



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Chimiche
Indirizzo Scienze Farmaceutiche
XXVII ciclo

***Profarmaco: un approccio strategico in continua
crescita in campo farmaceutico.***

Tutor

Chiar.mo Prof. Gianpiero Boatto

Dott. Salvatore Magliocca

INDICE

INTRODUZIONE	3
PROFARMACO	5
La strategia del profarmaco	7
GREEN CHEMISTRY	14
Liquidi ionici	16
Modelli computazionali di sistemi biologici.....	19
FARMACI ANTI-INFIAMMATORI NON STEROIDEI (FANS)	22
Effetti indesiderati	26
Indometacina	28
Diclofenac	29
Acido mefenamico	31
Flurbiprofene	32
Ketoprofene	33
Ibuprofene	35
GALATTOSIO COME VETTORE	37
Attività biologica del galattosio	38
La famiglia dei trasportatori per gli esosi: i GLUTs.....	40
SCOPO DEL LAVORO	47
Esperienza all'estero	48
RISULTATI	52
Sintesi Indogal.....	52
Sintesi Mefegal.....	54
Sintesi Diclogal	56
Sintesi Ibugal.....	58

Sintesi Okigal.....	60
Sintesi Flugal	62
Sintesi Metil 8-(2-succinildigliceride)-micofenolato	64
Sintesi 5-tiovaleratodigliceride micofenolato.....	66
Schema 8.....	67
Stabilità chimica ed enzimatica dei profarmaci galattosilati	68
Ulcerogenicità profarmaci galattosilati.....	71
Attività analgesica profarmaci galattosilati	79
Trasporto linfatico profarmaci dell'acido micofenolico.....	81
CONCLUSIONI.....	82
Potenzialità e vantaggi dell'approccio proposto	83
MATERIALI E METODI.....	85
Sintesi.....	85
Prove di stabilità chimica ed enzimatica dei profarmaci galattosilati	111
Esperimenti farmacologici	113
Trasporto linfatico dei profarmaci dell'acido micofenolico.....	114
BIBLIOGRAFIA.....	116

INTRODUZIONE

Al giorno d'oggi i profarmaci sono ampiamente studiati per ottenere strategie terapeutiche nuove e più efficaci a minor costo. Infatti dalla scoperta del primo profarmaco Prontosil, avvenuta nel 1935, ad oggi la ricerca di nuovi profarmaci, se pur lentamente, è andata espandendosi portando alla messa in commercio di vari prodotti come la Levodopa e la Bacampicillina. Però solo negli ultimi anni l'industria farmaceutica si è focalizzata con maggiore attenzione sulla tecnologia del profarmaco.

Il concetto di profarmaco ha avuto una lenta espansione perché le aziende del settore farmaceutico in passato hanno sempre espresso una nota di scetticismo sulla sua efficacia e, anche risultati incoraggianti, ottenuti negli anni, non sono bastati, per molto tempo a spingerle ad impegnarsi in questo campo.

Questa lenta espansione è dovuta al fatto che per decenni la principale preoccupazione della chimica farmaceutica è stata quella di progettare una gamma di nuovi analoghi sintetici strutturalmente correlati ad un composto attivo, provocando nel processo, uno spreco inutile di tempo e risorse economiche (**Fig.1**).

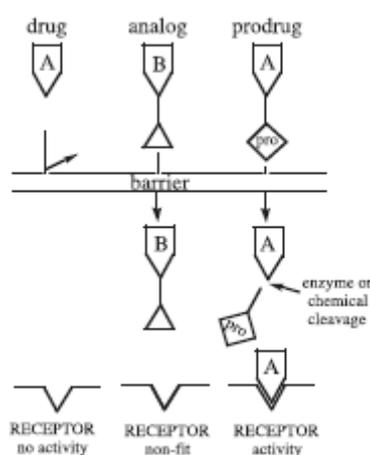


Fig. 1 Schema utilizzato da Ferres (1983) per mostrare le differenze potenziali tra l'approccio dell'analogo strutturale e l'approccio del profarmaco al recettore

Per tale motivo i profarmaci necessitano di un maggiore studio al fine di renderli più appetibili per le aziende e per il mercato globale. È opportuno quindi, sviluppare un approccio strategico differente, che dia loro un maggior risalto andando ad eliminare o a ridurre l'utilizzo di sostanze tossiche nell'ottica di una nuova concezione di chimica denominata "Green Chemistry". Infatti negli ultimi anni questa nuova corrente di pensiero è andata via via espandendosi grazie anche alla produzione di nuovi strumenti adatti a facilitare l'espansione di questa filosofia di chimica.

