparticellari</i>	pag.	83
B) <i>Rilascio in vitro del farmaco dalle formulazioni particellari</i>	pag.	85
C) <i>Valutazione in vitro dell'attraversamento della barriera ematoencefalica e della barriera placentare da parte delle formulazioni particellari e dell'oxcarbazepina</i>	pag.	85
CONCLUSIONI	pag.	86
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	pag.	87

INTRODUZIONE

La somministrazione di farmaci al sistema nervoso centrale (SNC), finalizzata al trattamento delle patologie in cui lo stesso è coinvolto (ictus, ischemia, epilessia ed altri disordini psichiatrici quali ansia, depressione e schizofrenia, stati neurodegenerativi, come il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), tumori cerebrali come glioblastoma, astrocitoma, glioma), rappresenta, ancora oggi, un problema verso cui è posta grande attenzione da parte di numerosi ricercatori, a causa delle caratteristiche anatomico-funzionali della barriera ematoencefalica (BEE), che limitano le capacità di attraversamento di diversi rimedi terapeutici.

Parecchie delle suddette patologie sono caratterizzate dal coinvolgimento di due strutture recettoriali note come recettore benzodiazepinico centrale (CBR) e recettore benzodiazepinico periferico (PBR), anatomicamente e fisiologicamente differenti tra loro. Infatti, il CBR fa parte del complesso eteromero del recettore di tipo A per l'amminoacido γ amino-butirrico (GABA_A) accoppiato al canale ionico del cloro (media i classici effetti anticonvulsivanti ed ansiolitici delle benzodiazepine), mentre il PBR, recentemente rinominato proteina di translocazione TSPO, è costituito da diverse subunità proteiche, è componente di un complesso multiproteico denominato "Mitochondrial Permeability Transition Pore" (MPTP), ed è localizzato nel sito di contatto tra le membrane interna ed esterna dei mitocondri. Esso esercita un ruolo chiave nel controllo di una serie di processi quali: apoptosi, regolazione della crescita e differenziazione cellulare, stimolazione della steroidogenesi, immunomodulazione, biosintesi dell'eme, trasporto anionico e regolazione delle funzioni mitocondriali. ¹ Il TSPO risulta overespresso in molte tipologie di tumori, ed è pertanto *target* di ligandi selettivi in grado di indurre apoptosi. ²

E' noto che composti a struttura benzodiazepinica o imidazopiridinica ^{3,4} sono in grado di attraversare la BEE, e di legarsi con elevata affinità e selettività ai due suddetti tipi di recettore.

Per quanto concerne la BEE, essa è un apparato funzionale che isola i fluidi interstiziali cerebrali dalla circolazione sistemica, e protegge il cervello dalla penetrazione sia di microrganismi che di sostanze potenzialmente tossiche.

La selettiva permeabilità della BEE verso diversi composti è dovuta alla presenza delle cellule endoteliali dei microcapillari cerebrali, le quali si distinguono per le proprietà morfologiche ed enzimatiche dalle altre cellule. ⁵ Esse sono infatti caratterizzate da una

minima attività endocitotica, e danno origine ad un epitelio compatto instaurando giunzioni serrate (*tight junctions*), che limitano il passaggio, attraverso la via paracellulare, di molte molecole dal torrente circolatorio nel cervello (Figura 1). La localizzazione sulla membrana plasmatica di diversi sistemi di trasporto e l'espressione di sistemi di efflusso quali la glicoproteina-P (P-gp), regolano e limitano rispettivamente il transito di particolari farmaci o macromolecole attraverso la BEE.^{6, 7, 8}

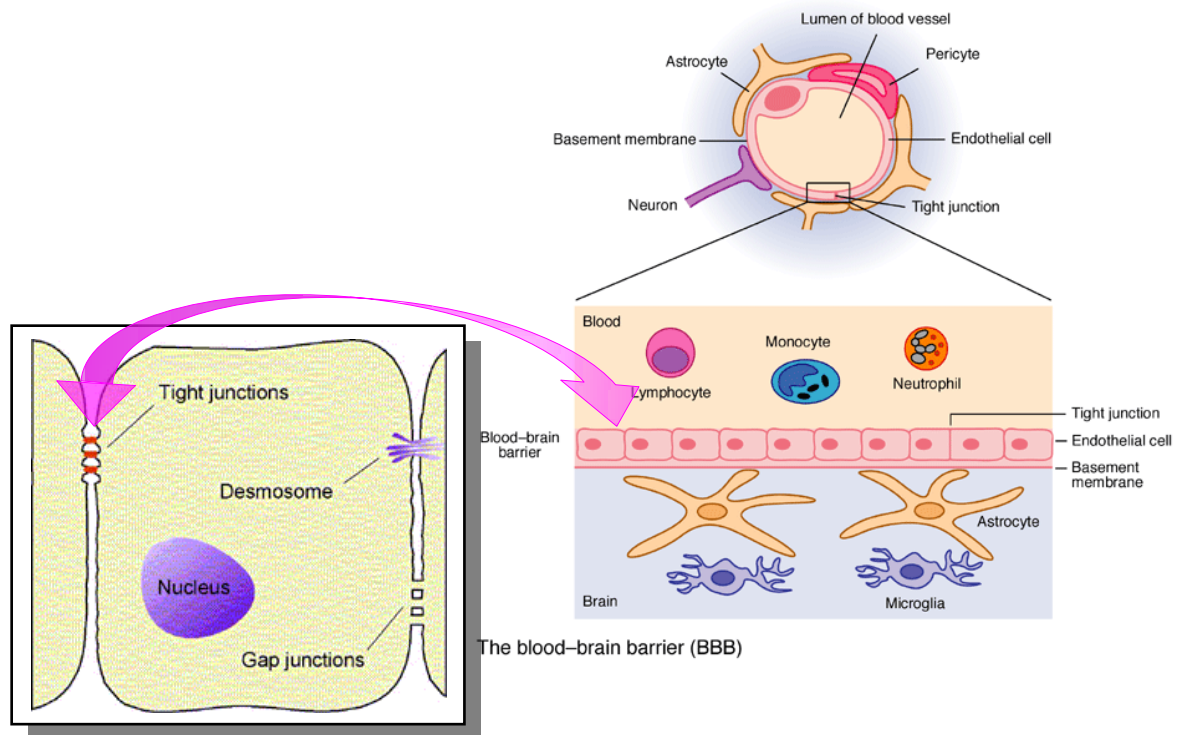


Figura 1. Rappresentazione schematica della struttura anatomica dei capillari cerebrali.

Molti neurotrasmettitori e molecole terapeuticamente utili, a causa della loro natura idrofila ed assenza di carriers specifici sulla BEE, attraversano quest'ultima solo in misura limitata. Pertanto, la somministrazione per vie convenzionali di tali sostanze, non determina un consistente aumento della loro concentrazione a livello cerebrale e quindi non risultano terapeuticamente efficaci.

Le strategie per l'attraversamento della BEE da parte di sostanze idrofile, schematicamente riportate in Figura 2, consistono in:^{9, 10}

- Modificazione temporanea dell'integrità della barriera, in particolare a carico delle giunzioni prima considerate, che possono essere rese meno serrate sia in presenza di una alta pressione osmotica indotta dalla somministrazione di opportune sostanze, sia in seguito alla somministrazione di analoghi della bradichinina. La somministrazione

di una soluzione ipertonica di arabinosio infatti comporta una modifica transiente della permeabilità della BEE, con un incremento nell'encefalo di composti idrofili. Ma la limitazione di questa metodica invasiva è rappresentata dal potenziale attraversamento della BEE anche da parte di sostanze tossiche incapaci di penetrarla in condizioni normali.

- Sfruttamento dei “trasportatori” presenti a livello della BEE per le sostanze nutritive e per i peptidi. Le prime utilizzano un trasportatore specifico, mentre i peptidi utilizzano la transitosi mediata da recettori a livello dell'endotelio citoplasmatico. Infatti, amminoacidi neutri come α -metildopa, L-dopa, α -metilserina, L-triptofano, malgrado la loro natura idrofila, sono trasportati attivamente attraverso la BEE. E' inoltre possibile trasportare attivamente anche composti che presentano alta affinità per detti trasportatori, attraverso legami specifici con nanovettori (liposomi, nanoparticelle polimeriche, micelle).
- Rilascio intranasale o infusione intracarotidea per il rilascio diretto di farmaci a livello della BEE;
- Infusione nel liquido cerebrospinale o l'impianto nel parenchima cerebrale di una matrice di natura polimerica contenente il farmaco.
- Impiego di nanoparticelle, le cui dimensioni oscillano tra 1 e 1000 nm, costituite da sostanze di natura macromolecolare e dal farmaco in esse disperso.
- Uso della strategia fondata sul concetto noto come “Troian Horse”, che consente, attraverso il riconoscimento di una porzione zuccherina da parte del carrier, il trasporto attraverso la BEE della molecola di farmaco chimicamente legato ad un gruppo funzionale dello zucchero. Il problema che limita il successo di tale tecnica è la presenza di proteine che in maniera opposta a quella dei carriers citati, generano un efflusso di molecole dal cervello al sangue. Tra questi trasportatori è opportuno menzionare la glicoproteina-P, la proteina della multi-resistenza ai farmaci, localizzata sulla BEE, ma anche su altre importanti barriere biologiche come quella placentare, per assolvere a fenomeni di detossificazione e/o per prevenire il passaggio di composti non essenziali nel cervello, o altri importanti organi. Un'inibizione di questi carrier potrebbe portare ad un notevole beneficio terapeutico, in quanto, diminuendo l'efflusso si avrebbe un notevole aumento della biodisponibilità, ma in compenso anche un aumento della tossicità a livello centrale.
- Modificazioni della struttura molecolare. Questo approccio basato sulla modificazione chimica di composti farmacologicamente attivi, utilizzato per il rilascio di sostanze

attive al SNC, consiste nella somministrazione di un appropriato composto detto profarmaco, caratterizzato da una *pro-moiety* lipofila e pertanto con un grado di idrofilia minore del farmaco.

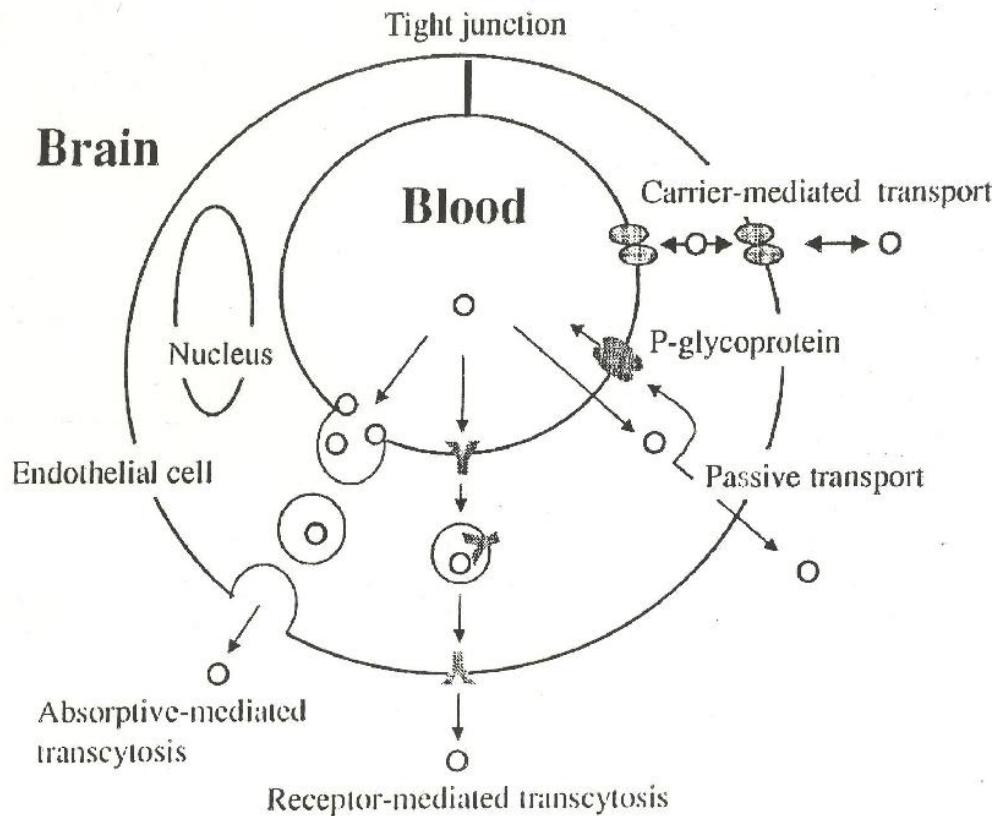


Figura 2. ⁹ Tipi di trasporto presenti sulla BEE.

Ciò gli consente il superamento della BEE per diffusione passiva, con rilascio del farmaco per scissione del legame farmaco-promoiety. Il ripristino del principio attivo deve avvenire con una cinetica rapida per assicurare efficienti livelli di farmaco nel sito d'azione. Con l'approccio del profarmaco oltre ad aumentare la lipofilia, è possibile: aumentare la selettività recettoriale; ridurre la tossicità e le reazioni indesiderate; modificare la durata d'azione, oltre che le caratteristiche della formulazione farmaceutica. Un'evoluzione di tale approccio è rappresentato dalla strategia del *co-drug* o *mutual prodrug*. I cofarmaci, costituiti da due differenti entità biologicamente attive, hanno l'ulteriore vantaggio di poter esplicare un effetto sinergico di entrambe le entità costituenti, con conseguente potenziale rilascio sito specifico o sitodiretto dei singoli farmaci nel SNC.

Quanto sopra premesso, il lavoro di tesi svolto dal sottoscritto Antonio Lopalco è stato affrontato e sviluppato nel campo del delivery di sostanze farmacologicamente attive al SNC

mediante opportune strategie. E' noto, infatti, che farmaci utilizzati nel trattamento di specifiche patologie o disfunzioni cerebrali (tumori cerebrali, morbo di Parkinson ed Alzheimer, ecc.), risultano poco efficaci proprio a causa della loro scarsa capacità di attraversamento della BEE.

A tale riguardo, sono state studiate due strategie di tipo non invasive finalizzate al superamento selettivo della BEE da parte di farmaci attivi al SNC, consistenti in:

- a) Realizzazione di cofarmaci (utilizzabili nel trattamento del morbo di Parkinson), per coniugazione mediante legame covalente reversibile del neurotrasmettitore idrofilo dopamina e del suo bioprecursore L-dopa, con un selettivo agonista gabaergico a struttura benzodiazepinica, quale l'oxazepam;¹¹
- b) Uso di sistemi nanoparticellari, costituiti da polimeri biocompatibili e biodegradabili, carichi di un principio attivo, potenzialmente in grado di superare la barriera per transitosi, e pertanto idonei per un rilascio sito specifico di farmaci antitumorali, come il 5 fluorouracile, ed antiepilettici, come l'oxcarbazepina, al SNC.

Nella prima parte della presente tesi vengono presentati e discussi i risultati inerenti la sintesi di nuovi potenziali cofarmaci del noto neurotrasmettitore dopamina e del suo bioprecursore L-dopa, legati, mediante *spacer* sia carbammico che succinico, con il farmaco ansiolitico oxazepam e relativa valutazione *in vitro* della loro capacità di permeare e quindi superare la BEE, e quantificazione della loro distribuzione a livello cerebrale mediante la tecnica della microdialisi cerebrale.

Nella seconda parte vengono formulate e caratterizzate nanoparticelle del polimero acido poli-[DL-lattico-*co*-glicolico] (PLGA) a differenti pesi molecolari, coniugato con ligandi altamente affini e selettivi per la proteina di translocazione TSPO, potenzialmente utili per veicolare un farmaco antitumorale (il 5-fluorouracile) per il trattamento di tumori del SNC.

Nella terza parte, sono riportati i risultati di uno studio svolto presso la *University of Texas Medical Branch*, inerenti la formulazione di una serie di carrier colloidali potenzialmente utili per un delivery a livello del SNC di un noto farmaco antiepilettico (l'oxcarbazepina) utilizzato nelle donne in gravidanza. Per alcune relative formulazioni, è stata inoltre valutata *in vitro* la loro capacità di permeare la BEE e la barriera placentare.

Parte prima

Aspetti fisiopatologici generali del recettore dopaminergico ed implicazione del sistema gabaergico nel morbo di Parkinson

Il morbo di Parkinson è una sindrome clinica caratterizzata dalla degenerazione cronica e selettiva di una regione del sistema nervoso extrapiramidale nota come *Substantia Nigra*, coinvolta nella regolazione della postura, del tono muscolare e della modulazione dei movimenti volontari. Nei pazienti affetti da morbo di Parkinson ciò che si osserva è la riduzione del contenuto in dopamina nella *Substantia Nigra* e nei gangli della base, caudato e putamen. Ciò determina l'assenza dell'equilibrio sussistente in una persona sana tra l'attività dopaminergica di tipo inibitorio e quella colinergica di tipo eccitatorio. In particolare, nei soggetti affetti da morbo di Parkinson, predomina l'attività colinergica. Studi recenti suggeriscono che in molte patologie del SNC, ed in particolare nella neuropatologia del Parkinson, è implicata un'altra importante via di trasmissione neuronale di tipo inibitorio: la gabaergica. La compromissione infatti di tale via comporterebbe effetti sulla dopaminergica. L'acido γ -aminobutirrico (GABA) è uno dei principali neurotrasmettitori di tipo inibitorio. Questo amminoacido è prodotto quasi esclusivamente nell'encefalo e nel midollo spinale. La risposta inibitoria indotta da questo mediatore chimico si origina dalla interazione con il suo recettore di membrana, che influenza l'attività del canale ionico. La stimolazione di tale recettore genera una maggiore frequenza d'apertura dell'annesso canale ionico che determina una maggiore conduttanza. Ciò produce un più elevato potenziale di membrana cui segue l'iperpolarizzazione che limita l'eccitabilità della membrana stessa. Sono stati individuati tre sottotipi di recettori gabaergici: GABA_A, GABA_B, GABA_C. Studi di biologia molecolare hanno dimostrato che essi rappresentano dei complessi macromolecolari costituiti da diverse subunità assemblate a delimitare un poro centrale idrofilo transmembrana, specifico per lo ione cloruro. Il più importante sottotipo recettoriale è il GABA_A, una proteina pentamerica in cui possono essere presenti 6 diverse subunità, appartenenti a diverse famiglie (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , δ , ϵ , π); per la funzionalità del canale ionico devono essere presenti almeno una subunità alfa, beta e gamma. La presenza ubiquitaria ed elevata nel SNC dei recettori gabaergici, unita al cruciale ruolo svolto nella trasmissione nervosa, giustificano l'importanza degli stessi nei processi neurofisiologici e nelle patologie neurodegenerative, come il morbo di Parkinson. Infatti è stato suggerito che i recettori GABA_A contribuiscono alla modulazione dell'attività dei neuroni dopaminergici mesocorticali e mesolimbici. Pertanto, agonisti selettivi gabaergici, in grado di aumentare la neurotrasmissione del GABA, potrebbero essere impiegati nella

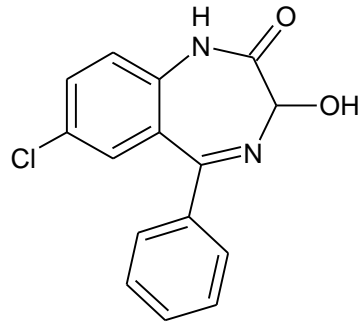
malattia del Parkinson, attenuando così le complicazioni associate con il trattamento a lungo termine con la L-dopa.¹¹

Le terapie disponibili nella cura del morbo di Parkinson non sono in grado di bloccare il processo neurodegenerativo, né esistono terapie ricostitutive, sebbene l'utilizzo di cellule staminali da impiantarsi nelle zone degenerate, potrebbe servire alla rigenerazione di quest'ultime.

Dalla fine degli anni '60 il farmaco d'elezione per il trattamento del morbo di Parkinson è la L-dopa: amminoacido che si origina dalla L-Tirosina, ed è precursore della dopamina. La genesi della dopamina avviene ad opera di una appropriata L-amminoacido decarbossilasi citoplasmatica che agisce decarbossilando la L-dopa. Quest'ultima supera la barriera emato-encefalica grazie al trasporto attivo per gli amminoacidi aromatici, si trasforma quindi in dopamina, precursore a sua volta di norepinefrina ed epinefrina. Di conseguenza, la somministrazione della L-dopa consente di aumentare i livelli di dopamina, obiettivo questo non raggiungibile mediante la somministrazione della dopamina che attraversa in misura limitata la barriera emato-encefalica sia a causa della sua basicità [pKa 8.9 (OH), 10.6(NH₂)] sia per l'assenza di carrier specifici sulla BEE. Pertanto, la somministrazione per vie convenzionali di tale neurotrasmettitore, non determina un consistente aumento della sua concentrazione cerebrale e di conseguenza non risulta terapeuticamente efficace.

La strategia utilizzata, applicata sia alla dopamina che alla L-dopa, ha previsto la realizzazione di potenziali cofarmaci del neurotrasmettitore e del suo bioprecursore, mediante la formazione di un legame chimico facilmente idrolizzabile per via enzimatica o chimica, con la porzione caratterizzante l'agonista gabaergico, rappresentato da una nota benzodiazepina, l'oxazepam.

Tale scelta è stata fatta per diverse e precise motivazioni. La prima si basa sull'elevata capacità di attraversamento della BEE caratterizzante composti aventi struttura benzodiazepinica, con affinità e selettività per il CBR; la seconda, invece, individua nella lipofilia di tale ligando le proprietà che ne determinano l'attraversamento della BEE per semplice diffusione passiva. Infatti, l'oxazepam (Figura 3), avente alta affinità per il complesso recettoriale gabaergico, è caratterizzato da un log BB maggiore di 0.3. Valore quest'ultimo indicativo di una concentrazione cerebrale più alta rispetto a quella plasmatica.



OXAZEPAM

Figura 3.

Tale composto, come in precedenza accennato, è in grado di attraversare la BEE per semplice diffusione passiva e di legarsi con elevata selettività ed affinità al recettore benzodiazepinico.

Una rappresentazione schematica della strategia utilizzata è riportata in Figura 4.

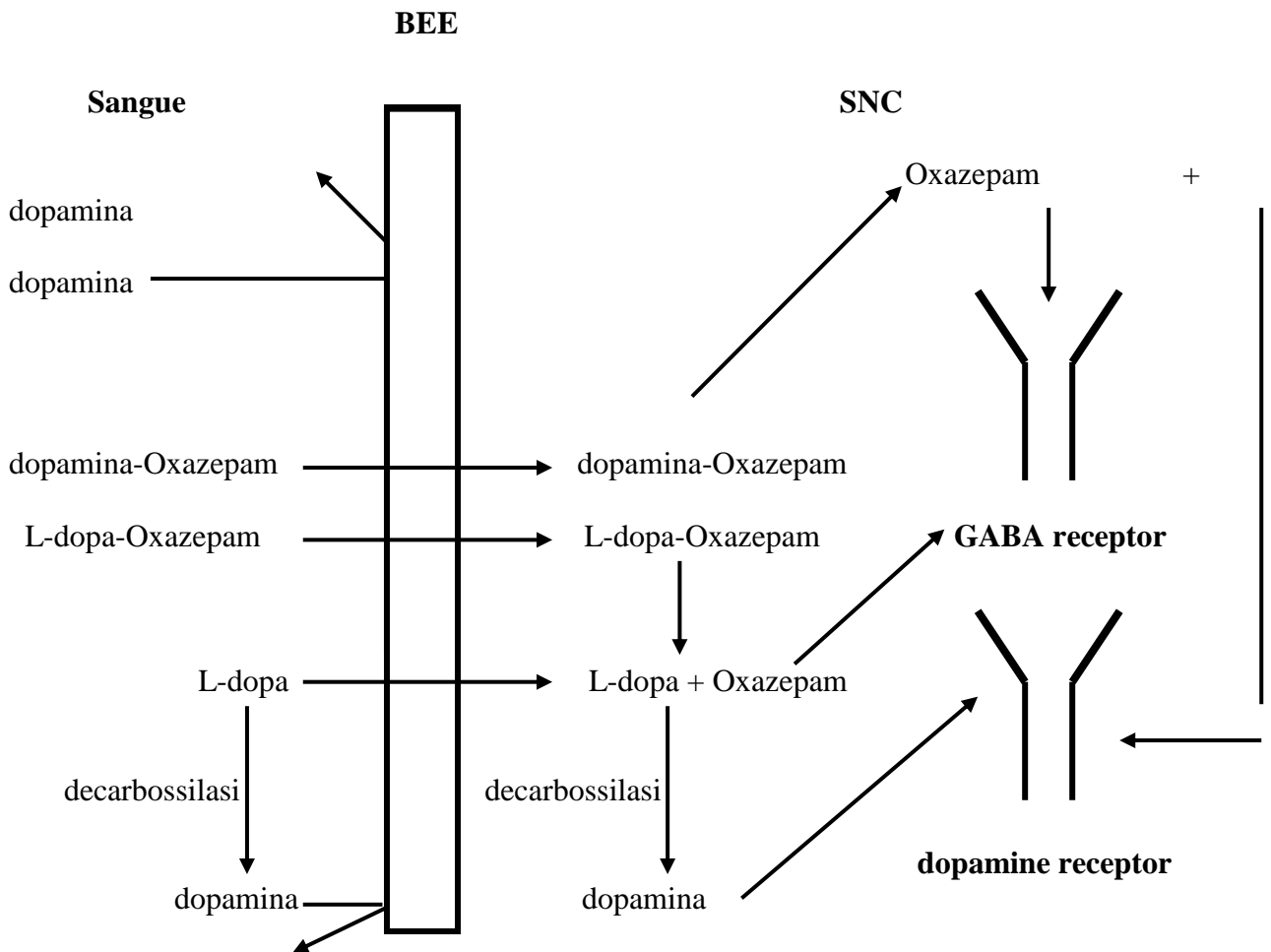


Figura 4. Rappresentazione schematica della strategia utilizzata per incrementare la concentrazione cerebrale di dopamina e L-dopa.

I vantaggi attesi sono: permeazione della BEE per semplice diffusione passiva e quindi rilascio del corrispondente neurotrasmettitore e farmaco a livello del SNC. Tale concetto è stato applicato alla dopamina ed al suo precursore biologico L-dopa, questo ultimo pur attraversando la BEE mediante il carrier degli amminoacidi, ha lo svantaggio di essere metabolizzato già a livello periferico.

Considerato inoltre che alla dopamina ed alla L-dopa viene legata una porzione benzodiazepinica caratterizzata da affinità per il recettore gabaergico, ne consegue che i risultanti composti coniugati potrebbero influenzare due neurotrasmissioni, sia quella gabaergica che quella dopaminergica.

RISULTATI E DISCUSSIONI

A) Sintesi di potenziali *co-drugs* della dopamina (DA) e della L-dopa estere etilico mediante coniugazione del neurotrasmettitore e del suo bioprecursore con l'oxazepam ed il suo derivato emisuccinato

Con riferimento agli obiettivi riportati nella prima parte della tesi sono stati sintetizzati 8 potenziali *co-drugs* della dopamina (**6**) e del suo bioprecursore L-dopa estere etilico (**7**), dei quali, quattro con funzioni fenoliche libere (**1a-b**, **2a-b**) e quattro caratterizzati da funzioni fenoliche acetilate (**1c-d**, **2c-d**) (Figura 5).