Gli strumenti adoperati al giorno d'oggi da tutti gli scienziati che seguono questa corrente di pensiero per la loro ricerca sono:

- i liquidi ionici, sali che a temperatura ambiente sono liquidi che possono essere utilizzati come solventi e sono riciclabili;
- sistemi computazionali in grado di analizzare la fisiologia, la biologia della malattia e la rete di reazioni molecolari mediante simulazioni e modelli multiscale, e capaci di connettere tra loro i dati ottenuti, in modo da predire il percorso di un profarmaco nel nostro organismo al fine di migliorare le caratteristiche di quest'ultimo.

Tutto ciò si traduce in un miglioramento dell'efficacia del *parent drug*, ad una riduzione della sua tossicità intrinseca, a una produzione con una sintesi più sicura e ad una riduzione dei costi per le case farmaceutiche.

PROFARMACO

La distinzione tra nuovi analoghi e profarmaci (**Fig. 1**) è che i primi sono biologicamente attivi ed hanno lo scopo di incrementare la potenza e ottenere la specificità di azione, i secondi richiedono una conversione *in vivo* per ottenere un'attività biologica ed hanno lo scopo di superare le barriere farmaceutiche e farmacocinetiche nell'applicazione clinica del farmaco, compresi tossicità, instabilità chimica, basso assorbimento, mancanza di specificità sul sito d'azione e non di meno la *compliance* del paziente. Inoltre, i più grandi vantaggi del profarmaco rispetto ad un nuovo analogo è che sono più facilmente sintetizzabili e la sua efficacia è più facilmente prevedibile. Infatti grazie alla loro conversione metabolica non alterano la struttura primaria del *parent drug*.

Lo sviluppo dei profarmaci si basa sulla coniugazione di gruppi chimici o *carriers* al farmaco che sarà eventualmente rilasciato direttamente nel sito d'azione. Sono state studiate un grande numero di combinazioni tra farmaci e differenti potenziali *carriers* che hanno contribuito alla realizzazione di nuovi profarmaci utilizzabili clinicamente.

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

In effetti, i profarmaci sono già stati sfruttati con successo nel trattamento di specifiche e diverse patologie, tra cui l'ipertensione, le

malattie del colon, il cancro, le disfunzioni epatiche e renali, i disturbi del sistema nervoso centrale, così come le infezioni virali.

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

Il vettore deve formare col farmaco un legame covalente reversibile, in quanto una delle condizioni necessarie per l'utilizzo della strategia del profarmaco è il ripristino del farmaco che andrà a svolgere l'azione terapeutica.

Il vettore può essere un gruppo lipofilo, se si vuole aumentare la lipofilia della molecola per sfruttare il meccanismo della diffusione passiva attraverso le membrane biologiche, oppure una molecola che, riconosciuta da uno specifico trasportatore o *carrier* membranario, permette l'internalizzazione del profarmaco nella cellula (**Fig. 2**).

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

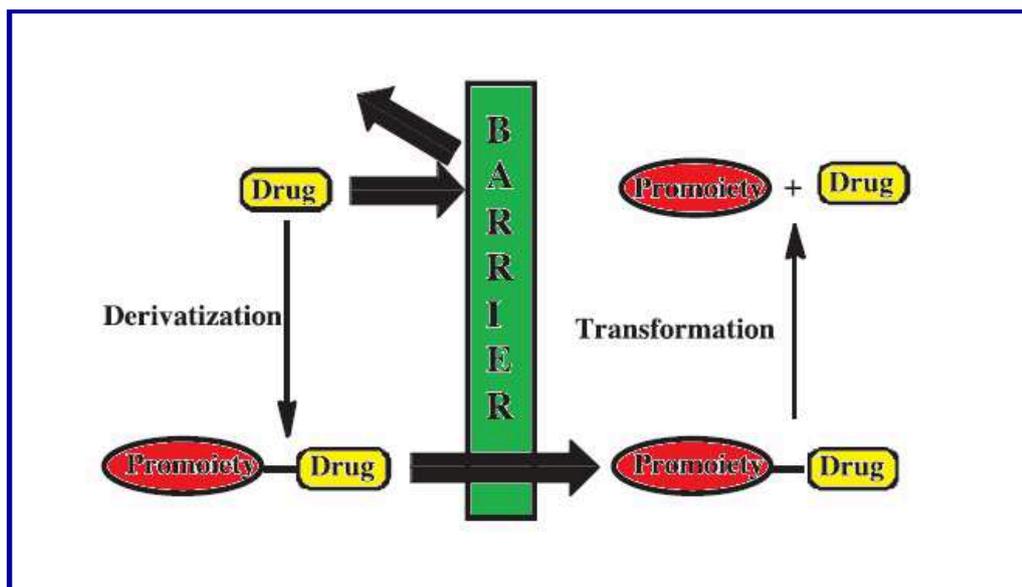


Fig. 2 *Schema di funzionamento del profarmaco*

La strategia del profarmaco

I profarmaci possono essere utilizzati per migliorare la somministrazione orale di farmaci scarsamente permeabili. La somministrazione orale di farmaci può presentare alcuni ostacoli:

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

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

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

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

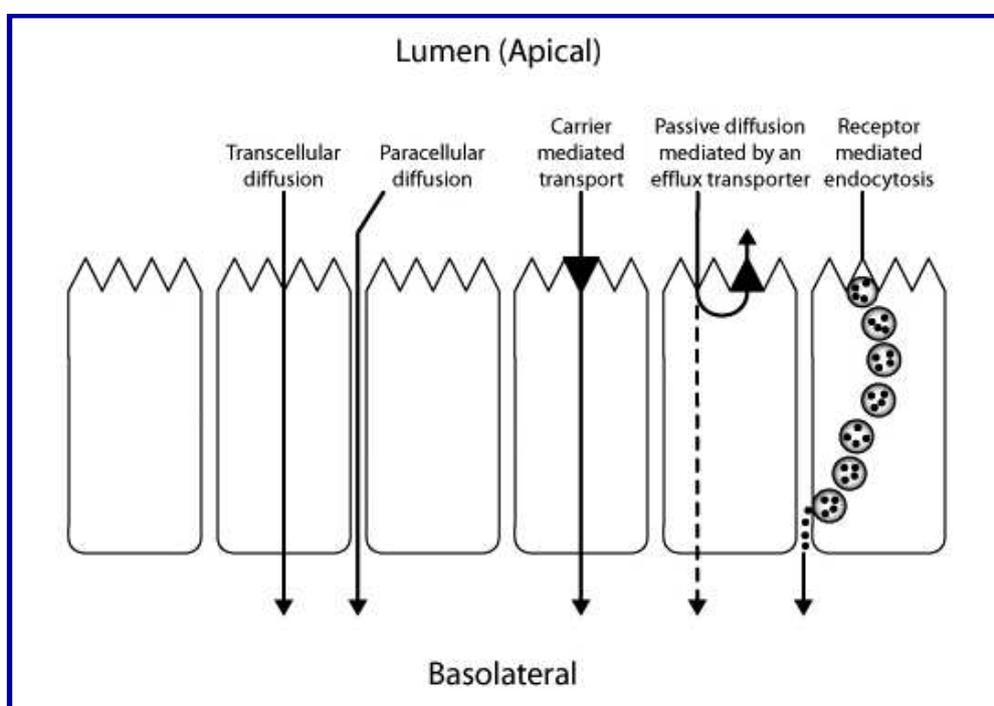


Fig.3 Cinque maggiori meccanismi di permeazione a livello gastro-intestinale.

La diffusione passiva transcellulare è, in generale, l'itinerario preferito per la permeazione attraverso una membrana. Ciò è principalmente dovuto alla elevata area superficiale disponibile per la diffusione passiva e minori vincoli di dimensioni rispetto alla diffusione paracellulare ^[1]. Rispetto al

trasporto carrier-mediato e all'endocitosi recettore mediata, la diffusione passiva transcellulare è anche preferibile perché ci sono meno vincoli riguardanti il riconoscimento da parte dei trasportatori o recettori.

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

Se un farmaco risulta essere troppo idrofilo verrà assorbito poco nel tratto gastrointestinale e più facilmente eliminato dal rene, avrà quindi una scarsa biodisponibilità orale. Questo ostacolo si può superare generalmente andando ad aumentare la lipofilia del farmaco per facilitare il suo attraversamento delle membrane cellulari. Ciò avviene, ad esempio, nel caso di una via di somministrazione enterale, in cui il principio attivo deve prima arrivare al circolo sanguigno in seguito all'assorbimento gastrointestinale, e successivamente deve lasciare il circolo ematico per entrare nella cellula bersaglio.

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

Si può aumentare il grado di lipofilia di un farmaco derivatizzando gruppi funzionali polari in esso presenti, ad esempio farmaci contenenti funzioni alcoliche o acidi carbossilici possono essere trasformati in esteri tramite opportuni vettori che contengano rispettivamente una funzione acida carbossilica o un gruppo alcolico (**Fig 4**).