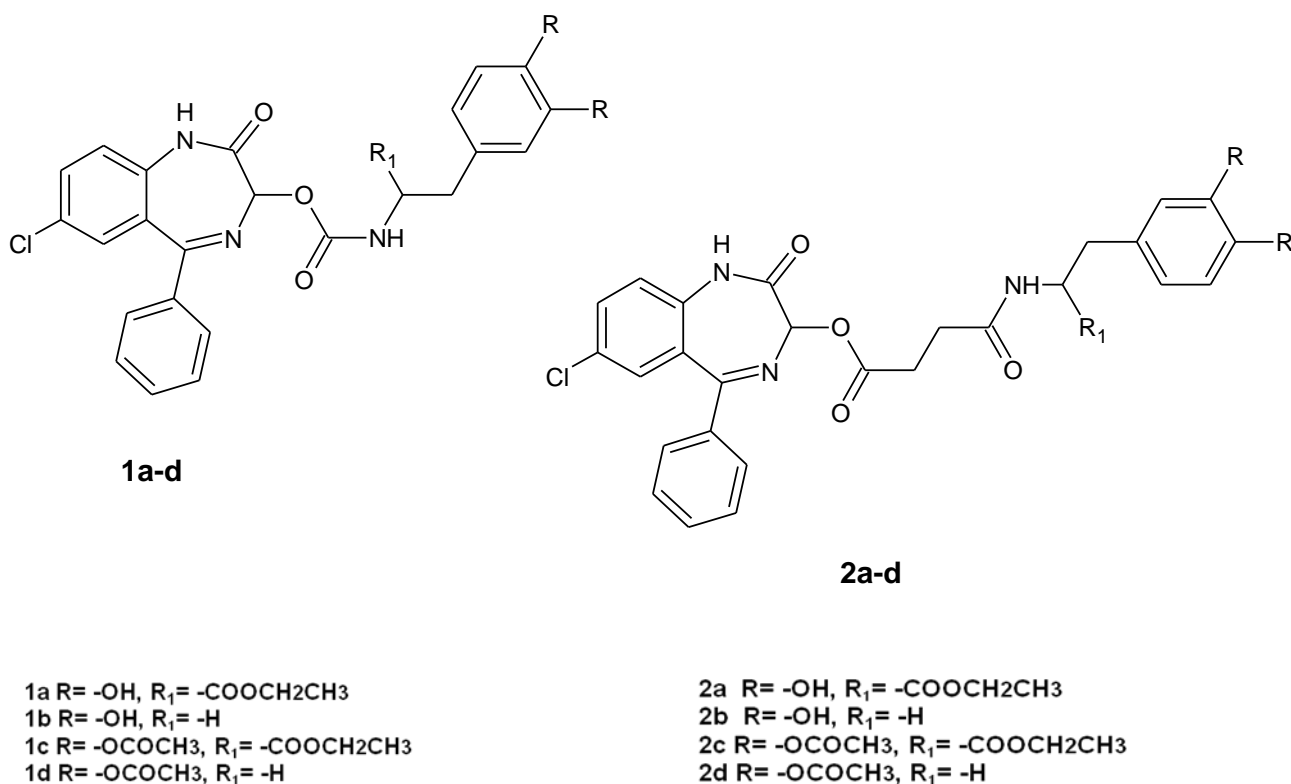


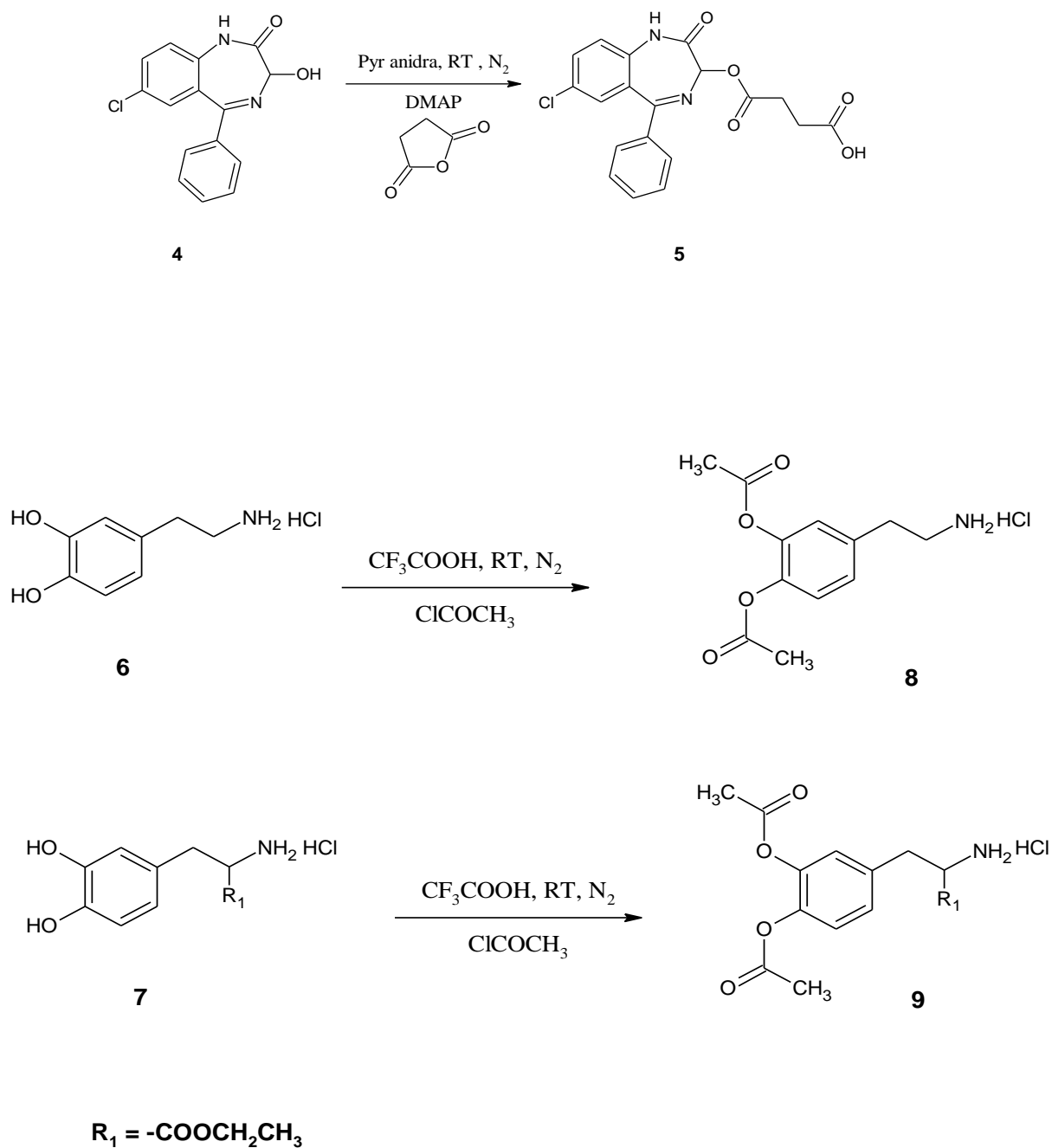
Figura 5. Rappresentazione schematica delle strutture dei *co-drugs*.

Le modalità di sintesi dei coniugati **2a-d**, oggetto del presente lavoro, hanno previsto la preparazione preliminare del composto **5** (schema 1).

In particolare, la sintesi del composto **5** ha previsto la solubilizzazione dell'oxazepam (**4**) in piridina anidra, in presenza di quantità catalitiche di dimetilaminopiridina (DMAP) e di anidride succinica. La soluzione così ottenuta è stata lasciata in agitazione sotto corrente di

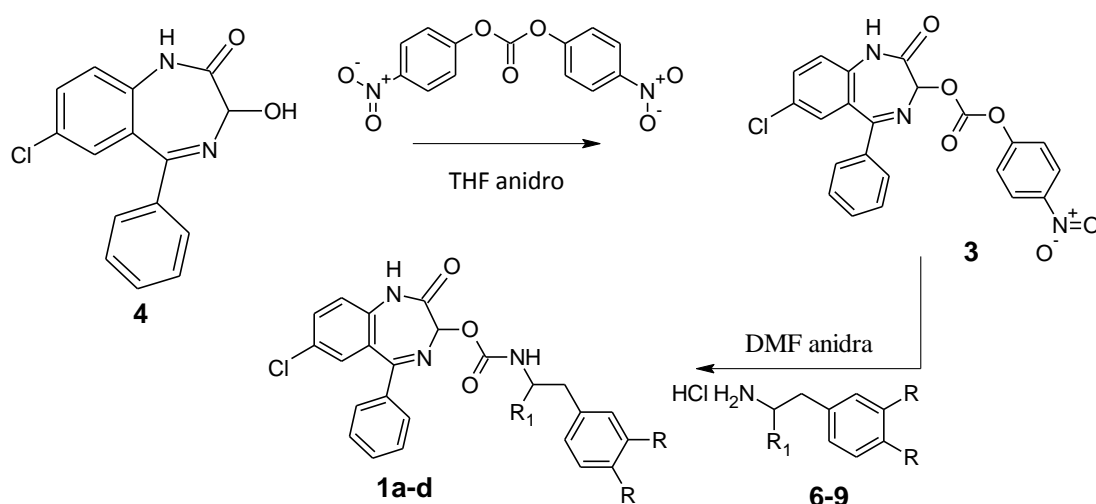
gas inerte (N_2) per circa 12 ore, a temperatura ambiente. I derivati acetilati della DA (**8**) e L-dopa estere etilico (**9**) sono stati ottenuti aggiungendo acetyl cloruro ad una soluzione del neurotrasmettitore DA e del suo bioprecursore in acido trifluoroacetico al 99%, sotto agitazione magnetica e corrente di gas inerte (N_2).

Schema 1.



La sintesi dei composti **1a-d** (schema 2) ha previsto, preliminarmente, la solubilizzazione del composto **4** in tetraidrofurano (THF) anidro ed aggiunta di trietilamina (TEA) e bis (4-nitrofenil) carbonato, in presenza di gas inerte, a temperatura ambiente. Dopo circa due ore, alla soluzione sono stati aggiunti DA o il composto **8**, L-dopa o il composto **9** previamente solubilizzati in dimetilformammide (DMF) anidra. La reazione è stata lasciata in agitazione per 12 ore, dopo le quali si è allontanato il solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, fornendo un residuo, che è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice, ottenendo i prodotti desiderati.

Schema 2.



- 1a** R = -OH, R₁ = -COOCH₂CH₃
1b R = -OH, R₁ = -H
1c R = -OCOCH₃, R₁ = -COOCH₂CH₃
1d R = -OCOCH₃, R₁ = -H

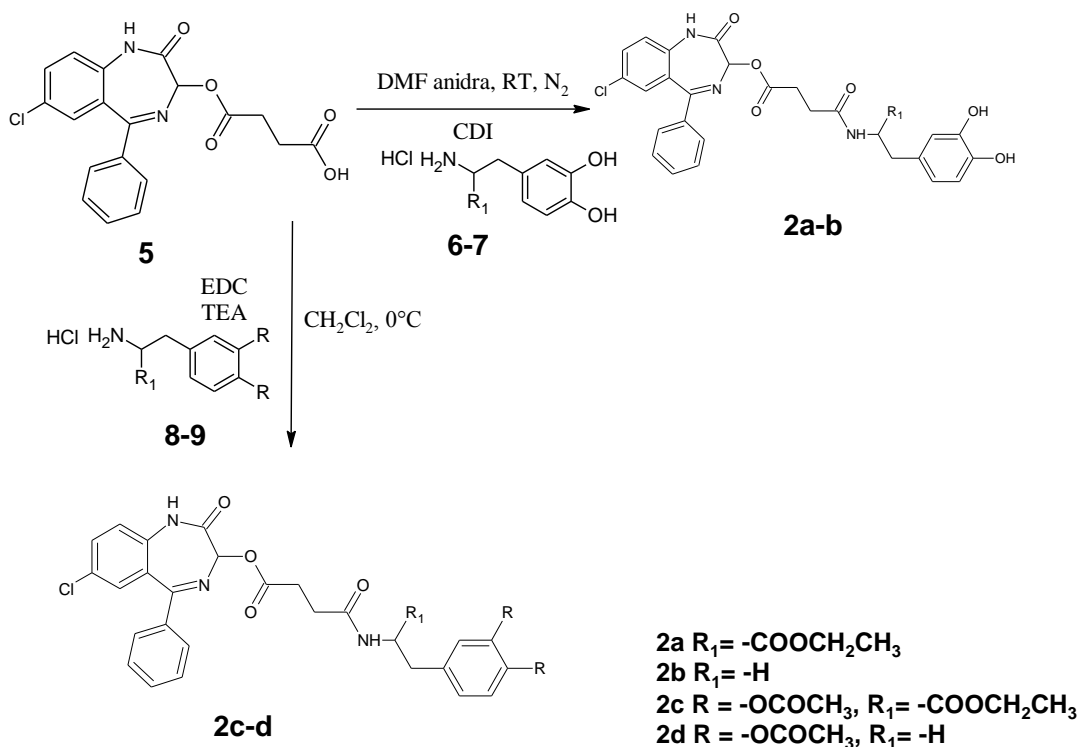
In accordo con lo schema 3, i composti **2a-d** sono stati ottenuti coniugando la funzione amminica dei composti **6-9** con quella carbossilica del composto **5**.

I prodotti **2a-b** sono stati ottenuti mediante reazione di condensazione del composto **5** con i composti **6-7** in DMF anidra, impiegando 1,1' carbonildiimidazolo (CDI) come agente condensante, in ambiente protetto da gas inerte. La reazione è stata mantenuta nelle suddette condizioni per circa 12 ore. Da tale reazione è stata ottenuta una miscela di composti che è

stata successivamente purificata mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice, separando i composti desiderati.

I potenziali *co-drugs* **2c-d** sono stati ottenuti mediante reazione di condensazione del composto **5** con i composti **8-9** in diclorometano (CH_2Cl_2) impiegando N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil carbodiimide cloridrato (EDC) quale agente condensante, e TEA. La reazione è stata mantenuta nelle suddette condizioni per circa 4 ore. La purificazione della miscela di ciascuna reazione, effettuata mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice, ha permesso di ottenere i due composti.

Schema 3.



Tutti i composti preparati sono stati caratterizzati mediante analisi spettroscopiche FT-IR, $^1\text{H-NMR}$, GAS-MS, ESI-MS. I dati ottenuti sono in completo accordo con le strutture assegnate.

La tabella 1 riporta le caratteristiche fisiche e rese ottenute degli 8 coniugati e del composto **5**.

Tabella 1. Caratteristiche fisiche e rese dei composti **1a-d, 2a-d, 5**.

Composto	m.p. (°C)	Yield (%)
1a	145-150	14
1b	82-86	45
1c	99-103	13
1d	132-135	10
2a	117-120	18
2b	98-103	9
2c	89-90	8
2d	120-123	31
5	146-148	95

B) Calcoli computazionali per la valutazione della capacità di permeazione della barriera ematoencefalica (BEE) da parte dei composti 1a-d, 2a-d

Per poter superare la BEE per semplice diffusione passiva, le molecole devono essere caratterizzate da un'adeguata diffusività. Una valutazione teorica della loro capacità di attraversamento della BEE può essere effettuata mediante calcoli predittivi.

La capacità delle molecole di permeare una biomembrana, prevalentemente idrofoba, è connessa con la lipofilia del composto stesso espressa in termini di coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (logP). La permeabilità dei composti è stata, pertanto, stimata attraverso il calcolo computazionale del rispettivo coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua, basato sul metodo frammentario di Hansch e Leo, utilizzando il programma Chem office 2006 software ChemDraw Ultra 10.0 (ClogP).

Considerato che valori di logP uguali a 2 ± 0.3 sono ritenuti, secondo Hansch, ottimali per l'attraversamento della BEE e valutato che i composti in esame posseggono valori di ClogP maggiori, la permeazione della BEE da parte di tali composti dovrebbe essere non favorita. Una migliore valutazione della capacità di attraversamento della BEE da parte di un composto è possibile ottenerla considerandone il $\log C_{\text{Brain}}/C_{\text{Blood}}$ (dove C_{Brain} è la concentrazione del composto in esame nel cervello e C_{Blood} la concentrazione del composto in esame nel sangue) (logBB).^{12, 14} E' opinione di molti studiosi infatti, che detto indice rappresenti un parametro più valido del logP, parametro quest'ultimo poco correlato con la capacità di penetrazione della BEE.

Pertanto per meglio stimare la capacità di penetrazione dei coniugati, è stato utilizzato il metodo di Clark che considera la relazione sussistente tra il logBB del composto, l'area di superficie polare totale (tPSA) delle molecole (definita come somma di contributi delle aree di superficie in Å^2 degli atomi di ossigeno, di azoto ed eventuali atomi di idrogeno legati a questi eteroatomi), e il ClogP del composto, come stabilito dalla seguente equazione:

$$\log BB = -0.0148 (\pm 0.001) \text{tPSA} + 0.152 (\pm 0.036) \text{ClogP} + 0.139 (\pm 0.036)$$

E' da rilevare inoltre che i composti con logBB maggiore di +0.3 attraversano efficacemente la BEE, mentre composti con logBB minore di -1.0 sono meno distribuiti nel cervello.

Per i coniugati, sono stati quindi calcolati i rispettivi valori di tPSA impiegando il programma computazionale ChemDraw Ultra 10.0, consentendo il calcolo dei corrispondenti

valori di logBB. Questi ultimi risultano minori del limite -1, pertanto indicativi di una bassa penetrazione della BEE. Tuttavia il composto **1b** presenta un valore di logBB prossimo al limite -1, pertanto è ipotizzabile la sua capacità di attraversare la BEE.

Tabella 2. Calcoli della lipofilia e penetrazione della BEE dei coniugati.

Composto	ClogP^a	tPSA^a	Log BB^b
1a	3.67	146.55	-1.47
1b	3.51	120.25	-1.11
1c	3.45	158.69	-1.68
1d	3.30	132.39	-1.32
2a	3.46	163.62	-1.76
2b	3.01	137.32	-1.44
2c	3.24	175.76	-1.97
2d	2.79	149.46	-1.65

a: stimati mediante il software ChemDraw Ultra 10.0.

b: calcolati in accordo con il modello di Clark.

C) Stabilità all'idrolisi chimica ed enzimatica dei composti 1a-d, 2a-d

La stabilità alla lisi chimica dei composti **1a-d**, **2a-d** è stata valutata effettuando cinetiche d'idrolisi a 37 ± 0.2 °C in tampone fosfato 0.05 M e pH 7.4, mentre la stabilità enzimatiche è stata valutata in siero di ratto diluito al 50 % col tampone fosfato isotonico.

La quantificazione del prodotto sottoposto ad idrolisi è stata effettuata mediante analisi HPLC dei campioni prelevati in tempi successivi. In particolare, l'area del picco dell'analita confrontata con la curva di calibrazione, in precedenza ottenuta analizzando in HPLC soluzioni a titolo noto del composto, nelle medesime condizioni. La costante di velocità del processo di degradazione di pseudo primo ordine è stata dedotta dalla pendenza della retta nel diagramma logaritmo decimale della concentrazione del coniugato composto in funzione del tempo.

I composti risultano abbastanza stabili in tampone fosfato 0.05 M / pH 7.4, infatti, sono caratterizzati da tempi di dimezzamento dell'ordine di ore per i composti con legame carbammico, e nell'ordine di minuti per quelli caratterizzati da *spacer* succinico (Tabella 3).

Per quanto riguarda i saggi di stabilità in siero di ratto diluito, i composti esaminati sono caratterizzati da valori di emivita rispettivamente dell'ordine di minuti.

Tabella 3. Dati di stabilità dei composti **1a-d**, **2a-d**, in tampone fosfato e in siero bovino diluito.

Composto	$t_{1/2}$ (h) in 0.05 M Tampone fosfato (pH 7.4)	$t_{1/2}$ (min) in 50% Siero bovino diluito
1a	9.13 ± 0.3	26.9 ± 0.07
1b	24.32 ± 0.21	144.8 ± 23.2
1c	7.22 ± 0.08	14.6 ± 0.6
1d	7.52 ± 0.5	15.4 ± 1.2
2a	44.69 ± 1.7 (min)	72.3 ± 4.3
2b	102.28 ± 8.51 (min)	68.2 ± 16.2
2c	80.13 ± 0.65 (min)	11.4 ± 1.5
2d	71.3 ± 0.08 (min)	9.4 ± 0.1

D) Valutazione *in vitro* dell'attraversamento della BEE da parte del composto **1b**

Al fine di valutare la permeazione della BEE da parte del composto **1b**, che da un punto di vista predittivo risulta potenzialmente in grado di attraversare la BEE, è stato condotto uno studio *in vitro* utilizzando monostrati cellulari confluenti di MDCKII-MDR1 fatte crescere e differenziare su piastre di diffusione (*transwell plates*). Tali cellule, geneticamente modificate al fine di esprimere un'elevata concentrazione di P-gp, mostrano caratteristiche morfologiche (i.e. *tight junctions*) ed enzimatiche del tutto simili a quelle delle cellule endoteliali cerebrali.¹⁴

L'integrità dei monostrati è stata valutata sia stimando la permeabilità apparente di *markers* paracellulare e transcellulare, rispettivamente fluoresceinaisotiocianato destrano (FD4) e diazepam, sia misurando la resistenza transepiteliale (TEER) mediante voltmetro epiteliale.

Dai dati sperimentali riportati in tabella 4 si evince che il composto **1b** dovrebbe essere in grado di permeare membrane biologiche per semplice diffusione passiva.

Tabella 4. Stima dell'attraversamento della BEE del composto **1b** *in vitro*.

Composto	P_{app} (cm/sec)
1b	$6.73 \pm 0.82 \times 10^{-6}$
FD4	$9.77 \pm 2.92 \times 10^{-7}$
Diazepam	$1.89 \pm 0.12 \times 10^{-5}$
Dopamina	$0.39 \pm 0.28 \times 10^{-6}$

L'esperimento è stato condotto in un periodo di tempo di tre ore ed a determinati intervalli di tempo, aliquote di 200 μ l sono state rimosse dal mezzo ricevente e rimpiazzate

con eguale volume di terreno di trasporto, al fine di mantenere le *sink conditions*. I campioni prelevati sono stati analizzati mediante HPLC. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

E) Studi di distribuzione mediante microdialisi cerebrale del coniugato 1b

Prove di distribuzione cerebrale del composto **1b**, scelto sulla base del fatto che, dal modello di Clark e dagli esperimenti *in vitro* di trasporto su monostrato di cellule MDCKII-MDR1, potrebbe permeare la BEE per diffusione passiva.

La microdialisi è una tecnica utile per la determinazione delle concentrazioni di neurotrasmettitori nel cervello di animali cui è stato somministrato per vie usuali un farmaco.

Tale tecnica consente di accedere, mediante l'inserimento di un probe polimerico semipermeabile, alla regione di tessuto cerebrale d'interesse per estrarne i soluti ivi presenti.

Il più comune probe per la microdialisi cerebrale su ratto è di tipo rigido a cannula, il quale viene cementato sul teschio dell'animale per consentirgli libero movimento e prevenire traumi nella regione d'impianto (Figura 6).¹⁵ Nel lume di tale cannula è presente ad un'estremità la membrana semipermeabile, nota come membrana di dialisi, che generalmente può essere di policarbonato, acetato di cellulosa, cellulosa rigenerata o poliacrilonitrile e la cui finestra attiva è di 4-10 mm².

L'impianto di un probe consente generalmente l'estrazione, dal tessuto o organo, di molecole idrofile e/o a basso peso molecolare non legate a proteine plasmatiche. Gli enzimi, quindi, non possono superare le membrane dialitiche e questo esclude una degradazione enzimatica dei campioni raccolti. Il cut off del probe consente anche l'ottenimento di campioni da analizzare molto più puri rispetto a quelli ottenuti, per esempio, mediante prelievi ematici.

La membrana di dialisi è a contatto con una soluzione, chiamata perfusato, avente concentrazione ionica e pH simili a quelli del tessuto circostante, condizione questa necessaria per prevenire differenze di pressione osmotica e perdita di fluidi da parte dell'animale.

Il probe di microdialisi può essere inteso come un vaso sanguigno artificiale ed il trasporto di massa dal lume del probe al suo esterno o viceversa, è funzione del gradiente di concentrazione che insiste sulle due facce della membrana di dialisi. Quindi il probe, nell'area d'impianto, può sia prelevare analiti al fluido extracellulare, che rilasciare a quest'ultimo i composti desiderati. In Figura 5 sono riportati alcuni tipi di probe. Nella Figura 7¹⁵ è rappresentata l'apparecchiatura generale di un sistema di microdialisi. Il ratto recante un

probe di microdialisi esattamente impiantato nella zona cerebrale d'interesse è in condizione di potersi muovere. La sussistenza di un appropriato gradiente di concentrazione attraverso la membrana di dialisi, consente alle molecole aventi basso peso molecolare di raggiungere il perfusato che attraversa il lume del probe con una velocità di flusso compresa tra $0.5 \div 5.0$ $\mu\text{l}/\text{min}$ (Figura 8).¹⁶ Il perfusato contenente queste nuove molecole, o dializzato, può essere quindi raccolto con un apposito raccoglitore di frazioni che vengono poi analizzate mediante apparecchiature di cromatografia impiegante liquidi sotto pressione (HPLC) o l'elettroforesi capillare (CE).

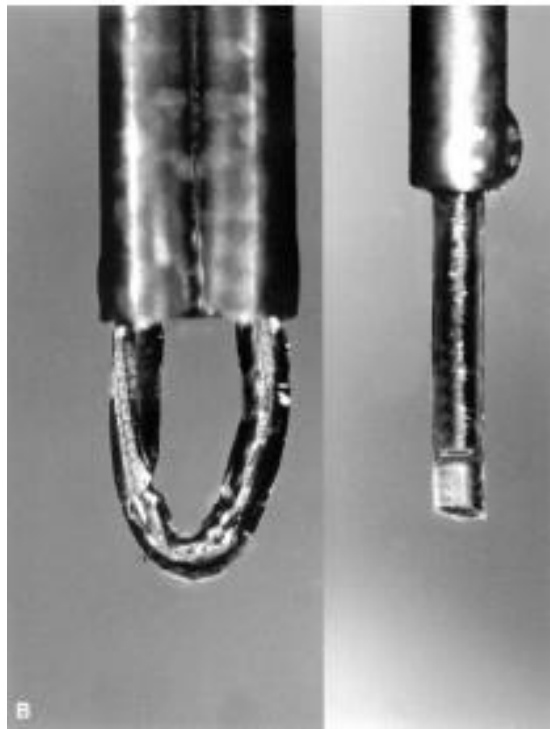
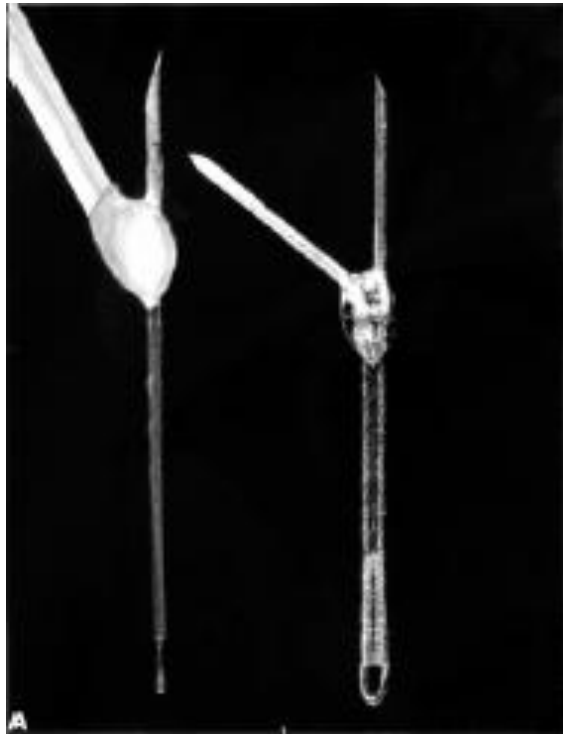


Figura 6. ¹⁵ A) probe di microdialisi concentrico (sinistra) ed a U (destra); B) particolare della porzione sulle quali è presente la membrana di dialisi.

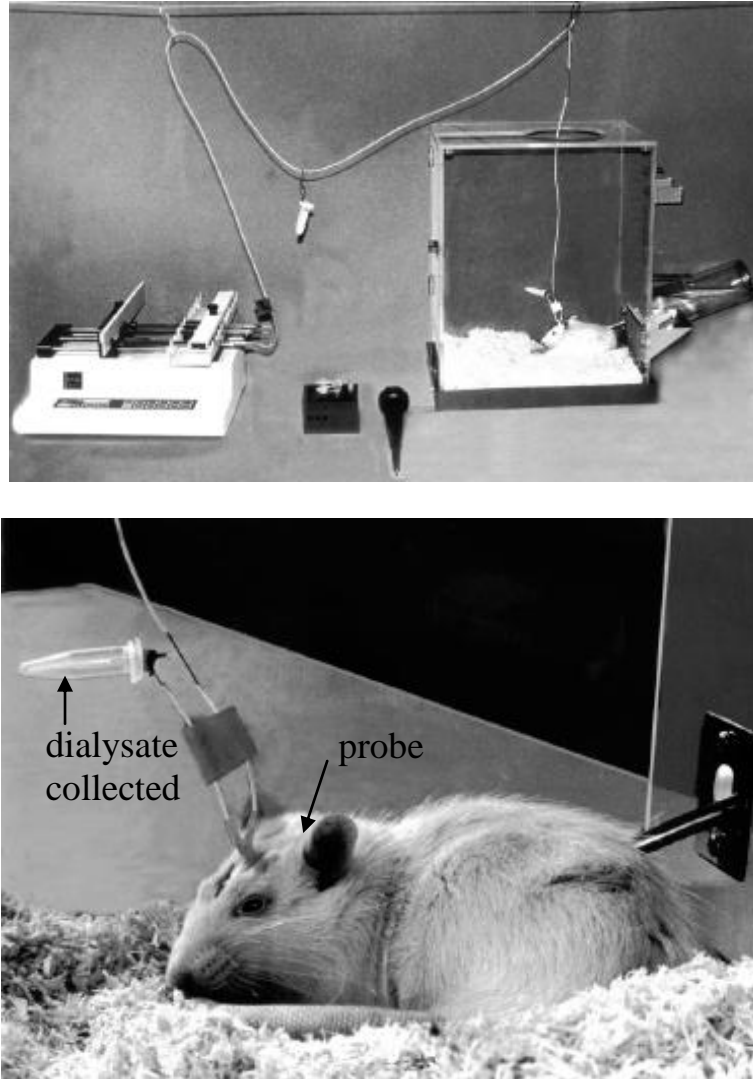


Figura 7. ¹⁵ Apparecchiatura generale di un sistema di microdialisi cerebrale.

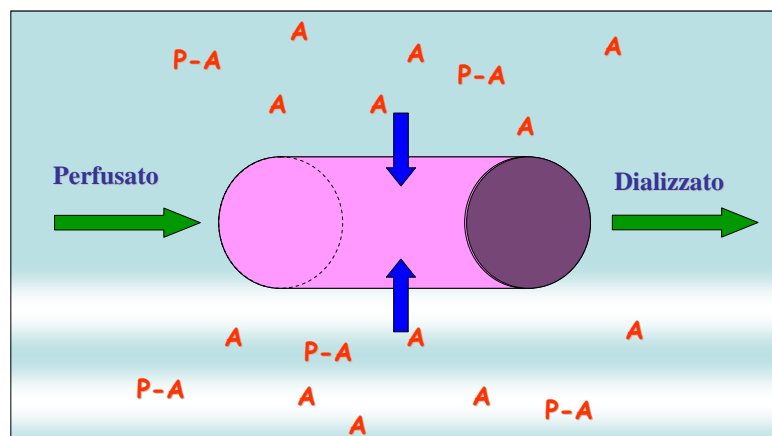


Figura 8. ¹⁶ Schematizzazione del processo di microdialisi cerebrale. **A** rappresenta l'analita mentre **P-A** indica l'analita legato alle proteine plasmatiche.

Nel presente studio, le indagini sui campioni di microdialisi sono state effettuate mediante tecniche analitiche ad elevata sensibilità, requisito imprescindibile, date le bassissime concentrazioni dei soluti in essi presenti. Per la determinazione dei vari analiti e/o metaboliti, presenti in tali campioni, sono state impiegate tecniche appropriate quali l'HPLC.

Gli esperimenti di microdialisi sono stati effettuati al fine di valutare la concentrazione extracellulare di DA nello striato dei ratti, dopo la somministrazione del composto **1b**.

Lo striato è infatti la regione principalmente implicata nella patologia del Parkinson, in quanto ricca di terminazioni nervose dopaminergiche, e dunque obiettivo per un suo trattamento sintomatico. Dopo la somministrazione sistemica del composto **1b**, 10mg/Kg e 20mg/Kg, i livelli di DA (figura 9) iniziano ad aumentare, raggiungendo una massima percentuale rispettivamente a 60 min ed a 80 min. E' ipotizzabile che, una volta che la BEE è stata attraversata, il composto **1b** subisca l'idrolisi nello spazio extracellulare, rilasciando il neurotrasmettitore e la benzodiazepina.

Ulteriori studi di farmacodinamica dovranno essere condotti al fine di chiarire possibili meccanismi di interazione con le strutture recettoriali implicate.

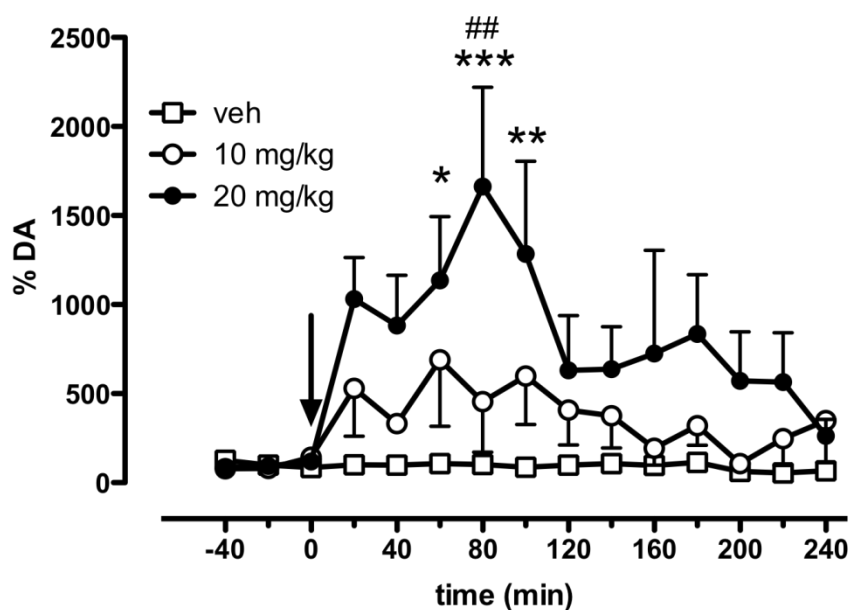


Figura 9. Effetto di una singola somministrazione (10 – 20 mg / Kg, i.p.) del composto **1b** sul deflusso di DA in 240 min nello striato di ratti svegli. Risultati espressi in percentuale del valore basale (\pm SEM) di $n = 4 - 5$ animali per gruppo. Test ANOVA seguito dal test di confronto multiplo di Bonferroni. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0,001$ vs rispettivo veicolo; ## $p < 0,01$ vs rispettivo composto 1b (10 mg / kg). La freccia indica il momento della somministrazione del composto 1b o di un veicolo.

CONCLUSIONI

I risultati esposti dimostrano che mediante coniugazione del neurotrasmettitore idrofilo dopamina e del suo bioprecursore L-dopa, con un ligando avente un'alta affinità per il recettore gabaergico, si ottengono 8 corrispondenti potenziali cofarmaci. Questi composti, risultando caratterizzati da una lipofilia maggiore del corrispondente neurotrasmettitore o precursore biologico, potrebbero attraversare per diffusione passiva la BEE per poter essere considerati nuovi sistemi chimici capaci di cedere contemporaneamente due molecole biologicamente attive al SNC.

Di tutti i composti sintetizzati sono stati determinati, mediante calcoli computazionali, il logaritmo del coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua e l'area di superficie polare, utili per il successivo calcolo del rispettivo log BB, valore quest'ultimo indice della capacità di permeazione della BEE da parte del composto.

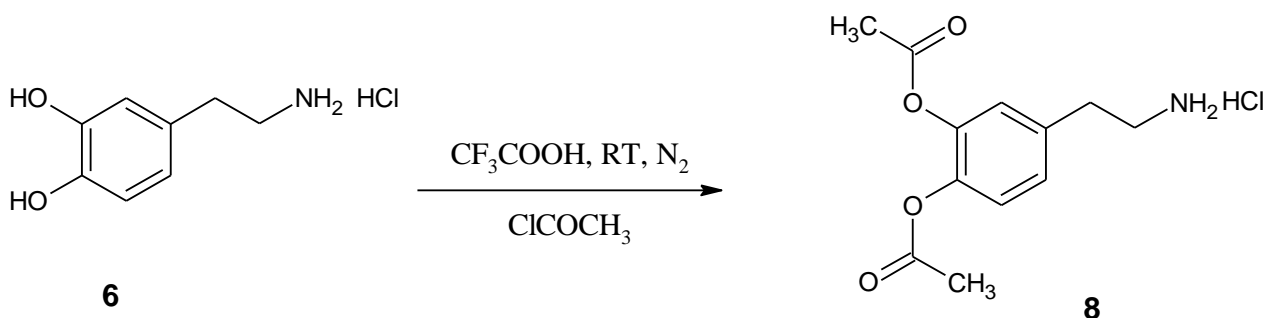
Sulla base di tali calcoli predittivi, del composto **1b** è stata inoltre valutata la capacità di permeare il monostrato cellulare MDCKII-MDR1, mimante la BEE. I dati conseguiti mediante dette analisi, risultano concordanti con i valori calcolati di log BB. In particolare, il composto attraversa i monostrati, come predetto dal metodo computazionale.

Considerato inoltre che solo con l'accertamento della presenza nel SNC della dopamina, derivante dalla lisi del coniugato composto, si può stabilire che quest'ultimo è un cofarmaco, è stata utilizzata la tecnica della microdialisi cerebrale. Le relative analisi, completate solo per il coniugato composto **1b**, indicano che dopo somministrazione ai ratti, per via intraperitoneale, si può ritrovare la dopamina nel SNC.

PARTE SPERIMENTALE

1) Sintesi di nuovi coniugati di dopamina e L-dopa

Sintesi di 3',4'-diacetil –dopamina (8)



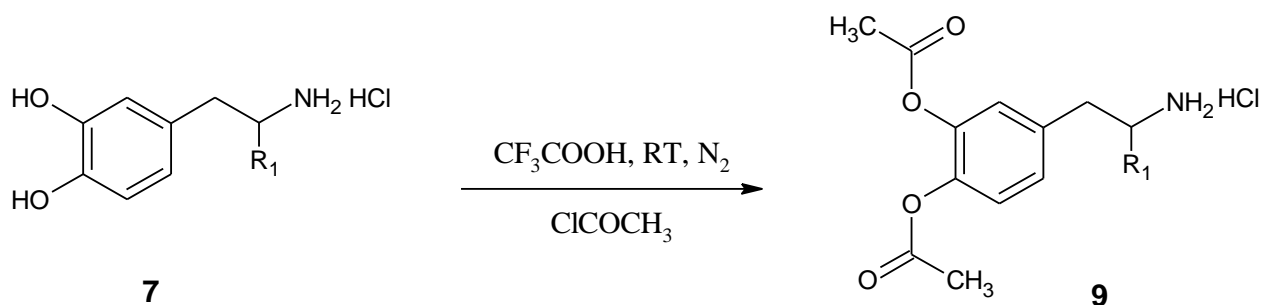
Reagenti	PM	Quantità
6	189.64	5.3 mmoli
Acetil cloruro	78.5	15.9 mmoli
Acido trifluoroacetico 99%		15 ml

In 15 ml di acido trifluoroacetico 99% è stato solubilizzato 1 g di DA (0.0053 moli), a temperatura ambiente, sotto agitazione ed ambiente di gas inerte (N_2). Acetil cloruro (0.0159 moli) è stato aggiunto goccia a goccia alla soluzione. La soluzione è stata in agitazione per circa 2 ore, durante le quali successivi controlli su TLC, utilizzando come fase mobile etile acetato, hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con R_f maggiore rispetto a quello presentato da DA. Allontanato il solvente per evaporazione a pressione ridotta, è stato ottenuto un residuo oleoso, che è stato sottoposto a cristallizzazione con isopropanolo/etere etilico fornendo un solido bianco in resa (del 96%). Il prodotto ottenuto ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

$^1\text{H-NMR}$ 300 MHz (D_2O): δ (ppm) = 2.2 (s, 6 H, OCOCH_3), 2.91 (m, 2 H, CH_2), 3.08 (m, 2 H, CH_2), 7.15 (m, 3 H, CH arom.). **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 238.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **IR** (KBr): 1749 cm^{-1} ($\text{OC}=\text{O}$).

Sintesi di 3',4'-diacetil -L-dopa estere etilico (9)



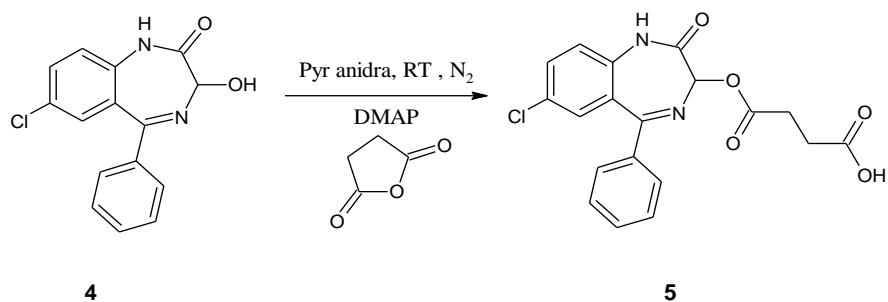
Reagenti	PM	Quantità
7	261	3.8 mmoli
Acetil cloruro	78.5	15.9 mmoli
Acido trifluoroacetico 99%		15 ml

In 15 ml di acido trifluoroacetico 99% è stato solubilizzato 1 g del composto **7** (0.0038 moli), a temperatura ambiente, sotto agitazione ed ambiente di gas inerte (N_2). Acetil cloruro (0.0159 moli) è stato aggiunto goccia a goccia alla soluzione. La soluzione è stata in agitazione per circa 2 ore, durante le quali successivi controlli su TLC, utilizzando come fase mobile etile acetato, hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con R_f maggiore rispetto a quello presentato dalla L-dopa estere etilico. Allontanato il solvente per evaporazione a pressione ridotta, è stato ottenuto un residuo oleoso, che è stato sottoposto a cristallizzazione in isopropanolo/etere etilico producendo un solido bianco in resa (96%). Il prodotto ottenuto ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

$^1\text{H-NMR}$ 300 MHz (D_2O): δ (ppm) = 1.05 (t, 3H, CH_3), 2.2 (s, 6 H, OCOCH_3), 3.1 (m, 2 H, CH_2), 4.1 (m, 2 H, CH_2OCO), 4.2 (m, 1H, N- CHCOO), 6.6-7.2 (m, 3 H, CH arom.). **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 310 $[\text{M}+\text{H}]^+$. **IR** (KBr): 1761 cm^{-1} ($\text{OC}=\text{O}$).

Sintesi oxazepam emisuccinato (5)



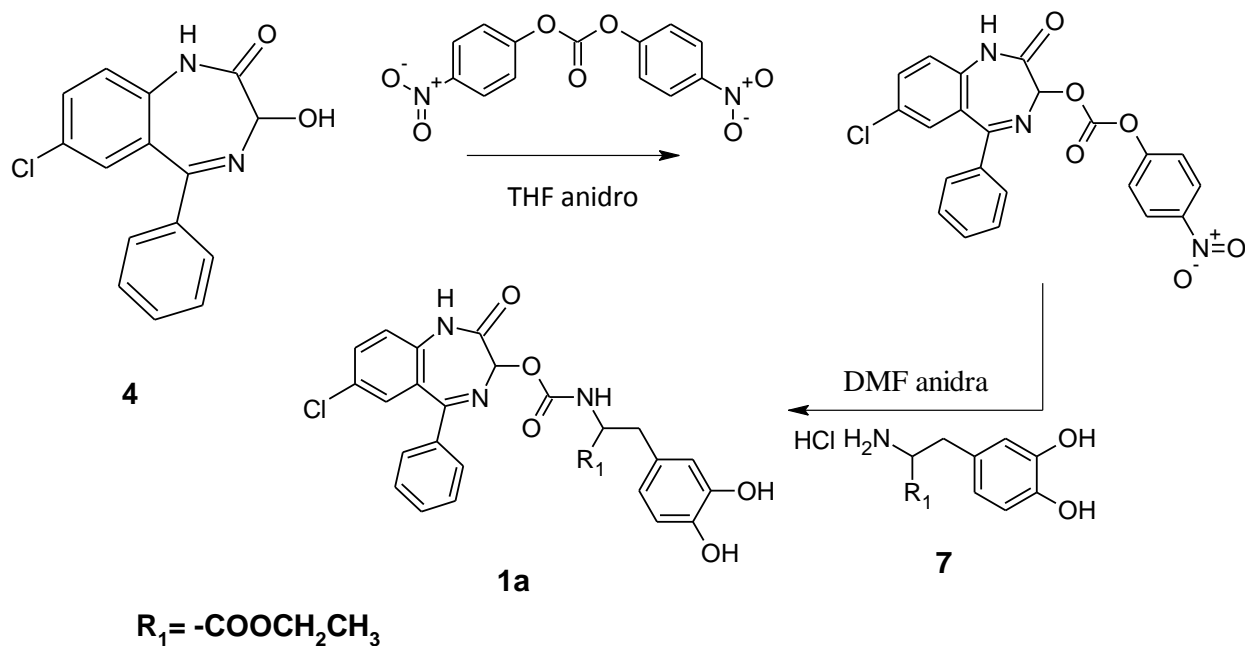
Reagenti	PM	Quantità
4	286.7	0.35 mmoli
Anidride succinica	100	0.7 mmoli
DMAP	122.17	0.035 mmoli
Piridina anidra		1 ml

Alla soluzione di 100 mg (0.35 mmoli) di oxazepam in 1 ml di piridina anidra sono stati aggiunti 4.5 mg di DMAP (0.035 mmoli) e successivamente 70 mg di anidride succinica (0.7 mmoli). La soluzione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente, in atmosfera di gas inerte (N_2) per circa 12 ore durante le quali, successivi controlli su TLC [utilizzando come fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°)], hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con R_f minore rispetto a quello presentato dall'oxazepam. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un residuo oleoso che è stato sottoposto ad estrazione con acque acide (pH 4) ed etile acetato. La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 anidro e successivamente filtrata. L'allontanamento del solvente organico per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un solido amorfo bianco. Si sono ottenuti circa 130 mg di composto **6** (Resa 95%), il quale ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹H-NMR 300 MHz (CDCl₃): δ (ppm) = 2.90 (m, 2 H, OCOCH₂), 3.05 (m, 2 H, CH₂CO), 6.0 (s, 1 H, N-CH-CO), 7.18-7.75 (m, 6 H, CH arom.), 8.63 (m, 2 H, CH arom.), 9.8 (br., 1 H, NH). **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 409 [M+Na]⁺. **IR** (KBr): 1700 cm⁻¹ (C=O), 2800-3500 cm⁻¹ (CO-OH).

Sintesi composto 1a



Reagenti	PM	Quantità
4	286.7	0.35 mmoli
7	261	0.42 mmoli
Bis (4-nitrofenil) carbonato	304.21	0.7 mmoli
TEA	101.19	0.42 mmoli
THF anidro		20 ml
DMF anidra		5 ml

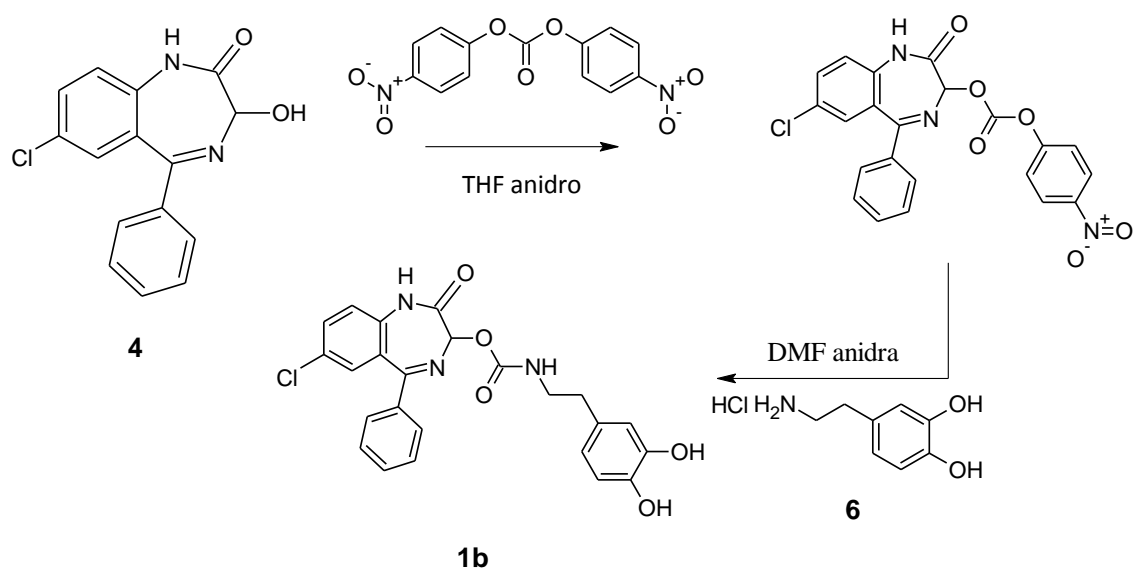
In 10 ml di THF anidro sono stati solubilizzati 100 mg di oxazepam (0.35 mmoli), con agitazione magnetica, ambiente di gas inerte (N₂), a temperatura ambiente. Alla soluzione sono stati aggiunti TEA (0.42 mmoli) e bis (4-nitrofenil) carbonato (212 mg, 0.7 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta nelle condizioni suddette per circa 2 ore durante le quali, successivi controlli su TLC, [utilizzando quale fase mobile la miscela 1/1 (v/v) di etere di petrolio (40-60°)/etile acetato] hanno evidenziato il progressivo formarsi dell'intermedio atteso. Alla soluzione, a temperatura ambiente, è stata aggiunta L-dopa estere etilico (110 mg, 0.420 mmoli), previamente solubilizzata in DMF anidra. La soluzione è stata lasciata in agitazione per circa 12 ore durante le quali, successivi controlli su TLC [utilizzando come fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°)], hanno evidenziato

la progressiva formazione di un composto fluorescente con Rf minore rispetto a quello presentato dall'oxazepam. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un residuo, che è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice impiegando quale fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°). Sono stati ottenuti 27.88 mg (0.049 mmoli) del prodotto (Resa 14%) il quale, ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹H-NMR 300 MHz (CDCl₃): δ (ppm) = 1.05 (t, 3H, CH₃), 3.1 (m, 2 H, CH₂), 4.1 (m, 2 H, CH₂OCO), 4.2 (m, 1H, N-CHCOO), 5.8 (s, 1H, CH) 6.6-7.2 (m, 3 H, CH arom.), 7.2-7.6 (m, 8 H, CH arom.). **LC-MASSA ESI⁻** m/z: 535.8 [M-H]⁻, **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 559.9 [M+Na]⁺. **IR** (KBr): 1700 cm⁻¹ (NHCO), 3360 cm⁻¹ (OH)

Sintesi composto 1b



Reagenti	PM	Quantità
4	286.7	0.35 mmoli
6	189.64	0.42 mmoli
Bis (4-nitrofenil) carbonato	304.21	0.88 mmoli
TEA	101.19	0.419 mmoli
THF anidro		10 ml
DMF anidra		5 ml

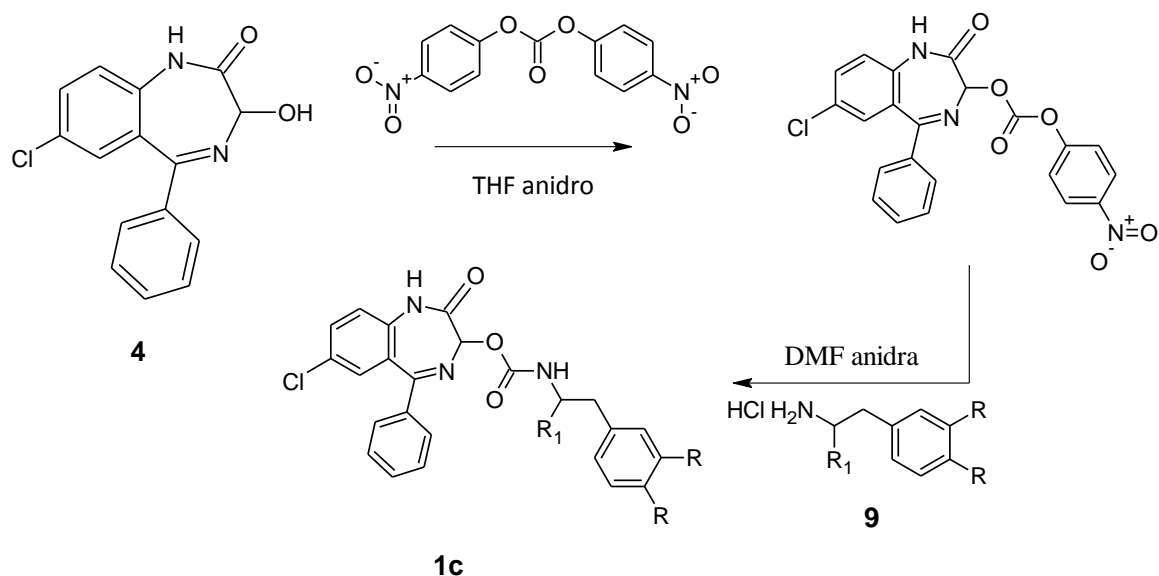
In 10 ml di THF anidro sono stati solubilizzati 100 mg di oxazepam (0.35 mmoli), con agitazione magnetica, ambiente di gas inerte (N₂), a temperatura ambiente. Alla soluzione sono stati aggiunti TEA (0.42 mmoli) e bis (4-nitrofenil) carbonato (265 mg, 0.88 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta nelle condizioni suddette per circa 2 ore durante le quali, successivi controlli su TLC, [utilizzando quale fase mobile la miscela 1/1 (v/v) di etere di petrolio (40-60°)/etile acetato] hanno evidenziato il progressivo formarsi dell'intermedio atteso. Alla soluzione, a temperatura ambiente, è stata aggiunta DA (80 mg, 0.420 mmoli), previamente solubilizzata in DMF anidra. La soluzione è stata lasciata in agitazione per circa 12 ore durante le quali, successivi controlli su TLC [utilizzando come fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°)], hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con R_f minore rispetto a quello presentato dall'oxazepam. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione

ridotta, ha fornito un residuo, che è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice impiegando quale fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°). Sono stati ottenuti 73.24 mg (0.16 mmoli) del prodotto (Resa 45%) il quale, ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹H-NMR 300 MHz (d₆-DMSO): δ (ppm) = 2.55 (m, 2 H, CH₂), 3.15 (m, 2 H, CH₂), 5.65 (s, 1 H, CH), 6.4-6.75 (m, 3 H, CH arom.), 7.4-7.8 (m, 8 H, CH arom.), 7.8 (t, 1 H, NH), 8,6-8.8 (br 2H, OH). **LC-MASSA ESI⁻** m/z: 463.8 [M-H]⁻, **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 488 [M+Na]⁺. **IR** (KBr): 1700 cm⁻¹ (NHCO), 3360 cm⁻¹ (OH)