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

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

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

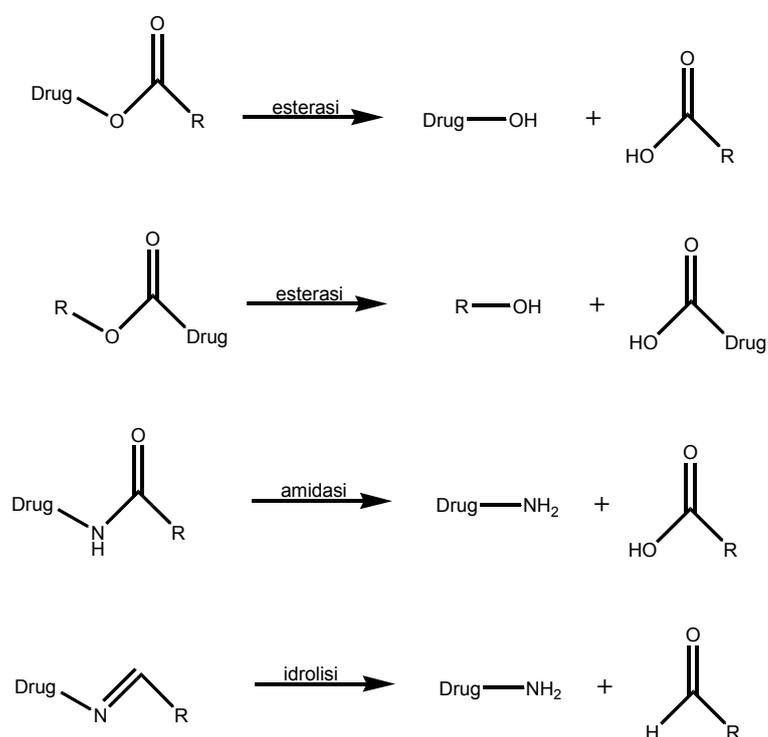


Fig. 4 Funzioni derivatizzabili per sintetizzare profarmaci.

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

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

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

Anche se non si identifica un determinato enzima ma c'è nel sito bersaglio una caratteristica peculiare, come un determinato pH o un ambiente ossidante o riducente, diverso rispetto al resto dell'organismo, si può progettare un profarmaco adatto, che, ad esempio, ripristini il farmaco attivo solo in quelle condizioni di pH o in ambiente ossidante o riducente. Per eliminare la tossicità diretta del farmaco, costituita da reazioni allergiche e danno tessutale al momento della somministrazione, si possono

sintetizzare profarmaci che non vengano riconosciuti come allergeni, oppure in cui si eliminano funzioni molto reattive che attaccano indistintamente tutti i tessuti.

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

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

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

Un diverso tipo di profarmaci è rappresentato dai “profarmaci bioprecursori” che sono sempre derivati inattivi di un farmaco di partenza, ma che invece di avere un vettore legato covalentemente, hanno dei gruppi funzionali modificati che vengono metabolizzati tramite le reazioni di fase I nel fegato e biotrasformati nel farmaco attivo. In questo caso, si deve progettare il profarmaco pensando a come verrà poi enzimaticamente attaccato durante il metabolismo di primo passaggio, in cui possono essere coinvolte reazioni ossidative, riduttive, o con meccanismi di attivazione misti^{[2][3]}.

GREEN CHEMISTRY

Il termine “Green Chemistry” fu coniato da Anastas della US Environmental Protection Agency (EPA). Nel 1993 l’ EPA adottò ufficialmente il nome “US Green Chemistry Program” il cui ruolo era quello di essere il punto focale di tutte le attività con gli USA. Anche se il concetto di green chemistry, fu coniato quell’anno, già esisteva questo tipo di ricerca. Un’ottima definizione di green chemistry che può essere utilizzata è la seguente:” *la green chemistry utilizza in modo efficiente (preferibilmente rinnovabili) materie prime, elimina rifiuti ed evita l’uso di reagenti tossici e/o pericolosi e solventi nella produzione e applicazione di prodotti chimici*”.

La chimica sostenibile si basa su 12 principi:

1. prevenire i rifiuti piuttosto che bonificare;
2. efficienza atomica;
3. minor composti chimici pericolosi e tossici;
4. progettare composti sicuri;
5. utilizzare solventi e ausiliari innocui;
6. progettazione per l’efficienza energetica;
7. utilizzo di materiali rinnovabili;
8. brevi sintesi evitando derivatizzazioni;
9. utilizzo di catalizzatori anzichè reagenti stechiometrici;
10. progettare prodotti che sono facilmente biodegradabili
11. metodi analitici per prevenire l’inquinamento;
12. minimizzare potenziali incidenti.

In altre parole la green chemistry elimina i rifiuti a monte.

Due misure utili per valutare se una reazione si avvicina alla chimica sostenibile sono il fattore “E”, definito come il rapporto di massa dei rifiuti per il prodotto desiderato, e l’efficienza atomica, calcolata dividendo il peso molecolare del prodotto desiderato con la somma dei pesi molecolari di tutte le sostanze prodotte nell’equazione stechiometrica.

Il fattore E è la quantità effettiva di rifiuti prodotti in un processo, infatti la resa chimica prende in considerazione i reagenti, i solventi persi, tutti gli aiuti di processo e, in linea di principio, anche il combustibile. C’è solo un’eccezione: l’acqua, che generalmente non è inclusa nel fattore “E”; per esempio, nei rifiuti acquosi sono considerati solo i sali inorganici e i composti organici in essa contenuti. Un alto fattore “E” equivale quindi ad una quantità elevata di rifiuti, in altre parole ad un maggior impatto negativo sull’ambiente. Il valore ideale del fattore “E” è zero. Può essere approssimativamente calcolato sottraendo ai kg di materie prime i kg di prodotto desiderato, dividendo tutto per i kg di prodotto ottenuto.

Fino a pochi anni fa molte aziende non erano consapevoli di questo fattore durante i processi industriali, ora però lentamente sono più consapevoli dell’importanza del valore assunto da tale fattore soprattutto nei prodotti farmaceutici (dove il bisogno è maggiore). Un altro concetto, introdotto da Trost, molto utile in questo campo, è “l’efficienza atomica” che dà una rapida valutazione dell’ammontare di rifiuti che saranno generati da un determinato processo e viene calcolato dividendo il peso molecolare del prodotto per il totale dei pesi molecolari di tutte le sostanze formatesi nell’equazione stechiometrica della reazione coinvolta^[4]. Ad esempio l’esterificazione degli acidi carbossilici è una delle più importanti reazioni di sintesi organica e convenzionalmente è condotta con un eccesso di acido carbossilico (o alcool) nei confronti della controparte in presenza di un

catalizzatore acido, o con uno stechiometrico reagente deidratante o con un derivato attivato dell'acido carbossilico; in tali condizioni di reazione viene prodotta una quantità significativa di sottoprodotti che vanno ad inquinare l'estere richiedendo, quindi, uno spreco di materiali, energia e tempo per la purificazione. Per tale motivo recentemente, sono stati compiuti sforzi per sviluppare metodi più ecosostenibili, come ad esempio l'utilizzo dei liquidi ionici, cioè sali liquidi a temperatura ambiente.

Liquidi ionici

I liquidi ionici o più specificatamente room temperature ionic liquids (RTIL) hanno attratto notevole interesse negli ultimi anni. Una definizione sommaria di cosa sono i RTIL potrebbe essere che sono dei sali con un punto di fusione al di sotto di 100°C. La sintesi del primo liquido ionico si dice risalga al 1914 da un lavoro di Walden su l'uso degli alchilammonio nitrati^[5]. La ricerca dei sali fusi è in continua espansione per i loro enormi vantaggi che potrebbero apportare nel campo chimico. Infatti in primo luogo un sale fuso ha un'ottima stabilità chimica, termica ed elettrochimica, ma a causa delle alte temperature necessarie per la fusione è un problema utilizzarlo ad ogni scala di reazione; basti pensare che NaCl ha un punto di fusione di 800 °C ed anche la miscela eutectica LiCl-KCl ha un punto di fusione di 355 °C. Per tale motivo i ricercatori si sono impegnati nell'ottenere sali che avessero punti di fusioni più bassi.

La caratteristica principale che determina se un sale ha un punto di fusione basso è l'asimmetria, in altre parole le dimensioni tra il catione e l'anione devono essere differenti. Quindi più le dimensioni tra i due ioni saranno differenti più il punto di fusione di tale sale sarà basso^[6]. La lista dei liquidi ionici è in continua crescita, ma i cationi sono generalmente sali di

ammonio o fosfonio o etero aromatici, ingombranti, asimmetrici, con deboli interazioni intermolecolari e bassa densità di carica. I sali di 1,3-dialchilimidazolo sono quelli più intensamente studiati. Per quanto riguarda il controione, di solito sono sali inorganici ed includono PF_6^- , BF_4^- , CF_3SO_3^- e $(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}^-$, anche se più recentemente anche anioni organici RCO_2^- sono stati introdotti (Fig.5)^[7].

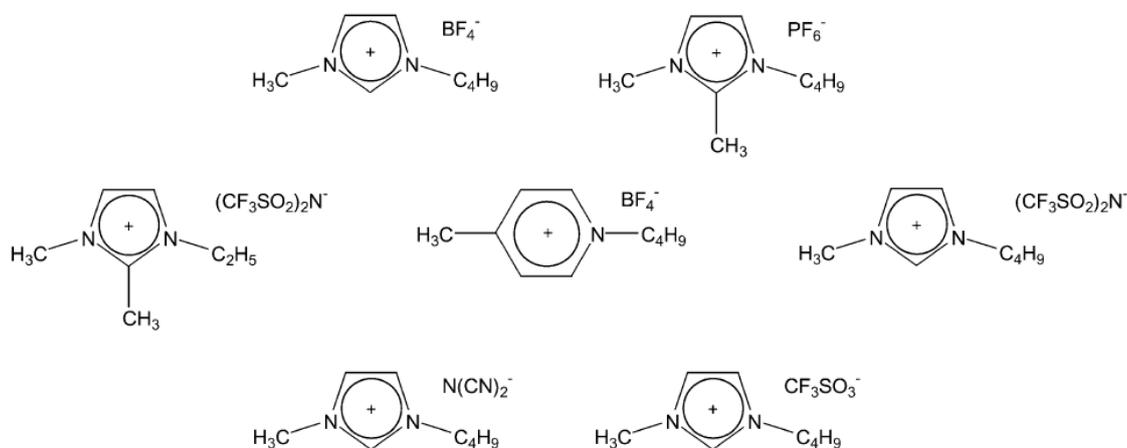


Fig. 5 Esempi di liquidi ionici presenti in commercio.