Sintesi composto 1c



Reagenti	PM	Quantità
4	286.7	0.35 mmoli
9	345	0.42 mmoli
Bis (4-nitrofenil) carbonato	304.21	0.7 mmoli
TEA	101.19	0.42 mmoli
THF anidro		10 ml
DMF anidra		5 ml

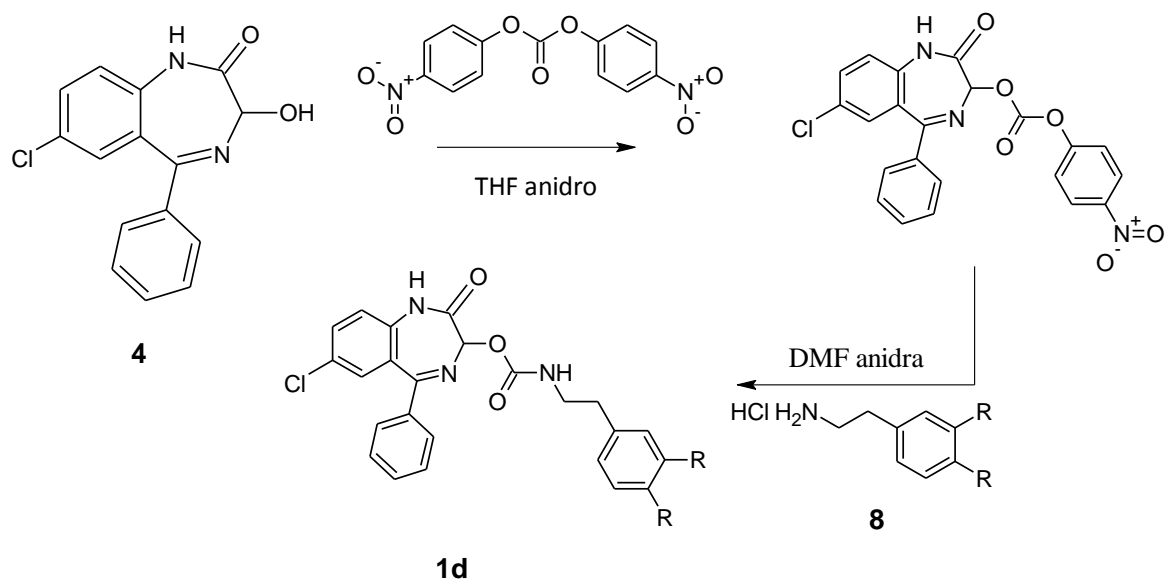
In 10 ml di THF anidro sono stati solubilizzati 100 mg di oxazepam (0.35 mmoli), con agitazione magnetica, ambiente di gas inerte (N_2), a temperatura ambiente. Alla soluzione sono stati aggiunti TEA (0.42 mmoli) e bis (4-nitrofenil) carbonato (212 mg, 0.7 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta nelle condizioni suddette per circa 2 ore durante le quali, successivi controlli su TLC, [utilizzando quale fase mobile la miscela 1/1 (v/v) di etere di petrolio (40-60°)/etile acetato] hanno evidenziato il progressivo formarsi dell'intermedio atteso. Alla soluzione, a temperatura ambiente, è stato aggiunto **9** (145 mg, 0.420 mmoli), previamente solubilizzato in DMF anidra. La soluzione è stata lasciata in agitazione per circa 12 ore durante le quali, successivi controlli su TLC [utilizzando come fase mobile la miscela

8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°)], hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con Rf maggiore rispetto a quello presentato dall'oxazepam. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un residuo, che è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice impiegando quale fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°). Sono stati ottenuti 28.3 mg (0.046 mmoli) del prodotto (Resa 13%) il quale, ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹H-NMR 300 MHz (CDCl₃): δ (ppm) = 1.05 (t, 3H, CH₃), 2.2 (s, 6H, CH₃COO), 3.1 (m, 2 H, CH₂), 4.1 (m, 2 H, CH₂OCO), 4.2 (m, 1H, N-CHCOO), 5.8 (s, 1H, CH), 6.6-7.2 (m, 3 H, CH arom.), 7.2-7.6 (m, 8 H, CH arom.). **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 644 [M+Na]⁺. **IR** (KBr): 1720 cm⁻¹ (C=O).

Sintesi composto 1d



Reagenti	PM	Quantità
4	286.7	0.50 mmoli
8	273	0.6 mmoli
Bis (4-nitrofenil) carbonato	304.21	1 mmoli
TEA	101.19	0.6 mmoli
THF anidro		15 ml
DMF anidra		5 ml

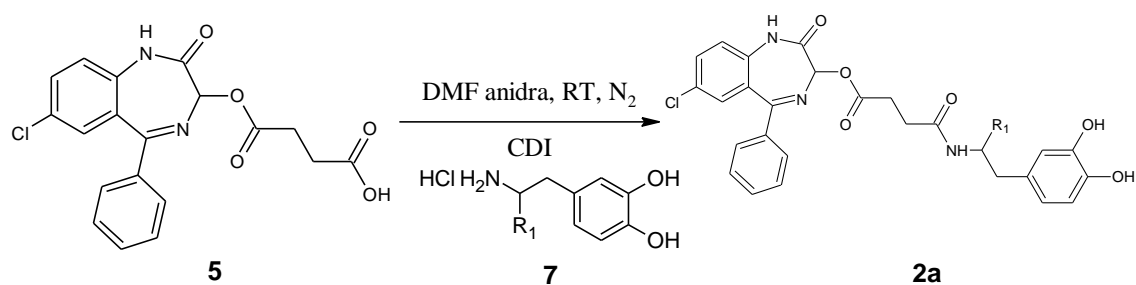
In 15 ml di THF anidro sono stati solubilizzati 143 mg di oxazepam (0.50 mmoli), con agitazione magnetica, ambiente di gas inerte (N₂), a temperatura ambiente. Alla soluzione sono stati aggiunti TEA (0.6 mmoli) e bis (4-nitrofenil) carbonato (303 mg, 1 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta nelle condizioni suddette per circa 2 ore durante le quali, successivi controlli su TLC, [utilizzando quale fase mobile la miscela 1/1 (v/v) di etere di petrolio (40-60°)/etile acetato] hanno evidenziato il progressivo formarsi dell'intermedio atteso. Alla soluzione, a temperatura ambiente, è stato aggiunto **8** (142 mg, 0.6 mmoli), previamente solubilizzato in DMF anidra. La soluzione è stata lasciata in agitazione per circa 12 ore durante le quali, successivi controlli su TLC [utilizzando come fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°)], hanno evidenziato la progressiva

formazione di un composto fluorescente con Rf minore rispetto a quello presentato dall'oxazepam. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un residuo, che è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice impiegando quale fase mobile la miscela 1/1 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°). Sono stati ottenuti 27.45 mg (0.05 mmoli) del prodotto (Resa 10%) il quale, ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹H-NMR 300 MHz (CDCl₃): δ (ppm) = 2.2 (s, 6 H, OCOCH₃), 2.85 (t, 2 H, CH₂), 3.45 (m, 2 H, CH₂), 5.95 (s, 1 H, CH), 6.4-6.75 (m, 3 H, CH arom.), 7.4-7.8 (m, 8 H, CH arom.), 7.8 (t, 1 H, NH). **LC-MASSA ESI⁻** m/z: 547.7 [M-H]⁻, **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 571.9 [M+Na]⁺. **IR** (KBr): 1720 cm⁻¹ (NHCO), 1770 cm⁻¹ (OCOCH₃).

Sintesi composto 2a



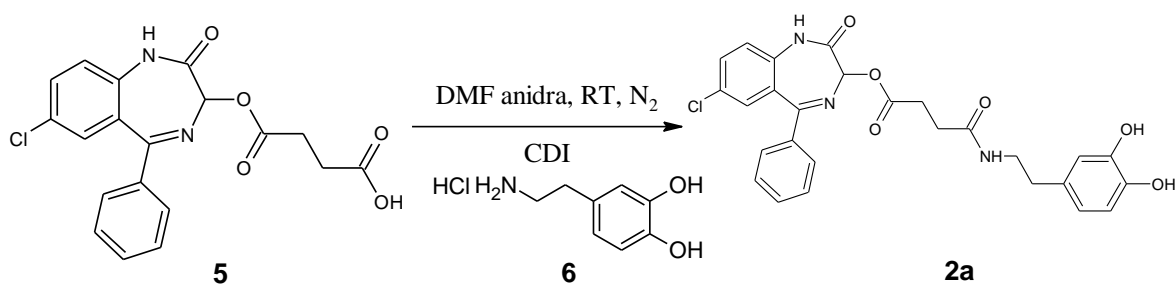
Reagenti	PM	Quantità
5	386	0.13 mmoli
7	261	0.20 mmoli
CDI	162	0.20 mmoli
DMF anidra		10 ml

In 10 ml di DMF anidra sono stati solubilizzati 50 mg del composto **5** (0.13 mmoli) con agitazione magnetica, in ambiente di gas inerte (N₂), a temperatura ambiente. Alla soluzione sono stati aggiunti CDI (1,1' carbonildiimidazolo) (32 mg, 0.20 mmoli) quale agente condensante e successivamente **7** (51 mg, 0.20 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta nelle condizioni suddette per circa 12 ore durante le quali, successivi controlli su TLC, [utilizzando quale fase mobile la miscela 2/8 (v/v) di etere di petrolio (40-60°)/etile acetato] hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con R_f minore rispetto a quello presentato dal composto **5**. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un residuo, che è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice impiegando quale fase mobile iniziale la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°), successivamente la miscela 9/1 (v/v) di etile acetato/metanolo. Sono stati ottenuti 14 mg (0.0234 mmoli) del prodotto (Resa 18%), che ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹H-NMR 300 MHz (CDCl₃): δ (ppm) =1.25 (t, 3H, CH₃), 2.90 (m, 2 H, OCOCH₂), 3.05 (m, 2 H, CH₂CO), 3.1 (m, 2 H, CH₂), 4.1 (m, 2 H, CH₂OCO), 4.2 (m, 1H, N-CHCOO), 5.95 (s, 1 H, N-CH-CO), 6.6-7.2 (m, 3 H, CH arom.), 7.18-7.75 (m, 8 H, CH arom.); **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 616 [M+Na]⁺ . **IR** (KBr): 1710 cm⁻¹ (NHCO).

Sintesi composto 2b



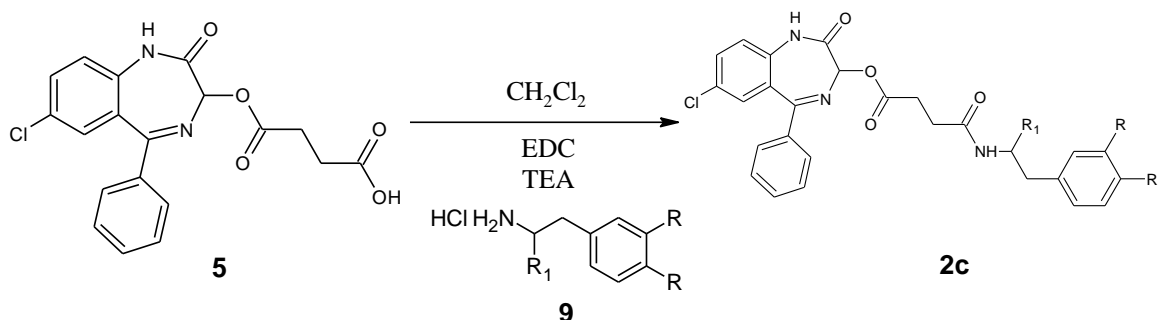
Reagenti	PM	Quantità
5	386	0.26 mmoli
6	189.64	0.39 mmoli
CDI	162.15	0.39 mmoli
DMF anidra		10 ml

In 10 ml di DMF anidra sono stati solubilizzati 100 mg del composto **5** (0.26 mmoli) con agitazione magnetica, in ambiente di gas inerte (N₂), a temperatura ambiente. Alla soluzione sono stati aggiunti CDI (1,1' carbonildiimidazolo) (63 mg, 0.39 mmoli) quale agente condensante e successivamente DA (74 mg, 0.39 mmoli). La miscela di reazione è stata mantenuta nelle condizioni suddette per circa 12 ore durante le quali, successivi controlli su TLC, [utilizzando quale fase mobile la miscela 2/8 (v/v) di etere di petrolio (40-60°)/etile acetato] hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con R_f minore rispetto a quello presentato dal composto **5**. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un residuo, che è stato purificato mediante flash cromatografia su colonna di gel di silice impiegando quale fase mobile iniziale la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°), successivamente la miscela 9/1 (v/v) di etile acetato/metanolo. Sono stati ottenuti 14.16 mg (0.0234 mmoli) del prodotto (Resa 9%), che ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹**H-NMR** 300 MHz (DMSO-d₆): δ (ppm) = 2.90 (m, 4 H, OCOCH₂, CH₂), 3.1 (m, 2 H, CH₂), 4.1 (m, 2 H, CH₂OCO), 5.95 (s, 1 H, N-CH-CO), 6.6-7.2 (m, 3 H, CH arom.), 7.18-7.75 (m, 8 H, CH arom.). **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 544 [M+Na]⁺, **LC-MASSA ESI⁻** m/z: 520 [M-H]⁻. **IR** (KBr): 1700 cm⁻¹ (CO), 3400 cm⁻¹ (OH)

Sintesi composto 2c



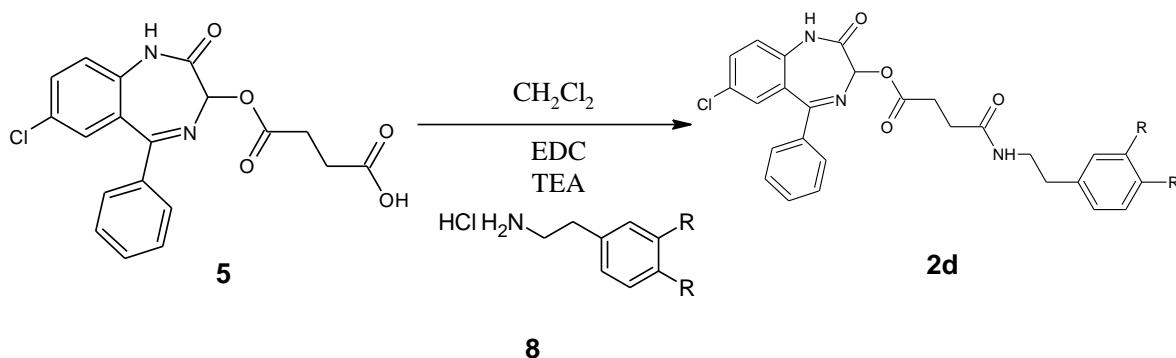
Reagenti	PM	Quantità
5	386	0.22 mmoli
9	275	0.27 mmoli
EDC	191.7	0.34 mmoli
TEA	101.19	0.39 mmoli
CH_2Cl_2		25 ml

In 15 ml di CH_2Cl_2 sono stati solubilizzati 85 mg del composto **5** (0.22 mmoli) con agitazione magnetica, a temperatura di zero gradi centigradi. Alla soluzione è stato aggiunto EDC (65 mg, 0.34 mmoli) quale agente condensante. Alla soluzione, dopo circa 30 minuti, è stato aggiunto il composto **9** (75 mg, 0.27 mmoli), previamente solubilizzato in 10 ml di CH_2Cl_2 , e successivamente TEA (39.4 mg, 0.39 mmoli). La miscela di reazione, portata a temperatura ambiente è stata mantenuta nelle condizioni suddette per circa 4 ore durante le quali, successivi controlli su TLC, [utilizzando quale fase mobile la miscela 2/8 (v/v) di etere di petrolio (40-60°)/etile acetato] hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con R_f maggiore a quello presentato dal composto **5**. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un residuo, che è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice impiegando quale fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°). Sono stati ottenuti 12 mg (0.018 mmoli) del prodotto (Resa 8%) il quale, ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹H-NMR 300 MHz (CDCl₃): δ (ppm) = 0.95 (m, 3H, CH₃), 2.2 (s, 6 H, OCO-CH₃), 2.5-3.1 (m, 6 H, CH₂), 3.5 (m, 2 H, CH₂), 4.1 (m, 2 H, CH₂OCO), 4.2 (m, 1H, N-CHCOO), 6.0 (s, 1 H, CH), 7.0-7.6 (m, 11 H, CH arom.). **LC-MASSA ESI⁺** m/z: 700 [M+Na]⁺, **LC-MASSA ESI⁻** m/z: 676 [M-H]⁻ **IR** (KBr): 1700 cm⁻¹(C=O).

Sintesi composto 2d



Reagenti	PM	Quantità
5	386	0.52 mmoli
8	275	0.52 mmoli
EDC	191.7	0.62 mmoli
TEA	101.19	0.78 mmoli
CH ₂ Cl ₂		30 ml

In 20 ml di CH₂Cl₂ sono stati solubilizzati 200 mg del composto **5** (0.52 mmoli) con agitazione magnetica, a temperatura di zero gradi centigradi. Alla soluzione è stato aggiunto EDC (120 mg, 0.62 mmoli) quale agente condensante. Alla soluzione, dopo circa 30 minuti, è stato aggiunto il composto **8** (143 mg, 0.52 mmoli), previamente solubilizzato in 10 ml di CH₂Cl₂, e successivamente TEA (78.8 mg, 0.78 mmoli). La miscela di reazione, portata a temperatura ambiente è stata mantenuta nelle condizioni suddette per circa 4 ore durante le quali, successivi controlli su TLC, [utilizzando quale fase mobile la miscela 2/8 (v/v) di etere di petrolio (40-60°)/etile acetato] hanno evidenziato la progressiva formazione di un composto fluorescente con R_f uguale a quello presentato dal composto **5**. L'allontanamento del solvente di reazione per evaporazione a pressione ridotta, ha fornito un residuo, che è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice impiegando quale fase mobile la miscela 8/2 (v/v) di etile acetato/etere di petrolio (40-60°). Sono stati ottenuti 96 mg (0.161 mmoli) del prodotto (Resa 31%) il quale, ha evidenziato caratteristiche spettrografiche in completo accordo con la struttura assegnata.

Caratteristiche spettrografiche e microanalitiche :

¹H-NMR 300 MHz (CDCl₃): δ (ppm) = 2.0 (s, 6 H, OCO-CH₃), 2.5-3.0 (m, 6 H, CH₂), 3.5 (m, 2 H, CH₂), 5.95 (s, 1 H, CH), 6.6 (t, 1 H, NH), 7.0-7.6 (m, 11 H, CH arom.).
LC-MASSA ESI⁺ m/z: 628 [M+Na]⁺, **LC-MASSA ESI⁻** m/z: 603.8 [M-H]⁻ **IR** (KBr): 1650-1700-1740-1760 cm⁻¹ (C=O), 3380 cm⁻¹ (N-H).

2) Stabilità chimica ed in soluzione fisiologica dei coniugati

A) Stabilità chimica dei composti 1a-d, 2a-d

Le cinetiche d'idrolisi chimica dei composti sono state effettuate in soluzione di tampone fosfato acquoso 0.05 M a pH 7.4 ed alla temperatura controllata di $37\text{ °C} \pm 0.2$ in bagno mantenuto in agitazione a 150 rpm. La quantificazione dei campioni è stata effettuata mediante analisi HPLC misurando l'area dei picchi in relazione alla curva di calibrazione di uno standard analizzato nelle medesime condizioni. Le soluzioni dei composti testati sono state preparate in DMSO (1 mg/ ml). Da ogni soluzione di ciascun composto è stata ottenuta una soluzione 100 μM aggiungendo un'aliquota fresca di soluzione tampone preequilibrata a $37\text{ °C} \pm 0.2$. Le soluzioni risultanti sono state poste su vortex e quindi poste nel suddetto bagno termostato. Ad appropriati intervalli di tempo, aliquote di 20 μl di ciascuna soluzione 100 μM sono stati iniettati. Le costanti cinetiche di idrolisi chimica, in accordo con una cinetica di pseudo primo ordine, sono state calcolate dalla pendenza della retta dei logaritmi naturali della concentrazione residua contro il tempo. Ciascun esperimento è stato condotto in duplicato.

Per le prove di stabilità chimica l'analisi HPLC è stata così condotta: software Empower, colonna C₁₈ Symmetry 150 mm in congiunzione con una precolonna (Sentry Guard Symmetry C18, 20 x 3.9 mm), CH₃OH / H₂O deionizzata 70 / 30 (v/v), velocità di flusso pari a 0.8 ml/min, λ di 254 nm, il volume d'iniezione impiegato è stato pari a 20 μl .

B) Stabilità in soluzione fisiologica dei coniugati composti 1a-d, 2a-d

L'idrolisi dei composti è stata studiata a $37\text{ °C} \pm 0.2$ in tampone fosfato 0.05 M a pH 7.4 contenente il 50 % di siero bovino. Il saggio ha inizio addizionando una aliquota di soluzione 100 μM in DMSO dei singoli composti a 3.9 ml della soluzione di siero preparata e preequilibrata a 37 °C . Ad appropriati intervalli di tempo, 100 μl sono stati prelevati e deproteinizzati, addizionatandoli a 400 μl di acetonitrile freddo. Dopo miscelamento mediante vortex e centrifugazione (10 min a 4000 rpm) aliquote di 20 μl di sopranatante filtrato sono state analizzate mediante HPLC, impiegando la stessa colonna e le modalità operative descritte nel precedente paragrafo. Ciascun esperimento è stato ripetuto in triplicato.

3) Parte sperimentale biologica

A) Esperimenti in vivo di microdialisi del composto 1b

In questi saggi sono stati impiegati ratti adulti (Harlan, San Pietro al Natisone, Udine, Italia) di sesso maschile Wistar con peso corporeo tra 225- 250 g. I ratti sono stati acclimatati per una settimana con un ciclo luce/buio di 12 ore ad una temperatura costante di 22 ± 1 °C , con cibo ed acqua *ad libitum*.

Il composto è stato sciolto in una soluzione salina con Tween 80 e PEG (90/5/5). I ratti sono stati anestetizzati con *equithesin* (3 ml/kg, i.p.) [sodio fenobarbitale (0.972 g), idrato di cloralio (4.251 g), magnesio solfato (2.125 g), etanolo (12.5 ml), e glicole propilenico (42.6 ml) in acqua distillata (volume totale, 100 ml)] ed un probe concentrico di microdialisi (AN 69 Hospal S.p.A; 20 KDa cut-off; lunghezza membrana 3 mm) è stato inserito nello striato in base alle coordinate stereotassiche: AP 1.0, ML \pm 2.8, DV -6.8 relativo al bregma (Paxinos e Watson, 1998). Gli esperimenti hanno inizio 24 ore dopo l'impianto del probe. Il Ringer [NaCl 145 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, CaCl₂·2H₂O 1.2 mmol/L, MgCl₂·6H₂O 1 mmol/L, NaHPO₄ 2 mmol/L (pH 7.4)] è stato introdotto nel probe con una velocità di flusso costante di 2 µl/min. I campioni di microdializzato sono stati raccolti ogni 20 min in mini fiale contenenti 3 µl di acido acetico al 10%. L'esperimento ha una durata di 4 ore durante i quali vengono raccolti 13 campioni di microdializzato da ciascun ratto. La concentrazione di DA dei campioni prelevati sono state individuate e quantificate mediante metodica HPLC. Tutti i probe sono stati testati in vitro prima di essere impiantati. Alla fine dell'esperimento il posizionamento del probe è stato verificato mediante esame istologico.

B) Colture cellulari MDCKII-MDR1

Nel presente studio sono state utilizzate MDCKII-MDR1 cells (passaggi 8-11). Tali cellule trasfettate con retrovirus contenenti il gene umano MDR1, sono state coltivate ed incubate ad una temperatura di 37° C e atmosfera al 5% di CO₂. La confluenza delle cellule è stata monitorata mediante microscopia ottica. Dopo circa 3-4 giorni dalla semina delle colture primarie, le cellule risultavano confluenti, quindi, è stata aggiunta una soluzione di Tripsina 0.05% ed EDTA. Dopo un periodo di incubazione di circa 5 minuti ad una temperatura di 37° C, la sospensione di cellule così ottenuta è stata centrifugata a 1.800 rpm per 5 min. Eliminato il sovrantante, il pellet è stato sospeso nel Medium fisiologico e quindi ripartito in pozzetti di

coltura cellulare (well tissue culture plates) o su membrane polimeriche semipermeabili di celle di diffusione (Transwell inserts) ad una densità di 50.000 cells/cm². Le cellule sono state tenute in vita in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), integrato con 10% di calf serum, penicillina 100 IU/ml, streptomina 100 µg/ml, 1% di ammino acidi non essenziali, 3.7 g di bicarbonato di sodio e HEPES 10 mM, pH 7.4. Dopo 5-8 giorni dalla semina le cellule risultavano completamente differenziate. L'integrità dei monostrati è stata valutata misurando la resistenza transepiteliale (TEER) mediante voltmetro epiteliale EVOM (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Il valore di TEER per i monostrati di MDCK è di circa 800 ohm.cm².

C) Studi di trasporto su monostrati cellulari MDCKII-MDR1

Gli studi di trasporto sono stati condotti su epitelii monocellulari di cellule MDCKII-MDR1 fatte crescere e differenziare su membrane semipermeabili di celle di diffusione (diametro 6.5 mm). Dopo aver aspirato il Medium fisiologico, le cellule sono state lavate tre volte con DPBS, pH 7.4. I volumi della camera apicale e basolaterale erano rispettivamente 0.5 e 1.5 ml. Gli esperimenti di trasporto sono stati condotti in un periodo di tempo di tre ore ed a determinati intervalli di tempo, aliquote di 200 µl sono state rimosse dal ricevente e rimpiazzate con terreno di trasporto, al fine di mantenere le *sink conditions*. I campioni prelevati sono stati analizzati mediante HPLC.

Per gli studi di trasporto l'analisi HPLC è stata così condotta: colonna C₁₈ Phenomenex Synergi Hydro 250 mm in congiunzione con una precolonna (Sentry Guard Symmetry C₁₈, 20 x 3.9 mm). Per il composto **1b** la fase mobile utilizzata è stata CH₃OH / H₂O deionizzata 70 / 30 (v/v), velocità di flusso pari a 0.8 ml/min, λ di 254 nm. Per la dopamina la fase mobile utilizzata è stata K₂HPO₄ 20 mM pH 2.5, velocità di flusso pari a 1 ml/min, λ di 280 nm. Il volume d'iniezione impiegato è stato pari a 20 µl. La quantità di [³H]L-dopa trasportata attraverso l'epitelio è stata valutata mediante spettrofotometria con liquido scintillante.