I liquidi ionici sono potenziali solventi per una serie motivi:

- sono generalmente liquidi trasparenti con una bassa viscosità;
- bassa tensione di vapore al di sotto delle condizioni ambientali e quindi sono non volatili;
- sono ottimi solventi per un ampio spettro di materiali inorganici, organici e polimeri, e sono immiscibili con numerosi solventi organici;
- essendo composti di due parti, c'è una flessibilità di sintesi che non è possibile per i solventi molecolari monocomponente^[8].

Grazie a queste proprietà questi sali sono facilmente riutilizzabili e ciò permette loro di essere inseriti nel campo della green chemistry.

Un esempio di reazione green di interesse è la sintesi del ferrocenil estere raggiunta utilizzando dicicloesilcarbodimide e 4-(dimetilamino)piridina a temperatura ambiente con 1-butil-3-metilimidazolo tetrafluoroborato ([bmim][BF₄]) e 1-butil-3-metilimidazolo esafluorofosfato ([bmim][PF₆]) ottenendo una resa molto alta ed un efficiente riciclaggio del solvente^[9].

Modelli computazionali di sistemi biologici

I test di simulazione sono diventati strumenti indispensabili nella ricerca e sviluppo farmaceutico. Infatti nel campo della ricerca sono presenti molti software che analizzano il comportamento del farmaco nell'organismo, focalizzandosi però solo su aspetti isolati, come ad esempio la farmacocinetica o interazioni farmacodinamiche, comportando un grosso limite, perché i dati ottenuti non sono confrontabili con le molte variabili della biologia umana.

La maggior parte degli strumenti di modellazione di fisiologia generale come il PK-Sim® si concentrano sulle dinamiche della fisiologia umana per descrivere l'assorbimento, distribuzione, metabolizzazione ed eliminazione (ADME) di xenobiotici, quindi questi modelli di fisiologia basato sulla farmacocinetica (PBPK) sono difficili da estendere e personalizzare, perché sono generalmente soggetti ad errori e difficili da valutare in considerazione alla loro formulazione non standard.

Il MoBi® è un altro software in grado di apportare modifiche strutturali del modello PBPK come ad esempio l'aggiunta di altri tessuti, di tessuti sub-comparti, dell'accoppiamento dinamico di molteplici modelli PBPK stabiliti nel PK-Sim® per rappresentare il metabolita di un farmaco, o scenari di interazione farmaco-farmaco, ma anche l'integrazione di modelli di reti metaboliche o di segnalazione come modelli di effetti farmacodinamici di complessità arbitraria.

Negli ultimi anni è presente nel campo della ricerca una piattaforma in grado di migliorare i software citati in precedenza, il MoBi® toolboxes for R and MATLAB®, che insieme al MoBi® e al PK-Sim® costituiscono un ottimo programma di simulazione. Infatti quest'ultimo software è in grado di collegare e interpretare i dati provenienti da PK-Sim® e MoBi® (Fig. 6).

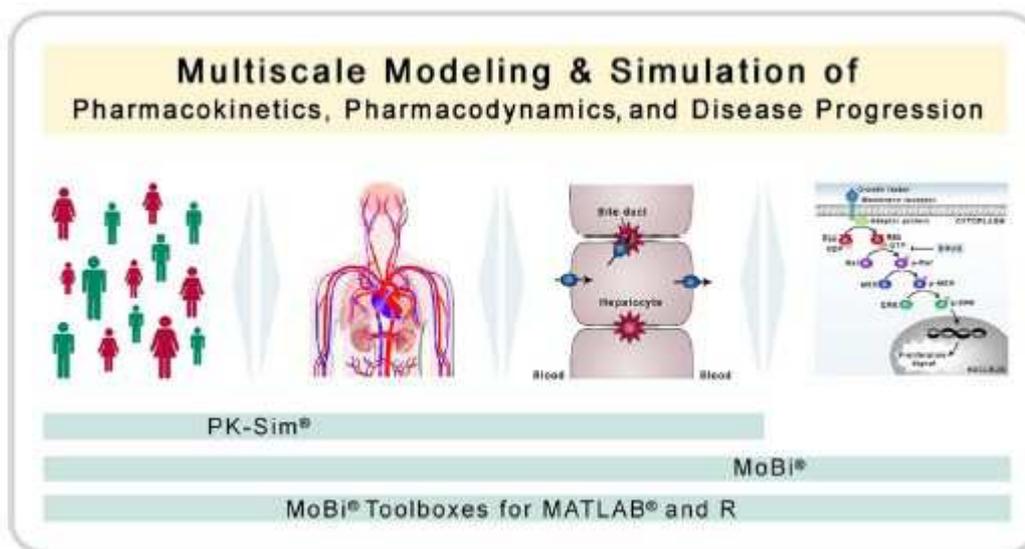


Fig. 6 Software per il modello multiscale e simulazione di farmacocinetica, farmacodinamica e progressione della malattia.