Parte II

A) Ruolo fisiopatologico della proteina di translocazione (TSPO) e caratteristiche dei ligandi a struttura imidazopiridinica

Nell'ambito di un progetto di ricerca mirato all'individuazione del sito di legame per il Diazepam nei tessuti periferici, fu identificata una struttura recettoriale, denominata "*Peripheral-type Benzodiazepine Receptor*" (PBR),^{17, 18} recentemente ridefinito con il termine di "*Translocator Protein*" (TSPO), Proteina di Translocazione, nome che appare maggiormente rappresentativo della funzione molecolare, del ruolo subcellulare della proteina e allo stesso tempo adattabile alla sua localizzazione attraverso l'uso delle diciture "*mitochondrial translocator protein*" ("*mito-TSPO*") e "*nuclear translocator protein*" ("*nuc-TSPO*"), che indicano la presenza della proteina, rispettivamente, a livello mitocondriale o nucleare e perinucleare.¹⁹ La localizzazione a livello subcellulare del TSPO è stata dimostrata inizialmente nella membrana mitocondriale esterna (OMM) ed in particolar modo nei siti di contatto tra OMM e la membrana mitocondriale interna (IMM), attraverso l'uso del ligando selettivo a struttura isochinolinica [³H] PK 11195 in studi biologici di legame sulle ghiandole surrenali di ratto. Ulteriori ricerche, hanno dimostrato la presenza del TSPO nel nucleo e nell'area perinucleare delle cellule umane di carcinoma della mammella, e di tumori cerebrali, come il glioma umano, evidenziando la possibile correlazione tra la localizzazione della proteina a tale livello e lo stato patologico.²⁰

Il TSPO è una proteina transmembrana con massa molecolare di 18 kDa, costituita da 169 amminoacidi, ricca di triptofano e altamente idrofobica. Studi con modelli tridimensionali hanno dimostrato che il TSPO presenta una struttura costituita da 5 α -eliche che attraversano la membrana mitocondriale, con l'estremità C-terminale rivolta verso il citoplasma e la relativa amminica in direzione dello spazio intermembranale.²¹ (Figura 10)

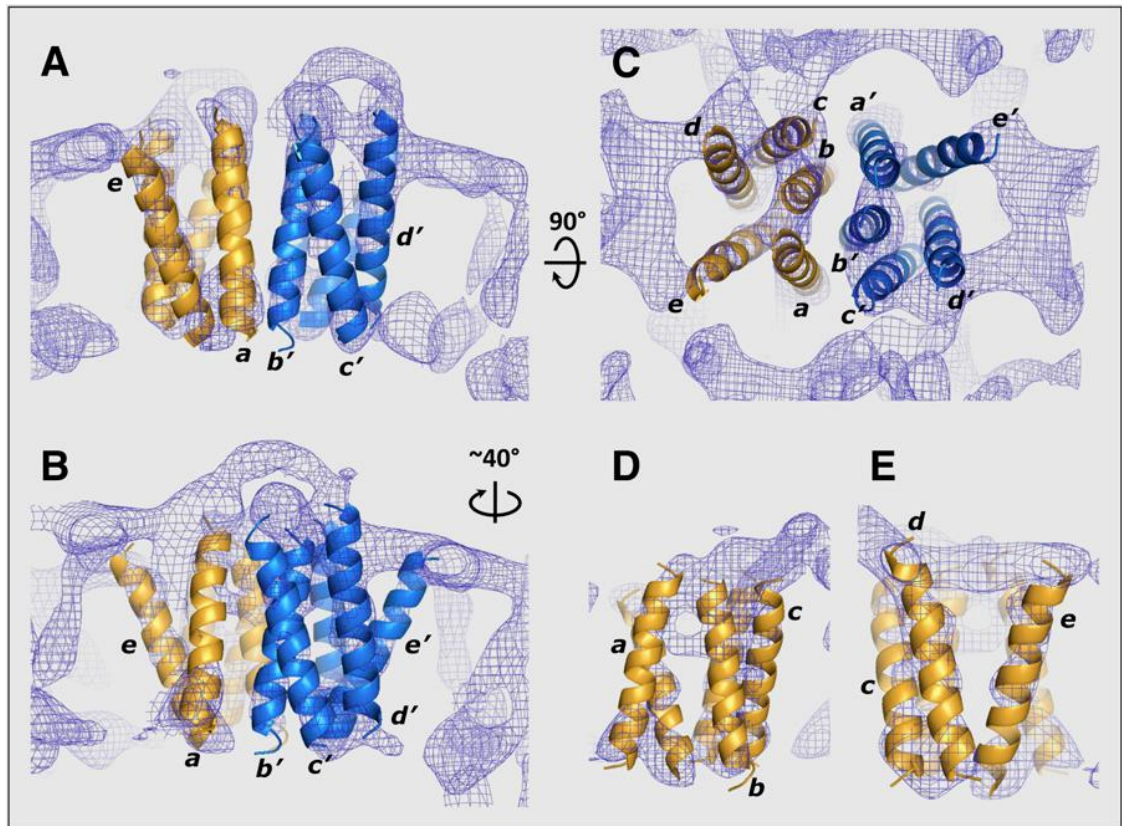


Figura 10. Ricostruzione tridimensionale della proteina TSPO mediante criomicroscopia elettronica.

Il TSPO è un fondamentale componente del complesso multiproteico noto come “*Mitochondrial Permeability Transition Pore*” (poro transiente di permeabilità mitocondriale, MPTP). Tale complesso ha una massa molecolare compresa tra 140 e 200 kDa ed è costituito da altre importanti subunità proteiche (Figura 11):

- un canale anionico voltaggio-dipendente (VDCA) di 32 kDa, localizzato a livello della OMM, che contiene il sito di legame per le benzodiazepine e caratterizzato da elevata conduttanza e scarsa selettività ionica;^{22, 23}
- il trasportatore Adenina Nucleotide Translocasi (ANT) di 30 kDa, localizzata nella IMM e capace di legare le benzodiazepine;²²
- una proteina indicata come “PRAX-1” (*PBR-associated protein 1*), associata al TSPO, implicata nel processo di dimerizzazione del recettore;²⁴
- una proteina chiamata “PAP7” (*PBR-associated protein 7*) coinvolta nella biosintesi degli steroidi.²⁵

Il complesso multimerico include, inoltre, altri tipi di proteine quali la creatina chinasi, l'esochinasi, le proteine della famiglia della BCl-2^{26,27}, una proteina di 10 kDa la cui funzione è sconosciuta, la proteina StAR, ed il fattore di virulenza del Myxoma Poxvirus M11L, che previene l'apoptosi attraverso l'inibizione della riduzione del potenziale di membrana mitocondriale ed il rilascio del citocromo C mitocondriale.²⁸

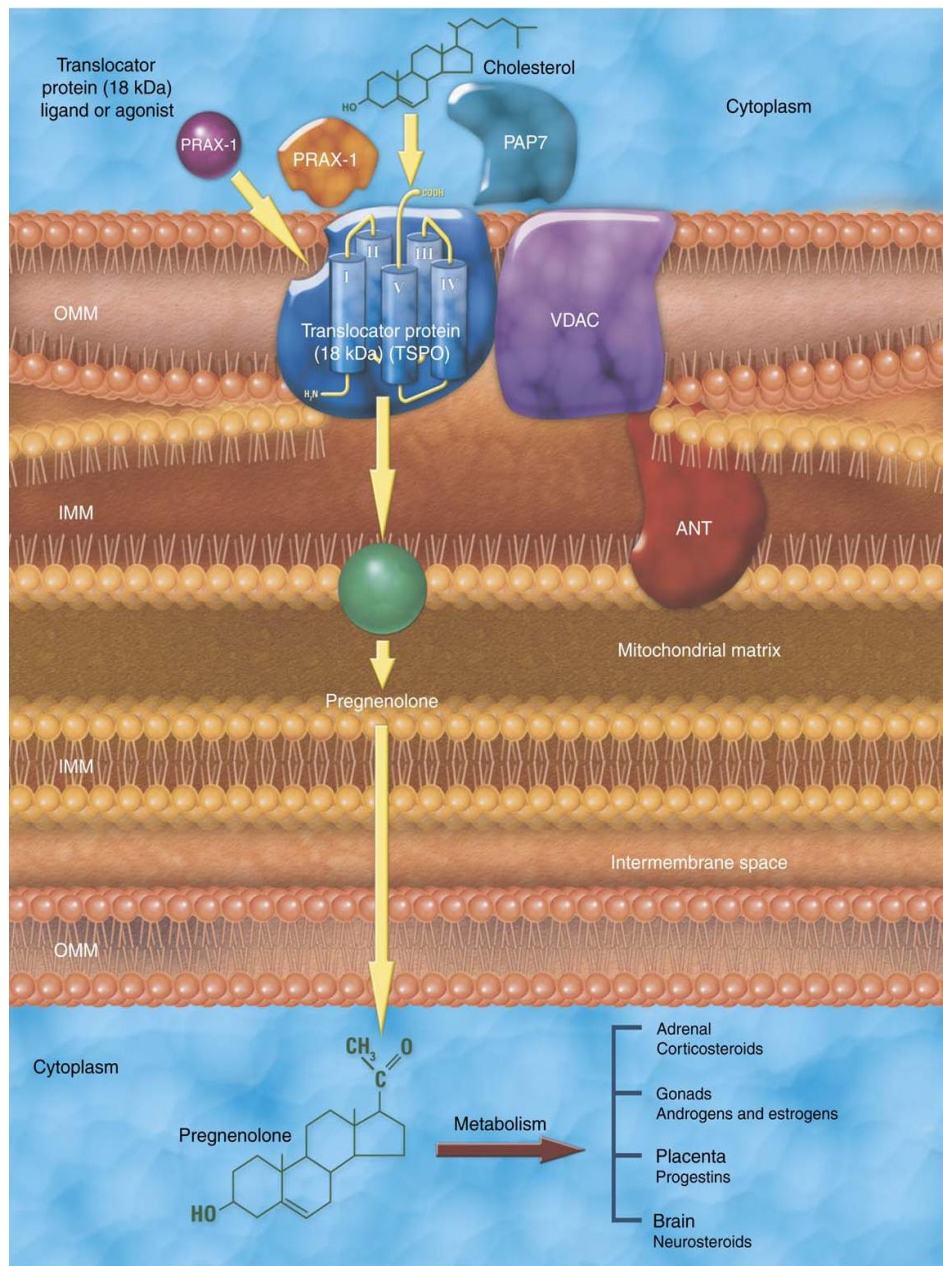


Figura 11. Struttura del TSPO e biosintesi degli steroidi²¹.

Un ampio spettro di funzioni biologiche e cellulari sono associate alla proteina di translocazione, come:

- Steroidogenesi
- Apoptosi
- Omeostasi del calcio
- Ossidazione mitocondriale
- Sintesi mitocondriale di ATP
- Metabolismo lipidico
- Crescita e differenziazione cellulare
- Immunomodulazione
- Trasporto delle porfirine
- Biosintesi dell'EME
- Trasporto del colesterolo
- Trasporto anionico

Fra queste differenti funzioni, di particolare interesse sono quelle riferite alla biosintesi di steroidi sia a livello centrale che periferico ed al coinvolgimento del TSPO nei processi apoptotici.

A livello periferico, la sintesi degli steroidi è regolata da ormoni trofici quali l'ACTH ed LH. L'interazione di questi con gli specifici recettori determina un aumento del trasporto del colesterolo dai siti di deposito alla IMM (TSPO e proteina StAR regolano questo processo). Qui il citocromo P-450 ossida il colesterolo a pregnenolone, che è poi convertito in progesterone nel reticolo endoplasmatico mediante una deidrogenasi.²⁹ Entrambi sono precursori importanti per la sintesi di steroidi neuroattivi.

A livello centrale, i neurosteroidi vengono sintetizzati ex novo a partire dal colesterolo con un processo simile a quello utilizzato in periferia dalle surreni e dalle gonadi.³⁰ Le cellule gliali (oligodendrociti ed astrociti) sono la sede principale di tale processo che comporta la sintesi di neurosteroidi responsabili della modulazione della trasmissione gabaergica e glutaminergica, della riduzione dell'ansia e conflittualità e di un effetto neuroprotettivo.³¹

È ben noto che gli steroidi sintetizzati nel cervello modificano l'attività neuronale modulando la funzione del recettore GABA_A. Cambiamenti nei livelli dei neurosteroidi sono associati con varie condizioni fisiologiche e patologiche includenti stress, gravidanza, sviluppo neuronale, invecchiamento e depressione postpartum. I momenti del processo

apoptotico sono di difficile definizione cronologica, nonostante molti dei singoli fenomeni siano conosciuti. Per quanto concerne il coinvolgimento del TSPO nel processo apoptotico, diversi studi hanno dimostrato che alcuni ligandi selettivi per la proteina di translocazione inducono apoptosi ed arresto del ciclo cellulare nelle cellule cancerose. L'apertura dell'MPTP rappresenta un evento cruciale nel processo di morte cellulare programmata, causando in ordine la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale con il conseguente disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa e quindi il blocco della sintesi di ATP e la formazione di radicali liberi. L'apertura prolungata del poro induce permeabilizzazione della IMM con rigonfiamento osmotico della matrice e rilascio del Cyt-C e del Fattore Inducibile dell'Apoptosi (AIF). Queste due proteine pro-apoptotiche provocano l'attivazione delle vie intracellulari responsabili delle alterazioni nucleari tipiche del processo apoptotico.²⁸

Negli ultimi anni, studi biologici hanno evidenziato una sovraespressione del TSPO nei macrofagi attivati (cellule che si accumulano principalmente intorno ad un sito infiammatorio), e nella microglia (un tipo di cellule della glia che si occupano della principale difesa immunitaria a livello del sistema nervoso centrale). Infatti, nonostante il cervello contenga livelli di TSPO relativamente bassi, si è notato che la densità recettoriale aumenta in maniera drammatica dopo vari tipi di danno a livello cerebrale, legati a numerose condizioni fisiopatologiche come ansia, ischemia, epilessia, morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, Corea di Huntington, sclerosi multipla, lesioni traumatiche e tossiche del sistema nervoso centrale.³² L'implicazione dello stesso TSPO in patologie neoplastiche ha inoltre suscitato notevole interesse nella ricerca farmaceutica. Alterazioni nell'espressione di tale proteina, risultano essere rilevanti nei casi di: tumore cerebrale, del colon retto, del fegato, prostata, adenocarcinoma, glioma, e con una maggiore incidenza nel caso di neoplasia mammaria.²¹

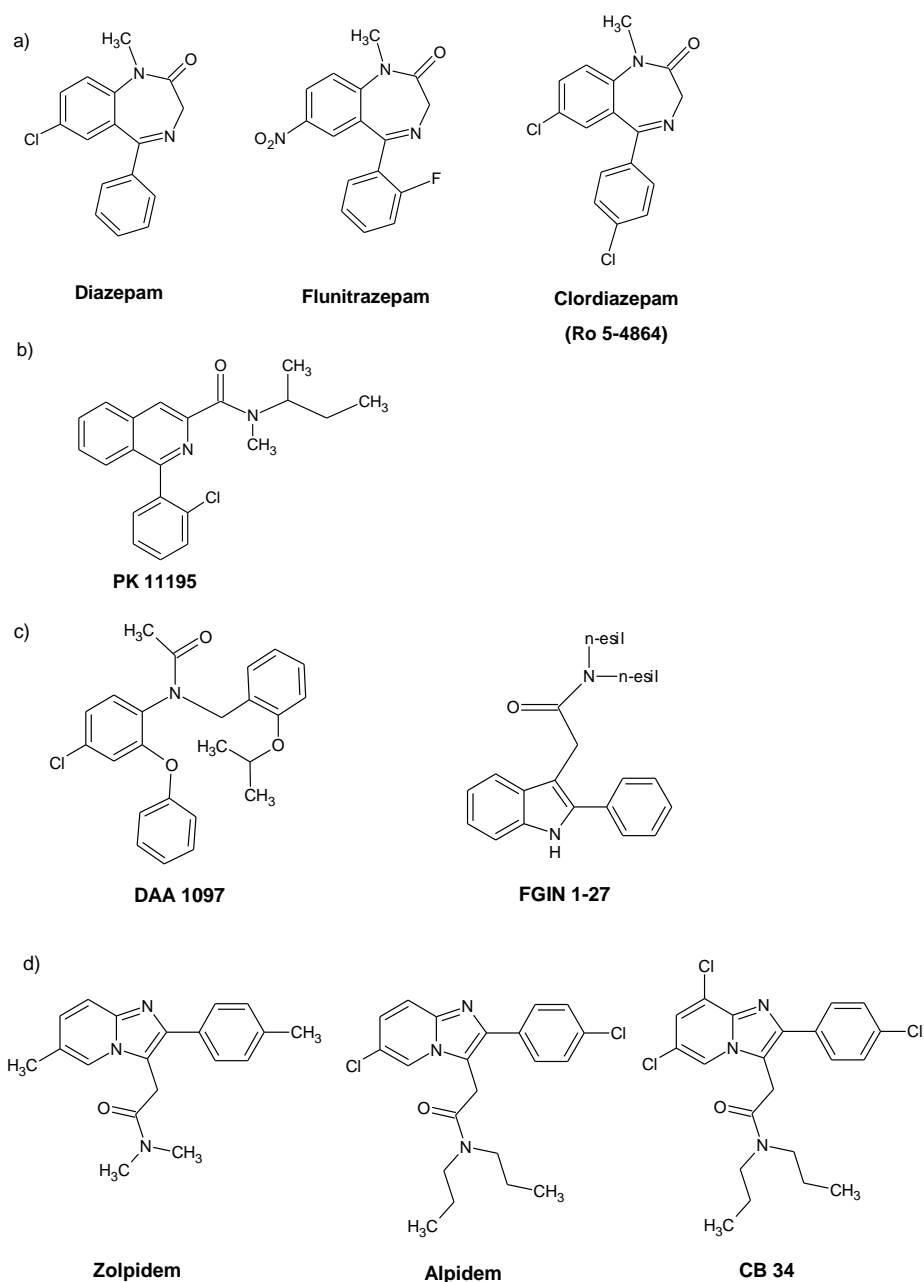
Analisi immunostochimiche su cervello e colon affetti da neoplasie dimostrano che oltre l'espressione, anche la distribuzione del TSPO risulta alterata. In particolare nelle cellule a più rapida proliferazione si ha un aumento della densità recettoriale a livello delle regioni nucleari e perinucleari piuttosto che sulla membrana mitocondriale.^{33, 34} Dal 2001 ad oggi gli studi *in vitro* condotti su cellule umane derivanti da carcinoma colon rettale hanno dimostrato che esiste una correlazione tra entità dell'amplificata espressione del TSPO ed il grado di malignità.^{35, 36}

Alla luce di quanto riportato, risulta evidente l'interesse scientifico verso ligandi selettivi ad azione agonista o antagonista per il TSPO, che potrebbero trovare una potenziale applicazione in campo terapeutico-farmacologico, nella diagnostica per immagini, nell'ambito dell'oncologia, dell'endocrinologia e della neuropsichiatria.

Nel corso degli anni, infatti, sono stati identificati molti ligandi per la proteina di translocazione sia endogeni che sintetici, questi, classificabili in sei principali gruppi (Figura 12):

1. Derivati Benzodiazepinici (RO-5-4864) che si legano selettivamente e con alta affinità al TSPO, ma hanno bassa affinità per il CBR; ³⁷
2. Isochinolin-Carbossammidi (PK 11195, attualmente il più usato *probe* specifico per i recettori benzodiazepinici periferici, e PK 14105), anche essi dotati di alta affinità per il TSPO; ³⁷
3. L'Indolacetamide FGIN-1-27, dotato di alta affinità per il TSPO con una più alta selettività per il CBR, e derivati; ³⁸
4. Pirrolobenzossazepine; ³⁹
5. Derivati Piridazinoindolici; ⁴⁰
6. Derivati Imidazopiridinici ottenuti apportando variazioni strutturali all'Alpidem, come il CB 34 in grado di potersi legare selettivamente alla proteina TSPO. ^{41, 42}

Figura 12. Ligandi sintetici per il TSPO con struttura: a) benzodiazepinica; b) isochinolinacetammidica; c) fenossifenilacetammidica; d) indolacetammidica.



In aggiunta a questi ligandi di sintesi affini per il TSPO, ne sono stati identificati altri, definiti ligandi endogeni, la cui individuazione e studio ha contribuito alla caratterizzazione delle funzioni biochimiche e farmacologiche di tale recettore, come:

- il DBI (*Diazepam Binding Inibitor*) o *endozepina* con affinità di legame micromolare (μM) per il TSPO. Questa molecola non è selettiva per questo recettore in quanto è in

grado di legarsi anche al CBR. Il DBI è presente sia a livello del SNC, in modo predominante nelle cellule gliali, sia a livello degli organi periferici, in particolare nelle cellule steroidogeniche;

- il *colesterolo*, capace di legare con affinità di legame nanomolare (nM) il dominio citosolico carbossi-terminale, chiamato CRAC (*Cholesterol Recognition Cytosolical Amino acid Consensus*) del TSPO;
- le *porfirine* che risultano selettive per il TSPO poiché possiedono un'elevata affinità di legame (nM) per il TSPO, ma non per il CBR.³²

Il gruppo di ricerca presso il quale il sottoscritto ha svolto il presente lavoro di tesi è impegnato da anni nella sintesi e valutazione biologica di nuovi ligandi del TSPO, a struttura imidazopiridinica, analoghi del farmaco ansiolitico Alpidem (figura 12). Alcuni dei nuovi composti sintetizzati, caratterizzati da elevata lipofilia, risultano potenzialmente interessanti nella ricerca farmaceutica al fine di ottenere:

- ligandi selettivi antagonisti per il TSPO, da utilizzare, insieme ai ligandi ad azione agonista già noti, negli studi farmacologici;
- ligandi selettivi del TSPO coniugabili con *probes* fluorescenti o marcati con un appropriato radioisotopo, da impiegare in tecniche diagnostiche come *Positron Emission Tomography* (PET) e *Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT), per la diagnosi di malattie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer, o tumori cerebrali quali i gliomi;
- ligandi coniugabili con appropriati farmaci antitumorali per un rilascio sito-specifico nei confronti di masse tumorali cerebrali, esprimenti elevati livelli di TSPO, in modo da minimizzare gli effetti collaterali e migliorare l'efficacia del trattamento.

Inoltre, studi di approfondimento delle relazioni struttura-affinità (SAR) e relazione struttura-selettività (SSR), hanno dimostrato che (figura 13):

- la selettività recettoriale è notevolmente influenzata dalla presenza di sostituenti di diversa natura agli atomi di carbonio in posizione C(6) e C(8) del nucleo imidazopiridinico;
- la presenza di particolari gruppi, come alogeni o metile, in posizione C(6) del nucleo imidazopiridinico porta ad una selettività preferenziale per il CBR, mentre

l'inserimento dei suddetti gruppi in posizione C(8) dello stesso nucleo, sposta la selettività verso il TSPO.

- l'affinità verso la proteina di translocazione è fortemente potenziata dall'immissione di un atomo di alogeno in para sul fenile in posizione **2** del nucleo imidazopiridinico;
- una catena acetammidica in posizione **3** del nucleo imidazopiridinico potenzia l'affinità per entrambi i recettori;
- sostituenti alchilammidici di lunghezza compresa tra quattro e sei atomi di carbonio, mostrano i valori migliori di affinità su entrambi i recettori (CBR e TSPO). In particolare, l'interazione con il TSPO è sfavorita dall'incremento della lunghezza delle catene alchiliche sull'atomo di azoto ammidico, al contrario l'introduzione di sostituenti aromatici sullo stesso atomo potenzia l'affinità e la selettività per il TSPO.

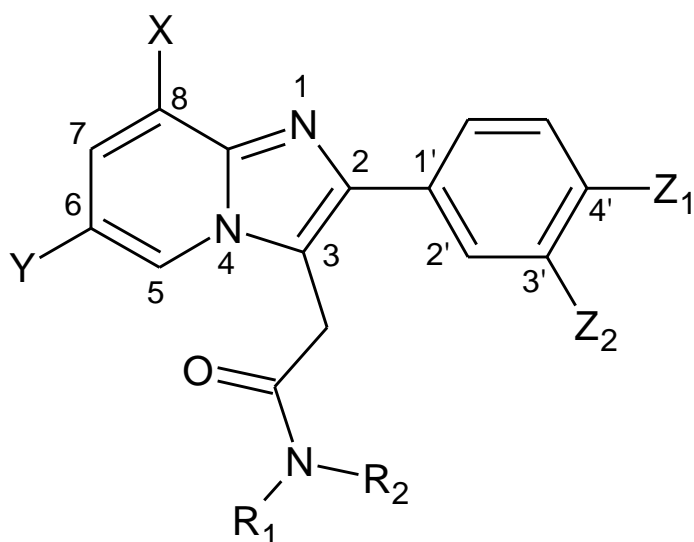


Figura 13. Struttura generale di composti imidazopiridinici.

B) Preparazione di sistemi nanoparticellari modificati con ligandi del TSPO potenzialmente utili per la veicolazione ed il rilascio mirato del fluorouracile nella terapia dei tumori cerebrali

Le strategie tecnologiche utili per il rilascio di farmaci al SNC sono essenzialmente metodiche di tipo non invasivo e rappresentano validi approcci per incrementare la permeabilità transcellulare di agenti terapeutici e biomacromolecole attraverso la BEE. Esse si basano sull'utilizzo di nanosistemi, carriers colloidali, principalmente liposomi e nanoparticelle polimeriche come pure nanoparticelle solide lipidiche, micelle polimeriche e dendrimeri. Attraverso la somministrazione endovenosa, i sistemi colloidali possono extravasare solamente nei tessuti con un endotelio capillare discontinuo, come fegato, milza, e midollo osseo, come pure all'interno di tumori solidi e tessuti infiammati dove le cellule endoteliali non sono strettamente serrate tra di loro e la permeabilità vascolare è nettamente incrementata. Opportunamente modificati in superficie, i nanovettori possono rappresentare degli efficienti strumenti finalizzati ad ottenere un rilascio sito specifico su un determinato target o permettere ad un farmaco l'attraversamento delle barriere biologiche. In particolare, al fine di ottenere un direzionamento al SNC di farmaci caratterizzati da un certo grado di idrofilia (che ne sfavorisce l'attraversamento della BEE), i sistemi colloidali possono avere appropriate *targeting moieties* sulla loro superficie, come ad esempio ligandi affini e selettivi per strutture recettoriali implicate nelle patologie tumorali cerebrali.

Recentemente la proteina di translocazione TSPO ha suscitato notevole interesse nella ricerca farmaceutica. Studi biologici hanno evidenziato il suo coinvolgimento nel processo apoptotico,¹⁹ e l'implicazione nelle malattie neoplastiche. Questo ha portato a condurre sforzi notevoli nella ricerca di nuovi ligandi selettivi ed affini per la proteina di translocazione, in grado di indurre apoptosi ed arresto del ciclo cellulare nelle cellule cancerose,⁴³ con potenziali applicazioni nel campo del *drug targeting*.

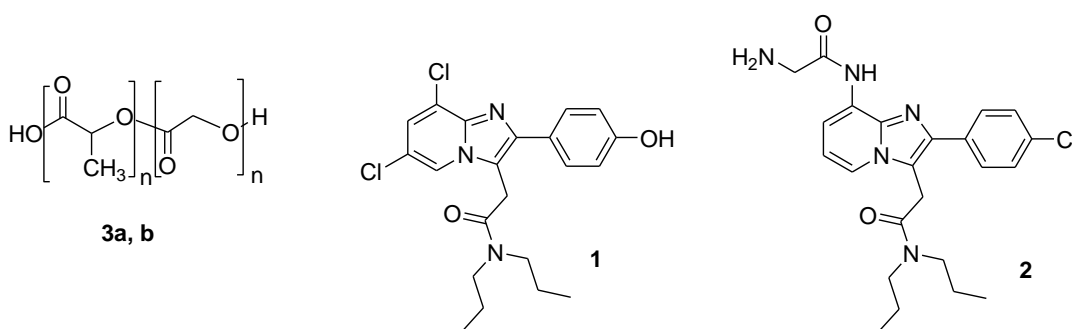
Sulla base delle considerazioni esposte, nella seconda parte della tesi il sottoscritto ha effettuato la preparazione e caratterizzazione di nanoparticelle (NP), preparate impiegando bioconiugati polimerici tra il copolimero poliestere dell'acido poli-DL-lattico-*co*-glicolico (PLGA) e ligandi selettivi per il TSPO. Per la preparazione dei bioconiugati (schemi 4, 5, 6) sono stati pertanto impiegati il polimero biodegradabile e biocompatibile PLGA a differenti pesi molecolari [Resomer RG502H, Mw=10000 Da (**3a**) e RG503H, Mw=35000 Da (**3b**)], caratterizzato da un gruppo carbossilico ed uno alcolico primario terminali, coniugato con i due ligandi imidazopiridinici (**1** e **2**) altamente affini e selettivi per il TSPO, potenzialmente

utili nella mediazione di processi apoptotici TSPO-mediati (Figura 14).^{43, 44} Inoltre sono state formulate nanoparticelle degli stessi bioconiugati polimerici incorporanti un noto farmaco antitumorale, il 5-fluorouracile (5-FU), allo scopo di avere un potenziale sistema di rilascio nanoparticellare direzionato, utile per la terapia mirata dei tumori cerebrali.^{45, 46, 47, 48}

Sia le NP direzionate “non cariche” che le NP direzionate “cariche” che veicolano il farmaco antitumorale sono state pienamente caratterizzate in termini di dimensione, morfologia, caratteristiche di superficie, resa di processo, efficienza di incapsulamento (EE) e quantità di farmaco incorporato (*Drug Loading DL*). In particolare una formulazione di riferimento, scelta sulla base delle caratteristiche dimensionali, dell’EE e del DL è stata utilizzata per lo studio dell’analisi chimica di superficie, allo scopo di verificare che la porzione del ligando attaccata chimicamente al polimero, sia presente anche sulla superficie.

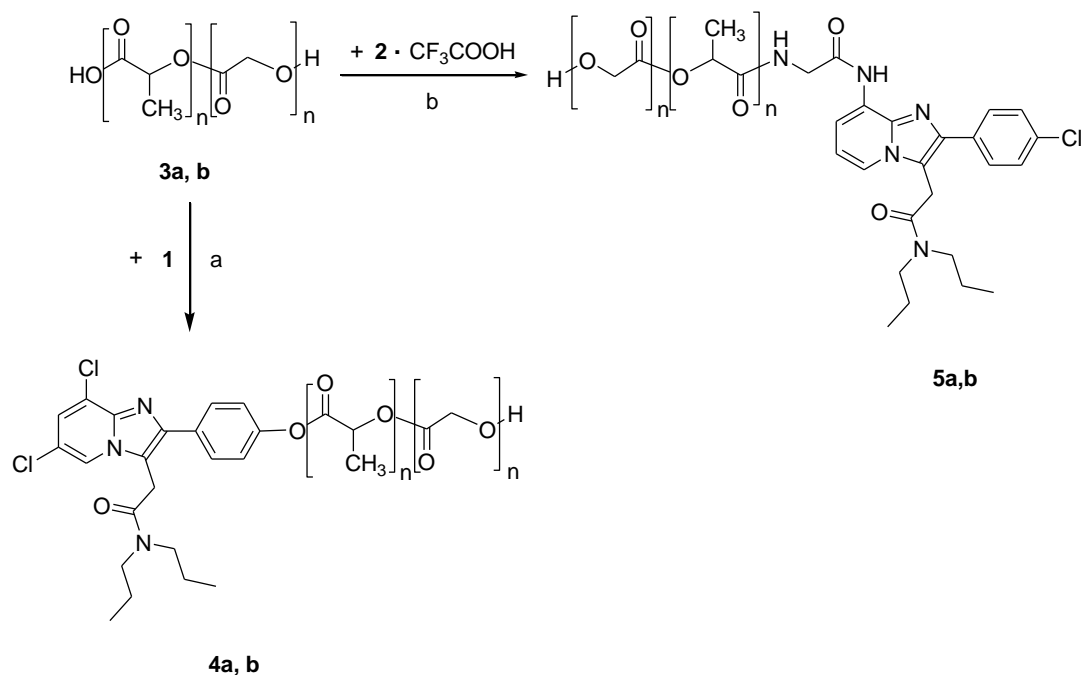
Inoltre, in questo studio è stata valutata la possibilità di ottenere un effetto sinergico tra il farmaco antitumorale ed il ligando selettivo del TSPO, impiegato quindi sia come direzionante nelle NP che come potenziale agente proapoptotico. A tale riguardo sono stati preparati e valutati sistemi nanoparticellari direzionati ed incorporanti contemporaneamente il ligando **1** ed il 5-FU. Detti sistemi sono stati infine confrontati, nei saggi biologici con le analoghe formulazioni di NP direzionate e caricate con solo 5-FU.

Figura 14. Strutture ligandi affini e selettivi per il TSPO (**1**, **2**), polimero PLGA (**3a**, **b**).



Negli schemi 4, 5, 6 sono state riportate le vie sintetiche seguite per la preparazione dei coniugati polimerici.

Schema 4.

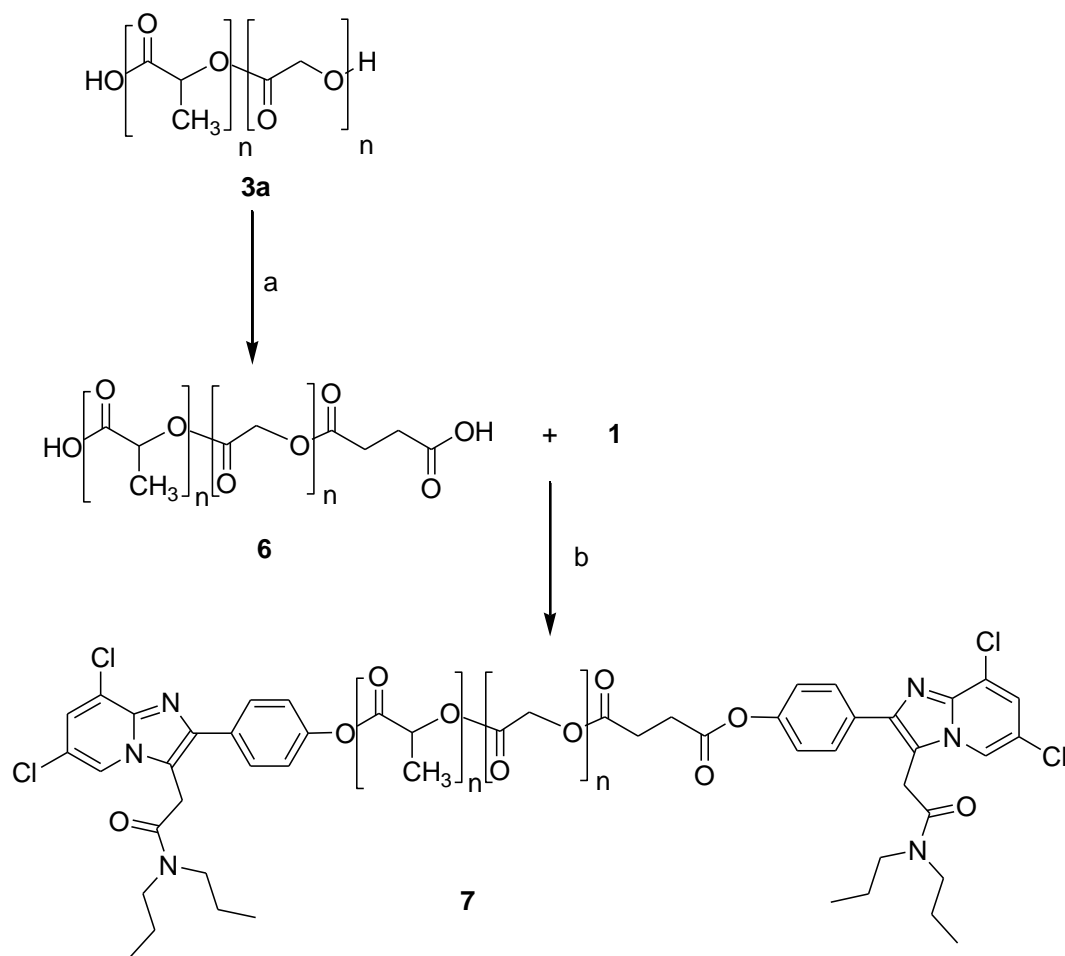


- a) DCC, HOBT, TEA, CH₂Cl₂, rt, 72 h.
 b) CDI, CH₂Cl₂, rt, 72h.

I coniugati polimerici **4a, b** sono stati ottenuti per esterificazione della funzione carbossi-terminale del PLGA con il gruppo fenolico posizionato in para all'anello fenilico del composto **1**, utilizzando *N,N'*-dicicloesilcarbodiimmide (DCC) e *N*-idrossibenzotriazolo come agenti condensanti e trietilamina (TEA) come catalizzatore.

I coniugati polimerici **5a, b** sono stati ottenuti per formazione di un legame ammidico tra la funzione carbossi-terminale del PLGA con il gruppo amminico del composto **2**, precedentemente preparato come sale trifluoroacetato. La reazione è stata effettuata in diclorometano (CH₂Cl₂), a temperatura ambiente, per 72 ore, utilizzando 1,1' carbonildiimidazolo (CDI) come agente condensante.

Schema 5.

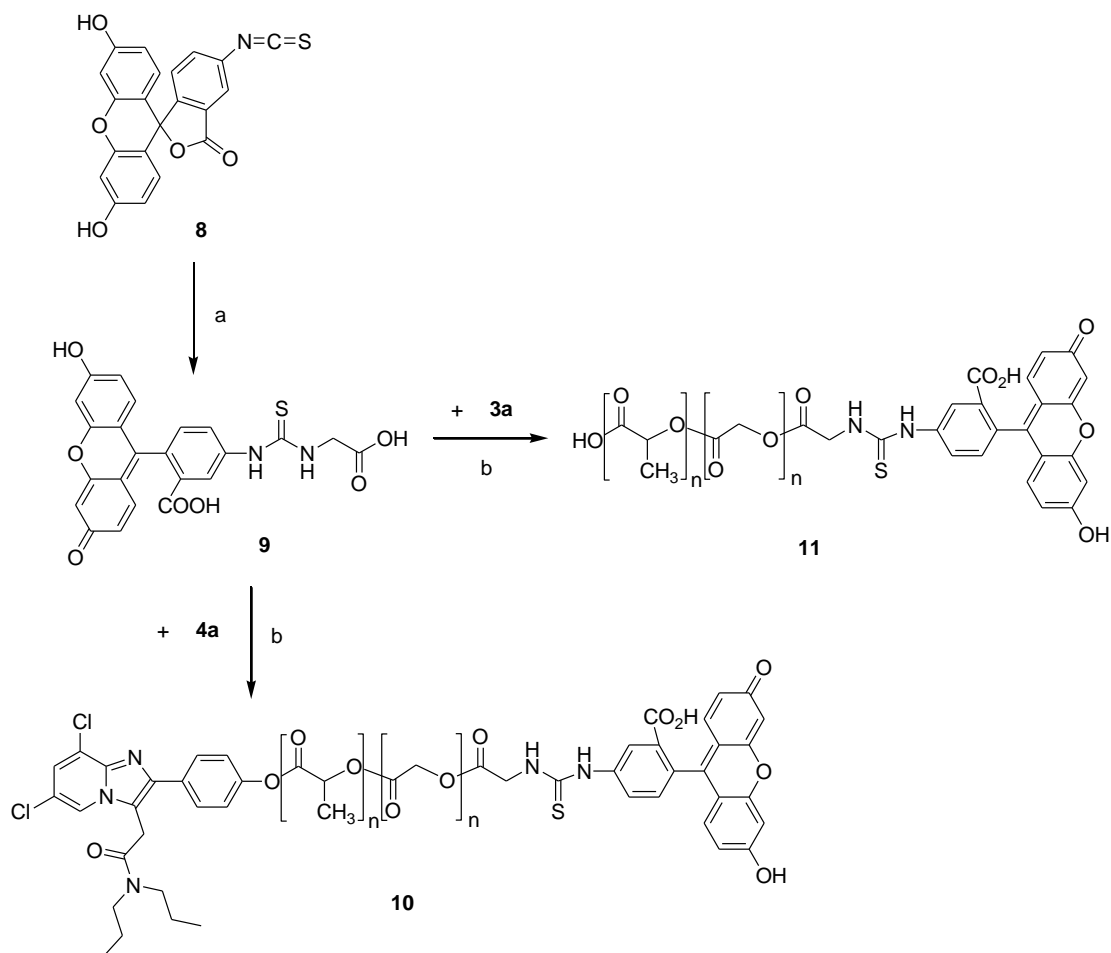


a) Succinic anhydride, DMSO, rt, 48 h.

b) DCC, HOBT, TEA, CH₂Cl₂, rt, 72 h.

La sintesi del coniugato polimerico **7** è stata realizzata attraverso l'intermedio emisuccinato del PLGA **6**, ottenuto per esterificazione del PLGA con anidride succinica. L'intermedio **6** presenta, quindi, due funzioni carbossiliche esterificabili ognuna con una molecola di ligando **1**, attraverso una reazione condotta nelle stesse condizioni proposte per i coniugati polimerici **4a, b**.

Schema 6.



- a) Glycine, TEA, DMF, 0°C, 1h.
b) EDC, HOBT, TEA, DMF:THF 1:1, rt, 12h

La sintesi dei composti **10** e **11**, coniugati polimerici fluorescenti, sono stati ottenuti mediante la formazione di un legame estereo tra il gruppo carbossi-terminale del composto **9**, fluoresceina isotiocianato **8** attivata precedentemente con l'inserimento di un residuo glicinico, ed il gruppo alcolico terminale dei coniugati polimerici **3a** e **4a**, utilizzando N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etil carbodiimide cloridrato (EDC) e N-idrossibenzotriazolo come agenti condensanti e trietilamina (TEA) come catalizzatore.

1) Parte sperimentale Tecnologica-formulativa

A) Materiali

I Resomer RG 502H e RG 503H, caratterizzati da un rapporto molare tra acido lattico ed acido glicolico di 50/50, sono stati acquistati dalla Boehringer-Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germania). Il tensioattivo Lutrol è stato fornito dalla BASF (Germania). Il 5-fluorouracile (5-FU) è stato acquistato dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Tutti gli altri prodotti chimici sono stati di grado analitico. Il composto imidazopiridinico **1** (*N,N*,-di-*n*-propyl-[2-(6,8-dichloro-2-(4-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridin-3-yl)]acetamide) ed i corrispettivi coniugati polimerici (schemi 4, 5, 6) sono stati sintetizzati nei nostri laboratori, in base alle procedure descritte e precedentemente pubblicate.^{43,44}

B) Apparecchiatura

Le analisi HPLC sono state condotte con una pompa isocratica HPLC modello 1515 della Waters Associates (Milford, MA), una colonna Symmetry C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm), un detector Waters 2487 UV-visibile (Breeze Software per analizzare i dati cromatografici), e come eluente una soluzione di tampone fosfato (1 mM, pH 7.4) /metanolo 40:60 (v/v) con flusso di 0.8 ml/min. Durante tutta l'analisi l'effluente è stato monitorato continuamente mediante UV ad una lunghezza d'onda di 266 nm per analizzare il 5-FU. Per la quantificazione del ligando TSPO **1** incorporato nelle NP sono stati utilizzati un eluente costituito da acqua/metanolo 30:70 (v/v) con flusso di 0.8 ml/min ed una lunghezza d'onda di 254 nm..

C) Preparazione di sistemi nanoparticellari secondo la metodica dell'evaporazione del solvente O/W

Le nanoparticelle dei coniugati polimerici sono state preparate utilizzando il metodo della *quasi* -emulsione diffusione del solvente (QSESD),⁴⁹ mentre quelle con i coniugati polimerici che incorporano il 5-FU con o senza il ligando **1** sono state ottenute mediante il metodo della doppia emulsione e diffusione del solvente (DESD, w/o/w).⁵⁰ E' stata preparata

una soluzione dei coniugati **4-5** e **10** (30 mg) in acetone (3 ml) alla temperatura ambiente. Questa fase organica è stata successivamente sgocciolata in 30 ml di una soluzione acquosa allo 0.1% (w/v) di Lutrol[®] F68. La risultante miscela è stata omogeneizzata usando un omogenizzatore Ultra-Turrax T25 (Janke and Kunkel, Germania), equipaggiato con un sistema di dispersione S25N, a 13,000 rpm per 30 secondi, e quindi lasciata in costante e vigorosa agitazione magnetica per tutta la notte, al fine di consentire la diffusione e la evaporazione completa del solvente. La sospensione è stata poi trasferita in Eppendorf vial e centrifugata a 13,200 rpm per 30 minuti (Eppendorf centrifuge, model 5415 D). Le nanoparticelle così ottenute sono state lavate con acqua distillata e successivamente risospese in 1 ml di acqua e liofilizzate per 24 ore alla temperatura di -50 °C (Cinquepascal, Lio 5P model freeze-drier, Milan, Italy). Nanoparticelle di solo polimero PLGA sono state preparate come controllo seguendo la stessa procedura descritta precedentemente. La metodica utilizzata per i nanovettori carichi di 5-FU è stata quella della doppia emulsione ed evaporazione del solvente. 5 mg/ml di 5-FU dissolti in tampone fosfato (50 mM, pH 7.4) sono stati emulsionati in una soluzione di acetone allo 0.5% (w/v) di Lutrol[®] F68, contenente i coniugati polimerici (30 mg), mediante Ultra-turrax (13,000 rpm per 60 secondi). L'emulsione w/o così ottenuta è stata poi trasferita goccia a goccia ad una soluzione acquosa di 30 ml di Lutrol[®] F68 allo 0.1% e lasciata in agitazione magnetica per 3 ore a temperatura ambiente. La sospensione è stata poi trasferita in Eppendorf vial e centrifugata a 13,200 rpm per 30 minuti. Le NP ottenute sono state lavate con acqua distillata e risospese in 1 ml di acqua e liofilizzate per 24 ore a -50 °C. NP del polimero PLGA cariche di 5-FU (NP/5-FU) sono state preparate seguendo la procedura descritta con il solo polimero PLGA 502H. La stessa procedura è stata seguita per la formulazione di NP ottenute dal coniugato polimerico, caricate del farmaco antitumorale e del ligando **1** (TSPO-NP/5-FU/1). In particolare 30 mg di polimero e 5 mg del composto **1** sono stati dissolti in acetone ed utilizzati per preparare le desiderate NP. Le formulazioni ottenute sono state conservate alla temperatura di 4 °C fino al loro uso. La resa del processo è stata determinata sulla base della quantità di nanoparticelle liofilizzate rapportate alle quantità di materiali solidi utilizzati nel processo formulativo.

D) Caratterizzazione fisico-chimica delle formulazioni particellari

Il diametro medio e l'indice di polidispersione (PDI) delle NP sospese è stato misurato utilizzando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) dopo diluizione in acqua demineralizzata. Il potenziale zeta, esprime la carica superficiale delle

formulazioni, è stato determinato mediante la tecnica *laser Doppler velocimetry* utilizzando lo stesso strumento dopo opportuna diluizioni dei campioni con KCl 1 mM. L'esame morfologico delle NP è stato condotto con microscopia elettronica a trasmissione (TEM) (CM12 Philips, Eindhoven, Olanda). Le NP risospese in gocce d'acqua colorata con il 2% (w/v) di acido fosfotungstico sono state collocate su griglie di rame con film Formar per l'osservazione TEM. La spettroscopia fotoelettronica a raggi X (XPS, Theta Probe VG Scientific spectrometer) dotata di una sorgente microspot monocromatica è stata utilizzata per lo studio delle caratteristiche chimiche della superficie delle NP.

E) Determinazione della quantità di 5-FU e del composto 1 incorporato nelle NP

L'efficienza di incapsulazione (EE) delle NP, definita come percentuale di farmaco o composto **1** rispettivamente incapsulati, è stata determinata rispetto al quantitativo totale di 5-FU o del composto **1** utilizzati per la preparazione delle NP. Il loading del 5-FU e del composto **1** è stato determinato come la quantità di farmaco o composto **1** incapsulata relativa al peso delle NP liofilizzate cariche. La quantità di farmaco e ligando **1** caricati nelle NP polimeriche è stata determinata utilizzando un metodo diretto. Le NP cariche di 5-FU (2 mg) sono state dissolte in cloroformio (1 ml), poi il farmaco è stato estratto in tampone fosfato (1 mM, pH 7.4),⁵¹ ed è stato quantificato mediante metodo HPLC. Per la quantificazione del ligando TSPO **1** nelle NP caricate di 5-FU, NP sono state dissolte (2 mg) in cloroformio (1 ml), ed il polimero fatto precipitare in dietilere (2.5 ml). La fase organica è stata poi raccolta ed asciugata sotto vuoto. Il residuo dissolto in metanolo (1 ml), ed il ligando TSPO **1** quantificato mediante metodo HPLC.

F) Studi di rilascio in vitro

Il rilascio in vitro del farmaco dalle formulazioni è stato valutato a pH 7.4 in tampone fosfato 0.05 M alla temperatura di 37 °C. Le NP (1 mg/ml) sono state sospese in soluzione tampone e lasciate in agitazione in un bagno di acqua alla temperatura costante di 37 ± 0.2 °C. Periodicamente campioni (1 ml) sono stati prelevati e rimpiazzati da un eguale volume di tampone fosfato. Ciascun campione è stato poi centrifugato a 13,200 rpm per 10 minuti ed il supernatante è stato rimosso e filtrato mediante filtri in PTFE (0.2 µm, Advantec MFS, Pleasanton, CA, USA). 20 µl del filtrato sono stati direttamente analizzati mediante HPLC.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. La quantificazione del 5-FU e del ligando **1** è stata fatta mediante la misurazione dell'area del picco in relazione rispettivamente alla soluzione standard del farmaco e del ligando **1**, cromatografati nelle medesime condizioni. La quantità cumulativa del composto rilasciato nel tempo è stata espressa come percentuale iniziale di farmaco caricato nelle NP. Ogni dato è stato calcolato come la media \pm deviazione standard di tre differenti misurazioni.

2) Parte sperimentale biologica

A) Colture cellulari

Cellule C6 di glioma di ratto sono state coltivate in nutriente di Ham/F12 arricchito con supplemento al 10% di FBS, 2 mM L-glutammina, penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 μ g/ml). Le cellule sono state mantenute alla temperatura di 37 °C in una atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ ed alimentate ogni giorno. Le cellule sono state seminate in 96 pozzetti ad una densità di 5,000 cellule per pozzetto per i saggi di vitalità, mentre per la microscopia fluorescente le cellule sono state seminate in 6 pozzetti per piastra ad una densità di 100,000 cellule per pozzetto. Il giorno successivo, il terreno di coltura è stato sostituito con nuovo terreno e le cellule sono state incubate con le NP alle diverse concentrazioni sia del 5-FU che del ligando composto **1**. La percentuale di DMSO utilizzata per dissolvere i composti testati 5-FU ed **1**, è stata inferiore del 1% (v/v). E' stato verificato che questo quantitativo non ha nessuno effetto sulla vitalità cellulare.

B) Analisi della vitalità cellulare mediante MTT

Il numero delle cellule sopravvissute è stato valutato mediante calorimetria quantitativa del saggio di riduzione del sale tetrazolio (MTT). In particolare, 200 μ l di sospensione cellulare sono stati incubati in piastre da 96 pozzetti con una densità di semina cellulare di 5,000 cellule per pozzetto. Dopo 1 giorno di incubazione alla temperatura di 37 °C in un ambiente umidificato al 5% di CO₂, il terreno di coltura è stato sostituito con un uguale volume di terreno contenente differenti concentrazioni dei composti testati e solo terreno. Le cellule non trattate sono state usate come controllo positivo e le cellule incubate con una soluzione al 2% di SDS come controllo negativo. Dopo 24 ore di incubazione, 10

μl di una soluzione allo 0.5% (w/v) di MTT/PBS sono stati aggiunti in ciascun pozzetto e lasciati ad incubare per altre 4 ore. Dopo questo periodo, il terreno di coltura è stato rimosso e sono stati aggiunti 150 μl di una soluzione di DMSO/etanolo (1:1) per pozzetto. L'assorbanza dei singoli pozzetti è stata misurata mediante un lettore *microplate* (Wallac Victor³, 1420 Multilabel Counter, Perkin-Elmer). Ogni concentrazione del farmaco è stata testata in triplicato e gli esperimenti sono stati ripetuti per tre volte.

C) Microscopia per fluorescenza

Un ampio campo di cellule è stato analizzato attraverso un microscopio invertito Zeiss Axiovert 200 (Zeiss, Milano, Italy) equipaggiato con un obiettivo ad olio 63 x /1.4. In particolare, l'uptake di 0.2 μM T-NP coniugate con il probe FITC all'interno di cellule di gliome di ratto C6 è stato osservato dopo incubazione per 4, 8 e 24 ore alla temperatura di 37 °C in una atmosfera al 5% di CO₂. Le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione del probe fluorescente coniugato sono state selezionate con appropriati filtri montati in Lambda 10-2 (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) e le immagini di fluorescenza sono state catturate mediante una fotocamera CoolSNAP HQ CCD (Roper Scientific, Trenton, NJ) utilizzando il software (Universal Imaging Corporation). In ciascun esperimento, i tempi di acquisizione e l'esposizione alla luce sono state tenute allo stesso tempo al fine di comparare le intensità dei segnali emessi. La media dell'intensità emessa dalle cellule fluorescenti è stata misurata ogni 30 secondi per 5 minuti sottraendo il bianco. Durante questo periodo, le intensità di emissione della FITC sono state costanti in un intervallo di $\pm 5\%$. In ogni acquisizione 20-30 cellule sono state selezionate e le misure sono state ripetute 5 volte utilizzando cellule prelevate da colture indipendenti. Tutti i dati sono stati assunti come medie \pm S.E.M.

D) Analisi statistiche

Tutti i dati sono presentati come media \pm S.E.M. Le analisi statistiche realizzate utilizzando l'analisi ad una varianza (ANOVA) seguita dal Tukey post hoc test (GraphPad Prism versione 4 per Windows, GraphPad Software, San Diego, CA). le differenze sono state considerate statisticamente significative per un $p < 0.05$. Per il calcolo del valore di EC₅₀, è stato usato il programma SigmaPlot 9.0. I dati sono dati come medie \pm S.E.M. (barre di

errore) per 5 diverse colture. Il significato statistico delle differenze è stato calcolato mediante il *t* test spaiato di Student con correzione di Bonferroni. **P* < 0.05, ***P* < 0.005.