Ad esempio è presente un lavoro in cui è stato adoperato il modello multiscale di tale piattaforma per analizzare la progressione di tumore pancreatico e la sua farmacoterapia, costruita su pazienti virtuali utilizzando un profarmaco attivato tramite metabolizzazione epatica, per mezzo di un enzima (CYP2D6), il quale presenta un polimorfismo che altera il tasso di metabolizzazione dell'antitumorale.

Il modello è stato applicato quindi, simulando il trattamento terapeutico individuale in base a realistiche predisposizioni genetiche del CYP2D6 dei pazienti virtuali (Fig. 7).

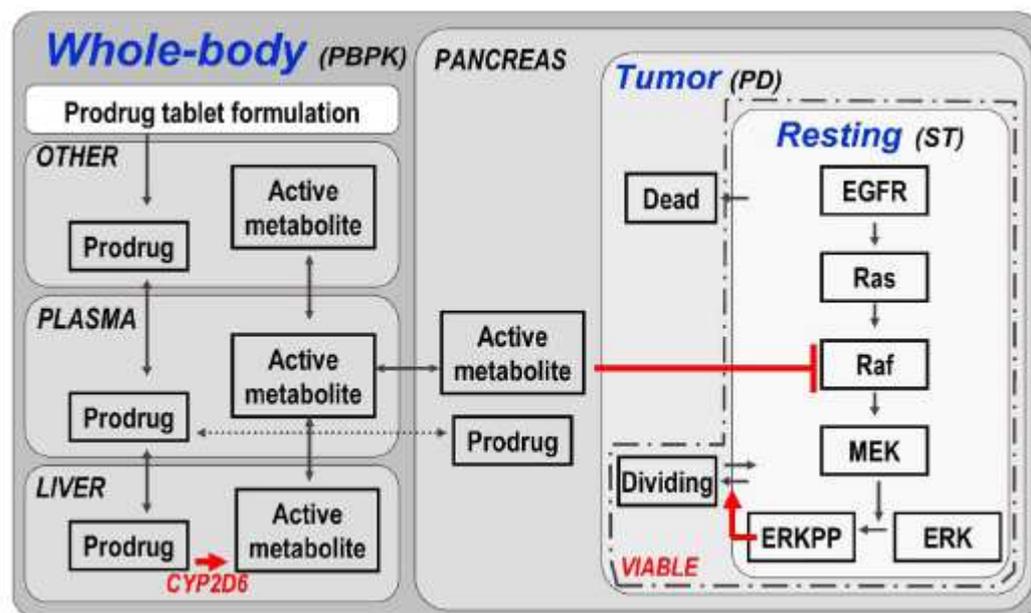


Fig. 7 Percorso farmacocinetico e farmacodinamico del profarmaco.

In più si è analizzato il comportamento del metabolita attivo, seguendo le linee guida della farmacodinamica e il processo di inibizione della Raf chinasi nella cascata di segnali e quindi la progressione del ciclo cellulare. Questo esempio dimostra come la realizzazione della piattaforma attraverso i componenti PK-Sim®, MoBi®, e il toolbox for R and MATLAB® ha presentato un quadro versatile e potente che consente una veloce e affidabile costruzione di un modello di simulazione e analisi attraverso multiscale fisiologici. Tale piattaforma è stata progettata per le esigenze della scienza e della ricerca farmaceutica, mirando ad una riduzione dei costi per la ricerca e sviluppo^[10].

FARMACI ANTI-IFIAMMATORI NON STEROIDEI (FANS)

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

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

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

Il meccanismo di azione antipiretica dei FANS sembra derivare dall’inibizione della produzione delle prostaglandine nell’ipotalamo. Durante la risposta infiammatoria, endotossine batteriche determinano il rilascio dai macrofagi di un pirogeno (IL-1) che stimola la produzione nell’ipotalamo di prostaglandine di tipo E (PGE) che possono successivamente promuovere l’aumento della temperatura. La COX-2

potrebbe avere un ruolo a questo livello poiché indotta dall'IL-1 dell'endotelio dei vasi sanguigni dell'ipotalamo.