RISULTATI E DISCUSSIONI

A) Preparazione e caratterizzazione dei sistemi nanoparticellari

Nel presente lavoro sono stati impiegati nuovi polimeri ottenuti dalla bioconiugazione di due ligandi a struttura imidazopiridinica, selettivi ed affini per la proteina di translocazione TSPO, e del polimero biocompatibile e biodegradabile PLGA, a due differenti pesi molecolari.^{43, 44} Inoltre è stato ottenuto un coniugato fluorescente dalla reazione del gruppo terminale ossidrilico del bioconiugato polimerico con la fluoresceina isotiocianato (schemi 4, 5, 6). Partendo da questi coniugati polimerici, sono stati formulati sistemi nanoparticellari mediante il metodo della *quasi*-emulsione diffusione del solvente (QESD), mentre le nanoparticelle con gli stessi coniugati polimerici ma caricanti il 5-FU con o senza il ligando **1** sono state ottenute mediante il metodo della doppia emulsione e diffusione del solvente (DESD, w/o/w). Esse sono state caratterizzate per morfologia, mediante TEM (figura 15). Il loro diametro dimensionale, il potenziale zeta, l'indice di polidispersione (PDI), l'efficienza di incapsulazione (EE%), e le rese ottenute sono state riassunte nella Tabella 1. In particolare il diametro idrodinamico delle nanoparticelle è stato tra 81 e 195 nm e la carica superficiale è stata negativa con valori tra -22.7 e -38 mV. Le analisi TEM di alcune NP, scelte come riferimento per ogni classe hanno evidenziato che i sistemi appaiono monodispersi, ben separati, senza aggregati e con una forma sferica (figura 15). Inoltre le misurazioni dei diametri, effettuate sulle microfotografie TEM sono concordi con quelli misurati mediante Zetasizer. I sistemi nanoparticellari, dopo inclusione del farmaco mostrano, con una sola eccezione, un incremento del diametro medio, mentre la carica sostanzialmente resta negativa e dello stesso ordine o con valori più negativi. La carica negativa di superficie dipende dalla dissociazione dei gruppi carbossilici terminali residui del PLGA ed esposti sulla superficie. L'analisi chimica di superficie, effettuata sulla formulazione scelta come riferimento, preparata a partire dal bioconiugato polimerico **4a** mostra una evidente presenza chimica dell'atomo di azoto, derivante esclusivamente dal ligando ed una composizione chimica espressa come analisi elementare chimica percentuale caratteristica del coniugato, dimostrando che questo è presente principalmente sulla superficie.

Tabella 5. Caratterizzazione delle NP polimeriche.

NP	Coniugato polimerico	Diametro particellare (nm)	Potenziale zeta (mV)	PDI	EE%	Resa% (w/w)
NP (5-FU)	RG 502H	117.8±15.6	-37.8 ± 2.4	0.43 ± 0.03	59.1±2.0	76
TSPO-NP	3a	115.5 ± 10.1	-37.6 ±1.0	0.09 ± 0.02	-	85
TSPO-NP	3b	122.9 ± 1.6	-27.3 ± 3.2	0.07 ± 0.01	-	54
TSPO-NP	4	170.4 ± 2.6	-30.9 ± 2.8	0.07 ± 0.02	-	69
TSPO-NP	5a	195.0 ± 0.9	-29.2 ± 3.3	0.12 ± 0.01	-	80
TSPO-NP	5b	81.1 ± 0.9	-31.2 ± 2.7	0.15 ± 0.01	-	80
FITC-NP	10	84.8 ± 1.6	-22.7 ± 1.3	0.23 ± 0.03	-	52
TSPO-NP (5-FU)	3a	165.0 ± 2.0	-39.5 ± 2.7	0.13 ± 0.01	31.1 ± 12.0	62
TSPO-NP (5-FU)	3b	168.4 ± 6.1	-38.1 ± 2.4	0.08 ± 0.02	24.1 ± 0.9	60
TSPO-NP (5-FU)	4	168.6 ± 4.3	-33.4 ± 1.6	0.15 ± 0.41	9.1 ± 1.1	57
TSPO-NP (5-FU)	5a	130.3 ± 1.7	-51.9 ± 2.5	0.15 ± 0.02	15.8 ± 4.2	64
TSPO-NP (5-FU)	5b	175.1 ± 3.2	-37.5 ± 2.2	0.11 ± 0.01	16.4 ± 3.5	89
TSPO-NP (5-FU, 1)	3a	147.6 ± 7.0	-37.5 ± 2.2	0.25 ± 0.08	10.4±1.8 (5-FU); 43.5±10.2 (1)	49

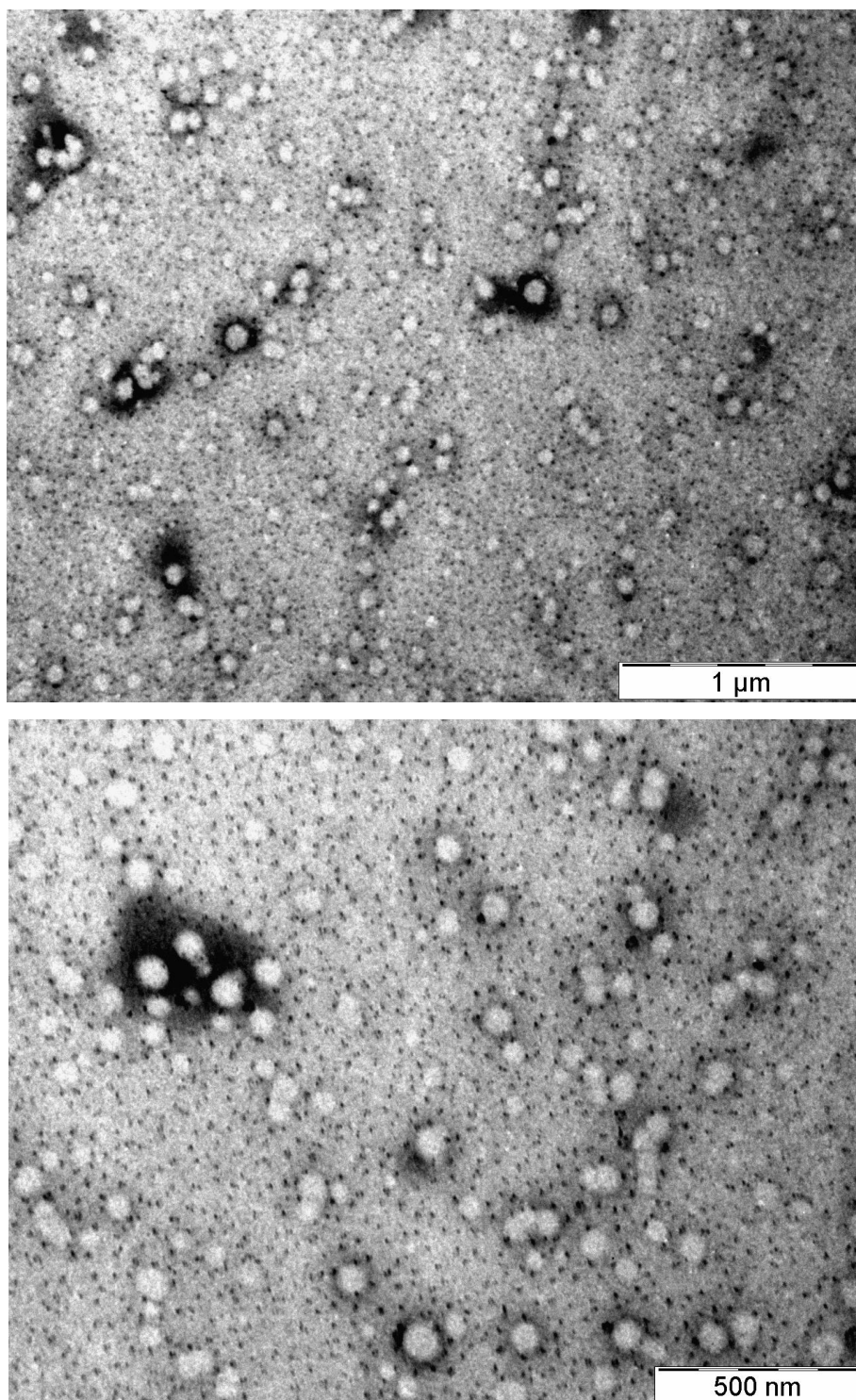
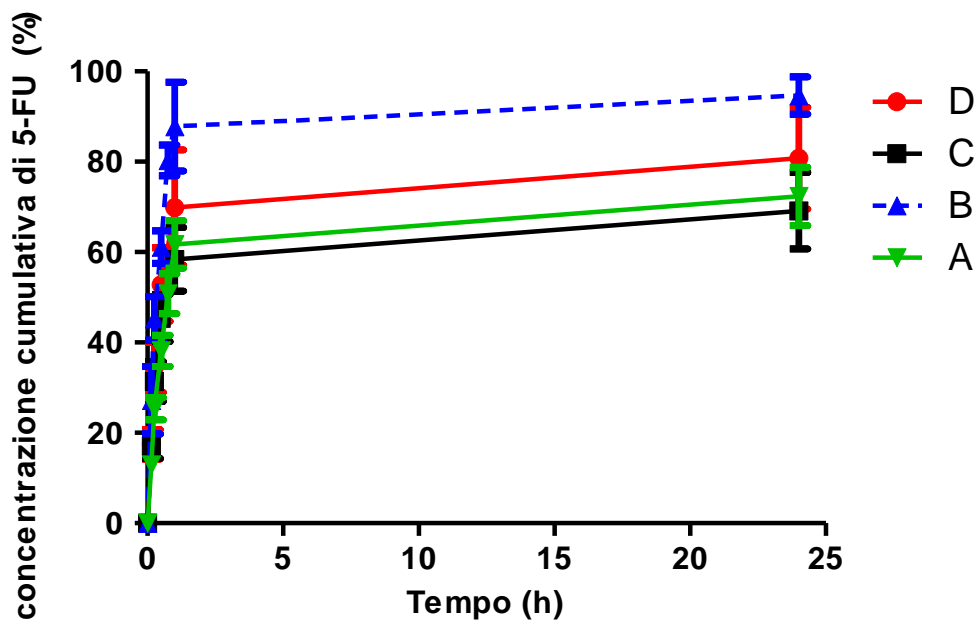


Figura 15. Microfotografie TEM delle formulazioni NP direzionate (sinistra) e NP direzionate e cariche (destra).

B) Rilascio in vitro del 5-FU dalle formulazioni particellari

Gli studi di rilascio del 5-FU dalle formulazioni particellari effettuate in tampone fosfato a pH 7.4 ed a 37°C su quattro formulazioni rappresentative sono state seguite per 24h ed hanno evidenziato dei profili di rilascio tipici, con un'iniziale *burst effect* nella prima ora, seguito da un rilascio più lento e prolungato fino a 24 h con una percentuale cumulativa di rilascio del 5-FU compresa tra 52% ed 80% della quantità di farmaco totale incorporata, nella prima ora e tra 69% e 95% dopo 24h (figura 16). Per quanto i profili appaiano simili è evidente un rilascio più massivo nelle NP che hanno incorporato il 5-FU e non direzionate, rispetto a quelle direzionate ed a quelle aventi contemporaneamente il ligando **1** insieme al 5-FU.



- A) NP incorporanti 5-FU e **1** non direzionate
- B) NP incorporanti 5-FU e **1** non direzionate
- C) NP incorporanti 5-FU e direzionate
- D) NP incorporanti 5-FU e non direzionate

Figura 16. Cinetiche di rilascio di 5-FU dalle NP in 24 ore.

C) Studi biologici di citotossicità e di uptake su linee cellulari C6 di glioma di ratto

La citotossicità delle NP direzionate non cariche e di quelle incorporanti il 5-FU sono state testate su linee cellulari C6 di glioma di ratto, che notoriamente sovraesprimono il TSPO. Tutte le formulazioni sono risultate citotossiche con un valore di IC50 dell'ordine del micro molare. In particolare è evidente che le NP direzionate risultano essere più citotossiche delle analoghe non direzionate, con un valore medio di IC50 pari a 0.9 μM rispetto a 27.2 μM dimostrando un effetto sinergico. Inoltre le NP direzionate che contemporaneamente incorporano il 5-FU ed il ligando **1** sono ugualmente citotossiche con un valore di citotossicità pari a 1.8 μM paragonabile alle precedenti. Inoltre se la citotossicità di quest'ultime viene espressa in funzione di IC50 relativa alla concentrazione di ligando **1** piuttosto che al 5-FU allora l'effetto sinergico è più chiaramente evidente.

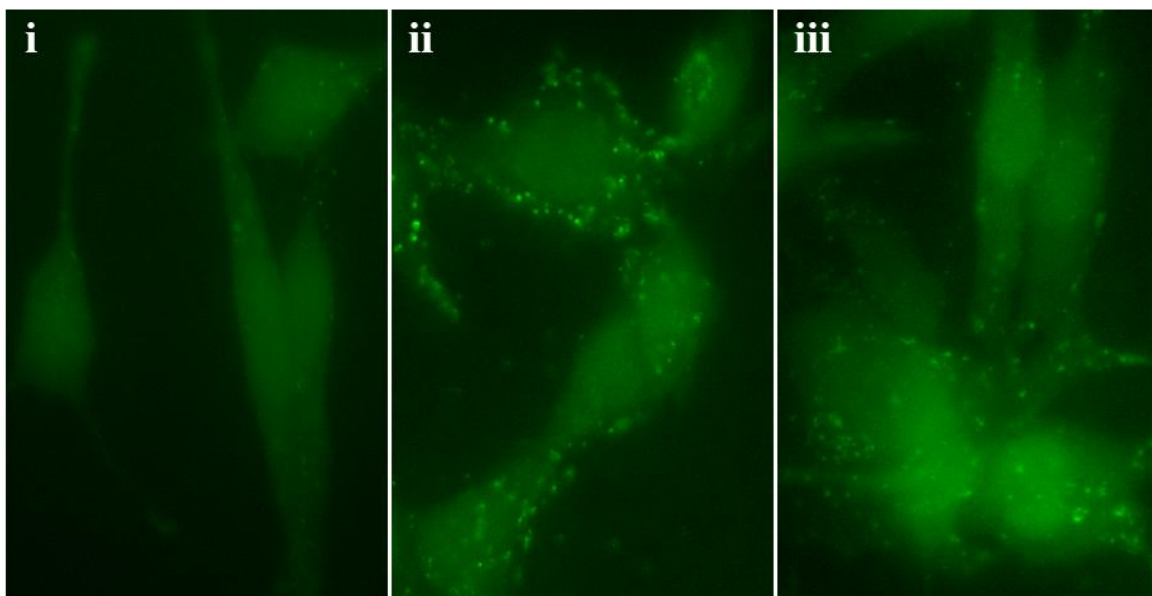


Figura 17. Studi di microscopia per fluorescenza su cellule di glioma C6 dopo 4h(i), 8h (ii) e 24h (iii) trattate con NP direzionate (FITC-NP)

Inoltre al fine di valutare il potenziale up-take cerebrale di questi sistemi nanoparticellari, sono state studiate le loro proprietà di trasporto attraverso linee cellulari di glioma di ratto C6 . Tali studi sono stati effettuati utilizzando NP direzionate preparate a partire da un polimero coniugato del PLGA con il ligando del TSPO **1** a cui contemporaneamente è stato legato il probe fluorescente FITC (FITC-NP) ed hanno

evidenziato un chiaro up-take cellulare. Infatti come mostrato in figura 17 le cellule trattate con 0.2 μM of FITC-NP, rivelano un aumento tempo-dipendente di internalizzazione della fluorescenza che appare largamente diffusa nel citosol. Al contrario nessuna fluorescenza si evidenzia nel citosol cellulare quando le stesse vengono trattate con la sola FITC ad una concentrazione di 7 μM , che non è in grado di superare le barriere biologiche. Pertanto si può concludere che la fluorescenza misurata è dovuta esclusivamente all'internalizzazione delle NP direzionate aventi il probe fluorescente coniugato.

CONCLUSIONI

Sono state preparate con successo NP utilizzando coniugati polimerici di PLGA e due ligandi selettivi per il TSPO, al fine di ottenere vettori particellari direzionati, incorporanti il farmaco antitumorale 5-FU, utili per il potenziale trattamento mirato dei tumori cerebrali. I sistemi nanoparticellari preparati e caratterizzati per diametro, potenziale zeta, PDI, EE%, e morfologia sono state di forma sferica che presentavano in superficie il ligando TSPO in grado di rilasciare il 5-FU in modo esaustivo. Inoltre la loro citotossicità è stata nell'ordine del micromolare. Gli studi di up-take cellulare hanno evidenziato la capacità delle NP fluorescenti di essere internalizzate nelle cellule di glioma. Pertanto appaiono essere sistemi di rilascio nanoparticellari promettenti ed idonei per poter essere ulteriormente valutati in futuri studi di approfondimento in vivo.

Parte III

Aspetti generali relativi all'epilessia e suo trattamento nelle donne in gravidanza

L'epilessia è un disordine del cervello caratterizzato da ricorrenti e non prevedibili interruzioni delle normali funzioni cerebrali, chiamate convulsioni epilettiche, e dalle conseguenze neurobiologiche, cognitive, psicologiche e sociali proprie di questa condizione.⁵¹ Nella donna affetta da epilessia, la gravidanza pone diversi problemi concernenti principalmente gli effetti dell'epilessia e delle crisi epilettiche, sulla madre e sul feto, e l'incremento del rischio di malformazioni congenite di questo ultimo, connesso all'uso di farmaci antiepilettici. L'interazione tra epilessia, gravidanza e terapie antiepilettiche utilizzate è oggetto di molti studi. I dati della letteratura scientifica indicano che i farmaci antiepilettici di prima e seconda generazione sono potenzialmente teratogeni, mentre sono del tutto sconosciuti i potenziali fattori di rischio teratogeno per i nuovi farmaci antiepilettici (levetiracetam, lamotrigina, gabapentin, topiramato, tiagabina, vigabatrin, oxcarbazepina), dovuti alla relativa esiguità delle casistiche studiate.^{52, 53} Come noto, farmaci caratterizzati da una determinata lipofilità, sono in grado di attraversare oltre alla barriera emato-encefalica per diffusione passiva, anche altre membrane biologiche in vivo, come la barriera placentare (figura 18). Quest'ultima separa il sangue materno da quello fetale e la sua funzione è pertanto la stessa della barriera emato-encefalica, cioè quella di limitare la distribuzione delle molecole. Il sangue materno ed il sangue fetale, non vengono mai a contatto diretto e sono divisi dall'epitelio dei villi coriali. Le sostanze che attraversano dal sangue materno a quello fetale o viceversa, devono attraversare due membrane che sono l'endotelio dei capillari dei villi coriali e l'epitelio dei villi coriali. Proprio per questo motivo la placenta viene chiamata barriera, perché tutte e due queste membrane seguono le stesse regole di passaggio dei farmaci attraverso le membrane biologiche (diffusione passiva, passaggio attraverso i pori, passaggio attivo con carriers e passaggio attraverso pinocitosi). Le sostanze che possono attraversare la placenta presentano precise caratteristiche come:⁵⁴

- Liposolubilità;
- Basso grado di ionizzazione;
- Basso legame con le proteine;
- Peso molecolare (< 600 Da per un passaggio agevole).

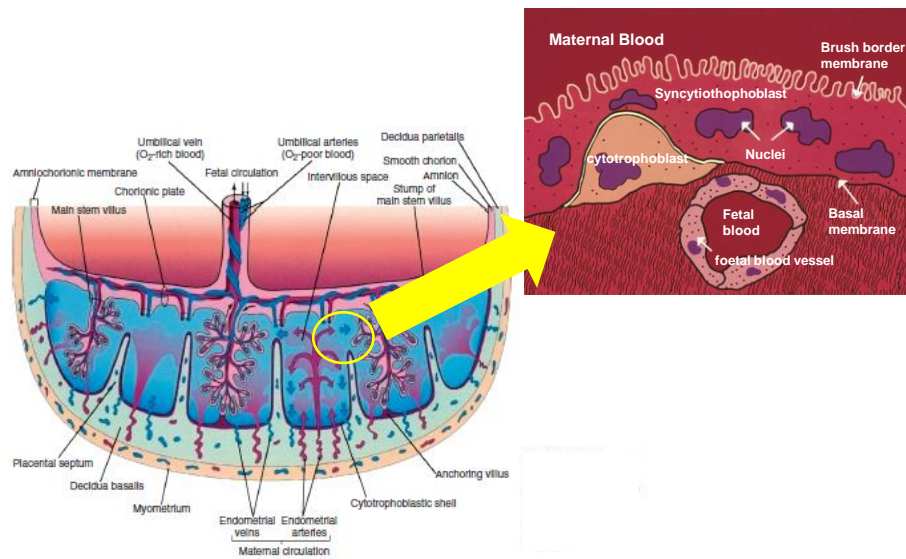


Figura 18. Rappresentazione schematica della barriera placentare.

La somministrazione di farmaci durante lo stato di gravidanza deve essere attentamente valutata poiché alcuni farmaci possono agire sul feto senza provocare alcun danno alla madre, come per esempio il fenobarbital, i glucocorticoidi ed infine gli antibiotici, mentre altri farmaci (ad uso occasionale come gli analgesici e gli antiemetici) hanno effetto terapeutico sulla madre ma risultano pericolosi per il feto. Oltre ai farmaci ad uso occasionale particolare attenzione è rivolta anche ai farmaci per le terapie croniche, quali antidiabetici, anticoagulanti, antiepilettici, come l'oxcarbazepina,⁵⁵ ed i digitalici.

E' in questo ambito che si colloca la terza ed ultima parte di tesi di dottorato, svolta nei laboratori di ricerca di ostetricia e ginecologia della *University of Texas Medical Branch*, sotto la supervisione del professor Erik Rytting, ovvero nel campo del *delivery* al SNC di un noto farmaco antiepilettico, quale è l'oxcarbazepina, somministrato nelle donne in gravidanza, mediante la realizzazione di nanocarrier polimerici in grado di superare potenzialmente la sola barriera ematoencefalica. In particolare sono state formulate e caratterizzate NP del copolimero PLGA con peso molecolare (Mw) di 12 kDa, caratterizzato anch'esso da un gruppo carbossilico ed uno alcolico primario terminali, in presenza ed assenza di un surfattante (Tocoferil Polietilene Glicol Succinato 1000), e del copolimero a blocchi PLGA-PEG (acido polilattico-*co*-glicolico -polietilenglicole, con peso molecolare Mw = 100 kDa), caricate con il suddetto farmaco.

La dimensione particellare, carica superficiale, efficienza di incapsulazione, studi preliminari di rilascio in tampone fosfato e la permeabilità *in vitro* della barriera ematoencefalica e placentare delle suddette formulazioni sono state valutate e discusse in seguito.

Parte sperimentale tecnologica-formulativa

A) Materiali

Il copolimero PLGA è caratterizzato da un rapporto molare di acido lattico/glicolico di 50/50, $M_w = 12,000$ Da, gruppo carbossilico ed alcoolico primario terminale, il copolimero *diblock* RGP d5055 è caratterizzato da un rapporto molare di acido lattico/glicolico di 50/50, $M_w = 100,000$ Da, e da una percentuale del 5% in peso (5,000 Da) di polietilglicole-monometossietere (PEG-monometossietere). Essi sono stati acquistati dalla Boehringer-Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germania). Un campione di Tocoferil Polietilene Glicol Succinato 1000 (TPGS) è stato comprato dalla Sigma-Aldric (USA). L'oxcarbazepina (Oxc) è stata acquistata dalla TCI-america, Inc (USA). Tutti gli altri prodotti chimici sono stati di grado analitico.

B) Apparecchiatura

Le analisi HPLC sono state condotte con una pompa binaria HPLC modello 1525 della Waters corporation (Milford, MA, USA), campionatore automatico Waters 2707, una colonna ONYX monolitica C18 (4.6 x 100 mm), un detector fotodiodi (PDI) Waters 2998 (Waters Empower Software per analizzare i dati cromatografici), e come eluente una soluzione di acqua/acetonitrile 64:36 (v/v) con flusso di 0.7 ml/min. Durante tutta l'analisi l'effluente è stato monitorato continuamente ad una lunghezza d'onda di 255 nm per analizzare l'Oxc. Le nanoparticelle sono state caratterizzate mediante analisi calorimetrica differenziale (DSC Q200, TA instrument, USA) e diffrazione a raggi X.

C) Preparazione di sistemi nanoparticellari secondo la metodica *solvent displacement*

Le nanoparticelle polimeriche incorporanti Oxc sono state preparate utilizzando la tecnica del *solvent displacement*.⁵⁶ Una soluzione dei polimeri e del farmaco (5% del peso di Oxc riferito al peso totale di polimero e farmaco) sono stati dissolti in acetone (20 mg/ml PLGA, 20 mg/ml RGP d5055 e 15 mg/ml PLGA) alla temperatura ambiente e questa fase organica è stata successivamente iniettata con l'utilizzo di una pompa peristaltica magnetica ad un flusso costante di 6 ml/min in 5 ml di acqua (soluzione acquosa allo 0.03% (w/v) di TPGS per il solo polimero PLGA con concentrazione 20 mg/ml in acetone). La risultante miscela è stata lasciata in costante agitazione magnetica a 850 rpm per circa 5 ore, al fine di consentire la diffusione e la evaporazione completa del solvente. La sospensione è stata poi trasferita in Eppendorf vial e centrifugata a 13,000 rpm per 10 minuti (Eppendorf centrifuge, model 5430). Le nanoparticelle così ottenute sono state lavate con acqua distillata e successivamente risospese in 1 ml di acqua e liofilizzate per 24 ore alla temperatura di -50 °C e 0.06 mbar (Labconco model 7670530, USA). Le nanoparticelle di solo polimero sono state preparate come controllo seguendo la stessa procedura descritta precedentemente. Le formulazioni ottenute sono state conservate alla temperatura di 4 °C fino al loro uso.

D) Caratterizzazione fisico-chimica delle formulazioni particellari

Il diametro medio e l'indice di polidispersione (PDI) delle NP sospese è stato misurato utilizzando un misuratore di diametro particellare HPP 5001 ad alta performance (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) dopo diluizione al 10% in acqua demineralizzata. Il potenziale zeta, esprime la carica superficiale delle formulazioni, è stato determinato mediante laser Doppler velocimetry utilizzando uno strumento DTS 5201 zetasizer 200 (Malvern Instrument, UK) dopo opportune diluizioni dei campioni con acqua demineralizzata. I dati ottenuti sono stati riportati come media di tre differenti misurazioni.

E) Determinazione della efficienza di incapsulazione (EE%) di Oxc nelle NP

La quantità relativa di farmaco incapsulato nelle NP è stata determinata con un metodo indiretto, attraverso la misurazione della concentrazione di oxcarbazepina non incorporata, presente nella fase acquosa della sospensione nano particellare e quindi per differenza della quantità utilizzata inizialmente. Una aliquota di sospensione di NP è stata trasferita in un filtro vivaspin (cutoff 100,000 Da) e centrifugata a 3,000 rpm per 15 minuti a 25°C (IEC clinical centrifuge). Dopo separazione del *pellet* di NP, la quantità di farmaco libero presente nella fase acquosa è stata stimata attraverso metodica HPLC, in relazione ad una curva di calibrazione. L'efficienza di incapsulazione è stata successivamente calcolata dalla seguente equazione:

$$EE(\%) = [(\text{quantità totale farmaco} - \text{quantità farmaco libero in acqua}) / \text{quantità totale farmaco}] \times 100$$

F) Studi di rilascio *in vitro*

Il rilascio *in vitro* del farmaco dalle formulazioni è stato valutato a pH 7.4 in tampone fosfato isotonic (NaCl 0.8 g, KCl 0.02 g, Na₂HPO₄·7H₂O 0.3 g, KH₂PO₄ 0.02 g, in acqua distillata in un volume di 100 ml) alla temperatura di 37 °C. Le formulazioni di NP liofilizzate (1 mg/ml) sono state sospese in soluzione tampone e lasciate in agitazione in un bagno di acqua alla temperatura costante di 37 ± 0.2 °C. Periodicamente campioni (1 ml) sono stati prelevati e rimpiazzati da un eguale volume di tampone fosfato. Ciascun campione è stato poi centrifugato a 3,000 rpm per 15 minuti in filtro vivaspin (cutoff 100,000 Da). Il supernatante è stato rimosso e 10 µl del filtrato sono stati direttamente analizzati mediante HPLC. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. La quantificazione del farmaco è stata fatta mediante la misurazione dell'area del picco in relazione rispettivamente alla soluzione standard del farmaco, cromatografato nella medesima condizione. La quantità cumulativa del composto rilasciato nel tempo è stata espressa come percentuale iniziale di farmaco caricato nelle NP. Ogni dato è stato calcolato come la media ± deviazione standard di tre differenti misurazioni.

2) Parte sperimentale biologica

A) Colture cellulare e trasporto placentare su monostrati cellulari BeWo

Il trasporto *in vitro* attraverso la barriera placentare delle nanoparticelle cariche di Oxc è stato effettuato utilizzando un monostrato di cellule BeWo (clone b30).⁵⁷ Il numero del passaggio utilizzato è stato il 24°. La confluenza delle cellule è stata monitorata con microscopia ottica. Dopo circa 7 giorni dalla semina delle colture primarie, le cellule risultavano confluenti, quindi è stata aggiunta tripsina 0.05% ed EDTA. Dopo un periodo di incubazione di circa 3 minuti ad una temperatura di 37 °C, la sospensione di cellule così ottenuta è stata centrifugata a 1,500 rpm per 5 minuti. Eliminato il sovrnatante il *pellet* è stato sospeso nel Medium fisiologico e quindi ripartito in pozzetti di coltura cellulare o su membrane semipermeabili di celle di diffusione, con un densità di 100,000 cellule/cm² all'interno di inserti *transwell* in polistirene (dimensione dei pori 3 µm, 1.12 cm² area di crescita, volume apicale 0.5 ml, volume basolaterale 1.5 ml). La funzionalità della barriera cellulare è stata verificata prima di eseguire gli esperimenti di trasporto, mediante la misurazione della resistenza transepiteliale elettrica (TEER) utilizzando un apparecchio EndOhm. Il TEER è stato misurato nel terreno di coltura ed alla temperatura ambiente. Esso è stato calcolato come differenza della resistenza misurata e della resistenza di un *transwell* con solo Medium (bianco senza cellule). Allo scopo di valutare la permeazione *in vitro* delle NP sono stati utilizzati monostrati cellulari con un valore di TEER tra 64-80 Ohm/cm². Successivamente alla misurazione, le cellule sono state equilibrate con mezzo di trasporto, sia nel compartimento basolaterale, che in quello apicale per 30 minuti alla temperatura di 37 °C. Al tempo zero le sospensioni nanoparticellari cariche di Oxc, opportunamente diluite con mezzo di trasporto, sono state aggiunte nel compartimento apicale. Gli esperimenti di trasporto sono stati condotti in condizioni costanti di coltura (37 °C, 5% CO₂, 95% umidità) e con agitazione costante (70 rpm). Ad intervalli di tempo sono stati prelevati 100 µl di campioni dal compartimento basolaterale e rimpiazzati con eguale volume di fresco mezzo di trasporto. Al tempo finale, un campione di 100 µl è stato prelevato anche dal compartimento apicale. Ai campioni prelevati sono stati aggiunti 100 µl di metanolo e centrifugati a 17,000 rpm per 10 minuti. 10 µl di sovrnatante sono stati iniettati in HPLC e la quantità di farmaco determinata mediante la quantificazione dell'area del picco in relazione alla soluzione standard del farmaco cromatografato nella medesima condizione. Le cellule sono state lavate

con HBBS freddo per tre volte, e l'inserto del *transwell* è stato rimosso e le cellule lisate con una soluzione di lisina per tutta la notte (0.5% triton X-100 in 0.2 N NaOH). Il trasporto delle nanoparticelle cariche di Oxc è stato valutato alla concentrazione di 50 µg/ml di farmaco nelle nanoparticelle. Infine è stato effettuato l'esperimento anche per il solo farmaco. L'esperimento di trasporto è stato effettuato in triplicato. I dati sono stati riportati come medie \pm S.E.M.

B) Colture cellulare e trasporto su monostrati cellulari hCMEC/D3

Il trasporto *in vitro* attraverso la barriera ematoencefalica delle nanoparticelle cariche di Oxc è stato effettuato utilizzando un monostrato di cellule umane immortalizzate dell'endotelio capillare cerebrale hCMEC/D3.^{58, 59} Il numero del passaggio utilizzato nel presente studio è stato il 27°. La confluenza delle cellule è stata monitorata con microscopia ottica. Dopo circa 5 giorni dalla semina delle colture primarie, le cellule risultavano confluenti, quindi è stata aggiunta tripsina 0.05% ed EDTA. Dopo un periodo di incubazione di circa 3 minuti ad una temperatura di 37 °C, la sospensione di cellule così ottenuta è stata centrifugata a 1,500 rpm per 5 minuti. Eliminato il sovrnatante il *pellet* è stato sospeso nel Medium fisiologico e quindi ripartito in pozzetti di coltura cellulare o su membrane semipermeabili di celle di diffusione, con un densità di 50,000 cellule/cm² (*transwell* in polistirene), con dimensione dei pori 3 µm, 1.12 cm² area di crescita, volume apicale 0.5 ml, volume basolaterale 1.5 ml. La funzionalità della barriera cellulare è stata verificata prima di eseguire gli esperimenti di trasporto, mediante la misurazione della resistenza transepiteliale elettrica (TEER) utilizzando un apparecchio EndOhm. Il TEER è stato misurato nel terreno di coltura ed alla temperatura ambiente. Esso è stato calcolato come differenza della resistenza misurata e della resistenza di un *transwell* con solo collagene di ratto (bianco senza cellule). A tale scopo sono stati utilizzati monostrati cellulari con un valore di TEER prossimo a 40 Ohm/cm², valore raggiunto dopo circa una settimana dalla semina. Successivamente alla misurazione, le cellule sono state equilibrate con mezzo di trasporto, sia nel compartimento basolaterale, che in quello apicale per 30 minuti alla temperatura di 37 °C. Al tempo zero le sospensioni nanoparticellari cariche di Oxc, opportunamente diluite con mezzo di trasporto, sono state aggiunte nel compartimento apicale. Gli esperimenti di trasporto sono stati condotti in condizioni costanti di coltura (37 °C, 5% CO₂, 95% umidità) e con agitazione costante (70 rpm). A intervalli di tempo sono stati prelevati 100 µl di campioni dal compartimento basolaterale e rimpiazzati con eguale volume di fresco mezzo di trasporto. Al tempo finale, un

campione di 100 μ l è stato prelevato anche dal compartimento apicale. Ai campioni prelevati sono stati aggiunti 100 μ l di metanolo e centrifugati a 17,000 rpm per 10 minuti. 10 μ l di sovrantante sono stati iniettati in HPLC e la quantità di farmaco determinata mediante la quantificazione dell'area del picco in relazione alla soluzione standard del farmaco cromatografato nella medesima condizione. Al termine dell'esperimento le cellule sono state lavate con HBBS freddo per tre volte, e l'inserito del *transwell* è stato rimosso e le cellule lisate con una soluzione di lisina per tutta la notte (0.5% triton X-100 in 0.2 N NaOH). Il trasporto delle nanoparticelle cariche di Oxc è stato valutato alla concentrazione di 50 μ g/ml di farmaco nelle nanoparticelle. Infine è stato effettuato l'esperimento anche per il solo farmaco. L'esperimento di trasporto è stato effettuato in triplicato. I dati sono stati riportati come medie \pm S.E.M.

RISULTATI E DISCUSSIONI

A) Preparazione e caratterizzazione dei sistemi nanoparticellari

NP dei polimeri PLGA e RGP d5055, incorporanti e non il farmaco, sono state formulate mediante il metodo *solvent displacement*. Esse sono state caratterizzate per diametro dimensionale, potenziale zeta, indice di polidispersione (PDI), efficienza di incapsulazione (EE%) (tabella 6). In particolare il diametro particellare caratteristico delle formulazioni con Oxc è compreso tra 148 e 169 nm e la carica superficiale è negativa con valori compresi tra -37.5 e -50 mV.

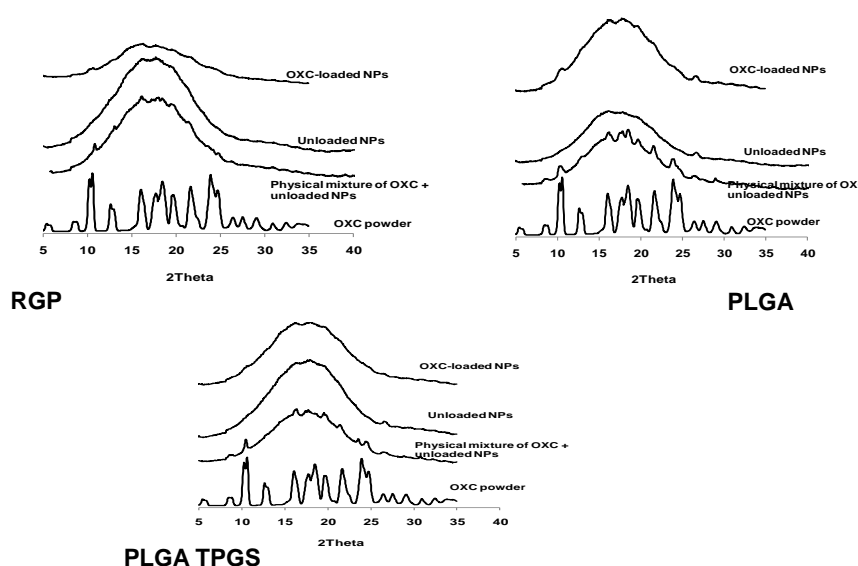
Per confronto sono state analizzate le formulazioni di solo polimero PLGA e RGP d5055. Dall'analisi è stato evidenziato un diametro compreso tra 148 e 165 nm ed un potenziale zeta tra -37 e -51 mV.

Tabella 6. Caratteristiche delle NP e relative efficienze di incapsulazione.

NP polimero	Diametro (nm) ± S.D.	Potenziale zeta (mV) ± S.D.	EE% ± S.D.	PDI ± S.D.
PLGA 50/50 (Oxc)	148.3 ± 1.7	-50.0 ± 0.2	72.1 ± 1.3	0.03 ± 0.01
RGP d5055 (Oxc)	169.2 ± 1.5	-37.5 ± 0.5	89.9 ± 0.3	0.05 ± 0.03
PLGA 50/50 (Oxc) TPGS	160.2 ± 1.2	-46.3 ± 0.3	82.5 ± 0.7	0.16 ± 0.02
PLGA 50/50	148.4 ± 0.8	-43.1 ± 0.3	-	0.02 ± 0.01
RGP d5055	165.5 ± 1.3	-37.3 ± 115	-	0.07 ± 0.03
PLGA 50/50 TPGS	160.7 ± 2.9	-51.3 ± 1.7	-	0.21 ± 0.03

Al fine di valutare se il farmaco è stato incapsulato nelle nanoparticelle preparate, sono state effettuate analisi DSC e di diffrazione a raggi X delle formulazioni di RGP d5055, PLGA, PLGA con surfattante, comparate rispettivamente con formulazioni di solo copolimero, una miscela fisica di nanoparticelle di solo copolimero con il farmaco, ed oxcarbazepina. La DSC ha evidenziato l'assenza del caratteristico picco di fusione del farmaco. L'analisi di diffrazione a raggi X (figura 19) ha invece evidenziato, dal confronto tra le NP di solo polimero, la miscela fisica farmaco-NP vuote e le formulazioni "piene" la presenza di alcuni picchi caratteristici assegnabili al farmaco, come evidenziato dal suo spettro sui cristalli, evidenti sia nella miscela fisica che nelle formulazioni cariche.

Figura 19. Analisi di diffrazione con raggi X delle formulazioni di RGP d5055, PLGA, PLGA con surfattante, comparate rispettivamente con formulazioni di solo copolimero, una miscela fisica di nanoparticelle di solo copolimero con il farmaco, ed oxcabazepina.



B) Rilascio in vitro del farmaco dalle formulazioni particellari

Gli studi di rilascio della Oxc dalle formulazioni particellari effettuati in tampone fosfato alla temperatura di 37 °C hanno evidenziato un iniziale *burst effect* nei primi minuti ed un rilascio controllato nelle successive 24 ore. La quantità di farmaco rilasciata in 24 ore dalle formulazioni di RGP d5055, PLGA ed il surfattante TPGS, PLGA è stata del 50%, 40% e del 45% rispettivamente.

C) Valutazione *in vitro* dell'attraversamento della barriera ematoencefalica e della barriera placentare da parte delle formulazioni particellari e dell'oxcarbazepina

Al fine di valutare la permeazione della BEE e della barriera placentare da parte delle formulazioni e dell'oxcarbazepina, è stato condotto uno studio *in vitro* utilizzando rispettivamente monostrati di cellule hCMEM/D3 e BeWo fatte crescere e differenziate su

piastre di diffusione. Dai dati sperimentali riportati in tabella 7 si evince che le formulazioni sono state caratterizzate da valori di permeabilità apparenti dello stesso ordine di quello dell'oxcarbazepina e che dunque esse potrebbero permeare le membrane biologiche.

Tabella 7. Valori delle permeabilità apparenti delle tre formulazioni e dell'oxcarbazepina determinati mediante studi di trasporto in vitro su monostrati di cellule BeWo e hCMEM/D3.

Formulazione polimero e farmaco	Permeabilità apparente ± D.S. (cm/sec) BeWo	Permeabilità apparente ± D.S. (cm/sec) hCMEM/D3
PLGA	$11,9 \times 10^{-5} \pm 1,12 \times 10^{-5}$	$10,5 \times 10^{-5} \pm 1,2 \times 10^{-5}$
PLGA TPGS	$3,68 \times 10^{-5} \pm 1,98 \times 10^{-5}$	$7,55 \times 10^{-5} \pm 2,40 \times 10^{-5}$
RGP d5055	$5,79 \times 10^{-5} \pm 1,76 \times 10^{-5}$	$9,13 \times 10^{-5} \pm 4,21 \times 10^{-5}$
Oxcarbazepina	$5,19 \times 10^{-5} \pm 1,00 \times 10^{-5}$	$8,53 \times 10^{-5} \pm 1,83 \times 10^{-5}$

Gli esperimenti sono stati condotti in un periodo di tempo di 4 ore ed a determinati intervalli di tempo, aliquote di 100 µl sono state rimosse dal mezzo ricevente e rimpiazzate con eguale volume di terreno di trasporto, al fine di mantenere le *sink conditions*. I campioni prelevati sono stati analizzati mediante HPLC. Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato.

CONCLUSIONI

Sono state formulati nuovi sistemi nanoparticellari di due copolimeri biocompatibili e biodegradabili, al potenziale fine di veicolare un farmaco antiepilettico al SNC. I sistemi sono stati caratterizzati e parzialmente valutati ma i risultati ottenuti, seppur parziali, sono incoraggianti e richiedono ulteriori studi di approfondimento biologici.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI:

1. Casellas P.; Galiegue S.; Basile A. S. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem. Int.*, (2002), 40, 475-486.
2. Sutter A.P., Maaser K., Barthel B., and Scherübl H. Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in oesophageal cancer cells: involvement of the p38mapk signalling pathway. *Br. J. Cancer*, (2003), 89, 564-572.
3. Serra M. et al.; 2-Phenyl-imidazo[1,2- α]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats. *Br. J. Pharmacol.* (1999), 127, 177-187.
4. Trapani G.; Franco M.; Ricciardi L.; Latrofa A.; Genchi G.; Sanna E.; Tuveri F.; Cagetti E.; Biggio G.; Liso G.; Synthesis and binding affinity of 2-phenyl-imidazo[1,2- α]pyridine derivatives for both central and peripheral receptors: a new series of high affinity and selective ligands for peripheral type. *J. Med. Chem.* (1997), 40, 3109-3118.
5. Susan L., Glynn and Mehran Yazdanian. In Vitro Blood-Brain Barrier Permeability of Nevirapine Compared to Other HIV Antiretroviral Agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (1998), 87, 3, 306-310.
6. C. Cordon-Cardo, J.P. O'Brien, D. Casals, L. Rittman-Grauer, J.L. Biedler, M.R. Melamed, J.R. Bertino. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989), 86, 695-698.
7. C. Cordon-Cardo, J.P. O'Brien, J. Boccia, D. Calsals, J.R. Bertino, M.R. Melamed. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem.* (1990), 38, 1277-1287.
8. H. Huai-Yun, D.T. Secrest, K.S. Mark, D. Carney, C. Brandquist, W.F. Elmquist, D.W. Miller. Expression of multidrug resistnce-associated protein (MRP) in brain microvessel endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1998), 243, 816-820.
9. Begley D. J., Bradbury M.W., Kreuter J. (Eds.). In "The Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS". Marcel Dekker, New York, (2000).

10. Bodor, M., Buchwald, P., Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (1999), 36, 229-254.
11. Daniele A., Albanese A. et al. Zolpidem in Parkinson's disease. *The Lancet.* (1997), 349, 1222-1223.
12. Van der Waterbeemd, H., Camenish, G., Folkers, G., Chretien, J. R., and Raevsky, O. A; Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and sharp, and H-bonding descriptors. *J. Drug Targeting* (1998), 6, 151-165.
13. Clark, D. E; Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J. Pharm. Sci.* (1999), 88, 815-821.
14. Bellina Veronesi. Characterization of the MDCK cell line for screening neurotoxicants. *NeuroToxicology* (1996), 17, 433-444.
15. Thomas F.W. Horn and Mario Engelmann. In Vivo Microdialysis for Nanopeptides in Rat Brain – A practical guide. *Methods*, (2001), 23, 41-53.
16. David J.Weiss, Craig E. Lunte, Susan M. Lunte. In vivo microdialysis as a tool for monitoring pharmacokinetics. *Trends in analytical chemistry*, (2000), 19, 606-616.
17. Braestrup, C. *et al.*; High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature* (1977), 269, 702-704.
18. V. Papadopoulos, M. Baraldi, T. R. Guilarte, T. B. Knudsen, J. J. Lacapère, P. Lindemann, M. D. Norenberg, D. Nutt, A. Weizman, M. R. Zhang, M. Gavish; Translocator protein (18 kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function, *Trends Pharmacol. Sci.* (2006), 27 402-409.
19. Maaser, K.; Grabowski, P.; Surter, A.P.; Hopfner, M.; Foss, H.D.; Stein, H.; Berger, G.; Gavish, M.; Zeitz, M.; Scherübl, A.P.; (2002) Overexpression of the Peripheral Benzodiazepine Receptor is a Relevant Prognostic Factor in Stage III Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* (2002), 8, 3205-3209.
20. M. Gavish, I. Bachman, R. Shoukrun, Y. Katz, L. Veenman, G. Weisinger, A. Weizman; Enigma of peripheral benzodiazepine receptor, *Pharmacol. Rev.* (1999), 51 629-650.
21. McEnery, M.W. *et al.*; Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1992), 89, 3170-3174.

22. Garnier, M. *et al.*; *In vitro* reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. *Mol. Pharmacol.* (1994), *45*, 201-211.
23. Galiegue, S. *et al.*; Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Biol. Chem.* (1999), *274*, 2938-2952.
24. Li, H. *et al.*; Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7 : a peripheral-type benzodiazepine receptor and PKA (RI α)-associated protein. *Mol. Endocrinol.* (2001), *15*, 2211-2228.
25. Tsujimoto, Y.; Shimizu, S.; VDAC regulation by the BCL-2 family of proteins. *Cell Death Differ* (2000), *7*, 1174-1181.
26. Dolder, M; Wendt, S.; Wallimann, T.; Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol. Signals Recept* (2001), *10*; 93-111.
27. Decaudin, D.; Peripheral benzodiazepine receptor and its clinical targeting. *Anticancer Drugs* (2004), *15*, 737-745.
28. Papadopoulos, V.,Guarnieri, P., Krueger, K. E., Guidotti, A., and Costa, E.; Pregnenolone biosynthesis in C6 glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997), *89*, 5113-5117.
29. Lacapere, J.J. and Papadopoulos, V.; Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids* (2003), *68*, 569-585.
30. Hardwick, M., Fertikh, D., Culty, M., Li, H., Vidic, B., and Papadopoulos, V.; Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: Correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res.*, (1999), *59*, 831-842.
31. Veenman, L., and Gavish, M.; Peripheral-type benzodiazepine receptors: their implication in brain disease. *Drug Development Research*, (2000), *50*, 355-370.
32. Venturini, I.; Zaneroli, M. L.; Corsi, L.; Avallona, R.; Farina, F.; Alho, H.; Baraldi, C.; Ferrarese, C.; Pecora, N.; Frigo, M.; Ardizzone, G.; Arrigo, A.; Pellicci, R.; and

- Baraldi, M.; Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. *Life Sci.*, (1998), 63, 1269-1280.
33. Katz, Y., Eitan, A., and Gavish, M.; Increased density of peripheral benzodiazepine binding sites in ovarian carcinomas as compared with benign ovarian tumors and normal ovaries. *Clin. Sci.*, (1990), 78, 155-158.
34. Han, Z. *et al.*; Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, (2003), 23, 225-238.
35. Galiegue, S. *et al.*; Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival. *Clin. Cancer Res.*, (2004), 10, 2058-2064.
36. Pedigo, N. W. *et al.*; Benzodiazepine receptor binding in young, mature and senescent rat brain and Kidney. *Neurobiol. Aging*, (1981), 2, 83-88.
37. Le Fur, G.; Perrier, M. L.; Vaucher, N.; Imbault, F.; Flamier, A.; Uzan, A.; Renault, C.; Dubroeuq, M.C.; and Gueremy, C.; Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide .II. *In vivo* studies. *Life Sci.* (1983), 32, 1849-1856.
38. Romeo, E.; Auta, J.; Kozikowski, A.P.; Ma, A.; Papadopoulos, V.; Puia, G.; Costa, E.; and Guidotti, A.; 2-Aryl-3-indolacetamides (FGIN-1): a new class of potent and specific ligands for the mitochondrial DBI receptor (MDR). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1992), 262, 971-978.
39. Campiani, G.; Nacci, V.; Fiorini, I.; De Filippis, M.P.; Garofalo, A.; Ciani, S.M.; Greco, Novellino, E.; Williams, D.C.; Zisterer, D.M.; Woods, M. J.; Mihai, C.; Manzoni, C.; Mennini, T.; Synthesis, biological activity, and SARs of pyrrolobenzoxazepine derivatives, a new class of specific “peripheral-type” benzodiazepine receptor ligands. *J. Med. Chem.*, (1996), 39, 3435-3450.
40. Trapani, G. *et al.*; Structure-activity relationships and effects on neuroactive steroid synthesis in a series of 2-phenylimidazo[1,2-a]pyridineacetamide peripheral benzodiazepine receptors ligands. *J. Med. Chem.*, (2005), 48, 292-305.
41. Serra, M. *et al.*; 2-Phenyl-imidazo[1,2- α]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats. *Br. J. Pharmacol.*, (1999), 127, 177-187.
42. Trapani, G.; Franco, M.; Ricciardi, L.; Latrofa, A.; Genchi, G.; Sanna, E.; Tuveri F.; Cagetti, E.; Biggio, G.; Liso, G.; Synthesis and binding affinity of 2-phenyl-

- imidazo[1,2-a]pyridine derivatives for both central and peripheral receptors: a new series of high affinity and selective ligands for peripheral type. *J. Med. Chem.*, (1997), 40, 3109-3118.
43. Laquintana V., Denora N., et al.; Peripheral benzodiazepine receptor ligand-PLGA polymer conjugates potentially useful as delivery systems of apoptotic agents. *J. of Contr. Release* (2009), 137, 185-195.
 44. T. Musacchio; Preparazione di sistemi polimerici biocompatibili e chimicamente modificati con ligandi altamente affini e selettivi del recettore benzodiazepinico periferico per un rilascio sito-specifico di farmaci antitumorali. *Tesi di dottorato di ricerca XIX ciclo*.
 45. A.A. Brandes, et al.; Future trends in the treatment of brain tumors, *Eur. J. Cancer* (2001), 37, 2297-2301.
 46. H.A. Fine, et al.; Metanalysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. *Cancer* 1993, 71, 2585-2597.
 47. P.L. Kornblith, et al.; Chemotherapy for malignant gliomas. *J. Neurosurg.* (1998), 68, 1-17.
 48. S.B. Green, et al.; Comparisons of carmustine, procarbazine, and high-dose methylprednisolone as additions to surgery and radiotherapy for the treatment of malignant glioma. *Cancer treat. Rep.* (1983), 67, 121-132.
 49. Murakami H., Kobayashi M., Takeuchi H. and Kawashima Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.*, (1999), 187, 143-152.
 50. Cohen-Sela E., Chorny M., Koroukhov N., Danenberg H.D. and Golomb G. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Control Release.*, (2009), 133, 90-95.
 51. Sastre R.L., Olmo R., Teijón C., Muñíz E., Teijón J.M. and Blanco M.D. 5-Fluorouracil plasma levels and biodegradation of subcutaneously injected drug-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers. *Int. J. Pharm.*, (2007), 338, 180-190.
 52. R. Fisher, et al., Epileptic seizures and Epilepsy: definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE); *Epilepsia*, (2005), 46 (4), 470-472;
 53. G. Mawer, et al., Pregnancy with epilepsy: Obstetric and neonatal outcome of a controlled study; *Seizure*, (2010), 19, 112-119;

54. K. L. Audus, Controlling drug delivery across the placenta, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (1999), 8, 161-165.
55. Ditte Molgaard-Nielsen, et al., Newer-generation antiepileptic drugs and the risk of major birth defects, *JAMA*, (2011), 305 (19), 1996-2002;
56. M. B. Broichsisitter, E. Rytting, et al., Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the “ouzo region” upon drug loading, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (2010), 41, 244-253.
57. M.S. Poulsen, E. Rytting et al. Modeling placental transport: correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion. *Toxicology in vitro* (2009), 23, (7), 1380-1386;
58. S. Dauchy, et al., Expression and transcriptional regulation of ABC transporters and cytochromes P450 in hCMEC/D3 human cerebral microvascular endothelial cells, *Biochemical Pharm.*, (2009), 77, 897-909.
59. M. N. Ragnai, et al., Internal benchmarking of a human blood-brain barrier cell model for screening of nanoparticle uptake and transcytosis, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2011), 77, 360-367