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

Effetti anti-infiammatori. I FANS riducono principalmente quelle componenti dell'infiammazione e della risposta immunitaria in cui i prodotti dell'azione delle COX-2 svolgono un ruolo significativo, vale a dire: vasodilatazione (per la diminuzione delle prostaglandine vasodilatatrici come la PGE₂ e le prostaciline), edema e dolore.

Questi effetti sono dovuti all'enzima ciclossigenasi (COX) che prende parte alla cosiddetta cascata dell'acido arachidonico per la formazione di prostaglandine (PGE₂, PGE₁, PGF₂, PGD₂), prostaciline (PGI₂) e trombossano A₂. Questi sono eicosanoidi, che insieme anche ai leucotrieni, sono ottenuti a partire da fosfolipidi di membrana e sono dotati di importanti ruoli fisiologici e patologici. I leucotrieni si formano anch'essi dall'acido arachidonico per azione però dell'enzima 5-lipossigenasi.

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

Sono noti due tipi di ciclossigenasi, vale a dire la COX-1 e la COX-2, anche se recentemente ne è stata descritta una terza forma (COX-3). La

COX-1 è un enzima costitutivo espresso nella maggior parte dei tessuti, comprese le piastrine del sangue, ed è coinvolta nel segnale tra cellula e cellula e nell'omeostasi tissutale. La COX-2 viene prodotta nelle cellule infiammatorie quando queste vengono attivate ed è responsabile della produzione di prostanoidei, mediatori dell'infiammazione. La maggior parte dei FANS, usati correntemente, sono inibitori di entrambi gli isoenzimi sebbene possono differire nel grado di inibizione delle singole forme.

Meccanismo d'azione

L'azione anti-infiammatoria dei FANS è chiaramente legata alla loro inibizione della COX-2 mentre i loro effetti indesiderati sono per la maggior parte dovuti all'inibizione della COX-1. Alcuni composti ad azione selettiva su COX-2 (COXIB) sono ora in uso clinico mentre altri sono in fase di sviluppo (**Fig. 8**).

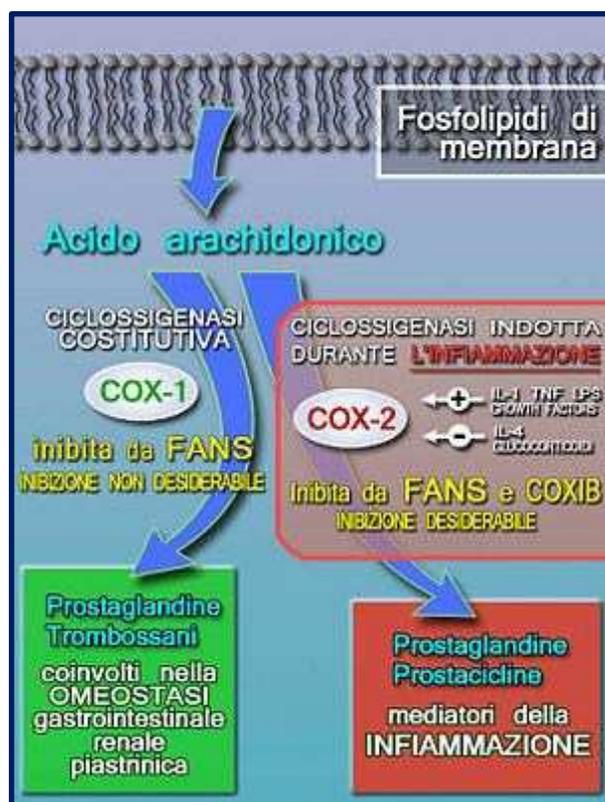


Fig. 8 Meccanismo dell'infiammazione.

Gli inibitori della ciclossigenasi, di per sé, non hanno alcun effetto su quei processi che contribuiscono al danno tissutale in caso di infiammazione cronica (rilascio di enzimi lisosomiali, produzione di radicali tossici dell'ossigeno) ^{[11][12]}.

La principale azione dei FANS consiste nell'inibizione dell'attività metabolizzante l'acido arachidonico della COX. La ciclossigenasi è un enzima bifunzionale che possiede due attività distinte: un'attività principale che dà origine alla PGG₂, e un'attività perossidasi che converte la PGG₂ a PGH₂. Sia gli inibitori della COX-1 sia quelli della COX-2 inibiscono solo la reazione principale della COX. Entrambe le isoforme enzimatiche sono associate alla membrana e sono formate da un lungo canale con una curvatura terminale. L'apertura del canale è principalmente idrofobica.

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

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

L'inibizione della COX-1, in generale, è istantanea e reversibile in modo competitivo (fa eccezione l'Aspirina). L'inibizione della COX-2 è progressiva ed aumenta in maniera tempo dipendente [11][12].

Effetti indesiderati

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

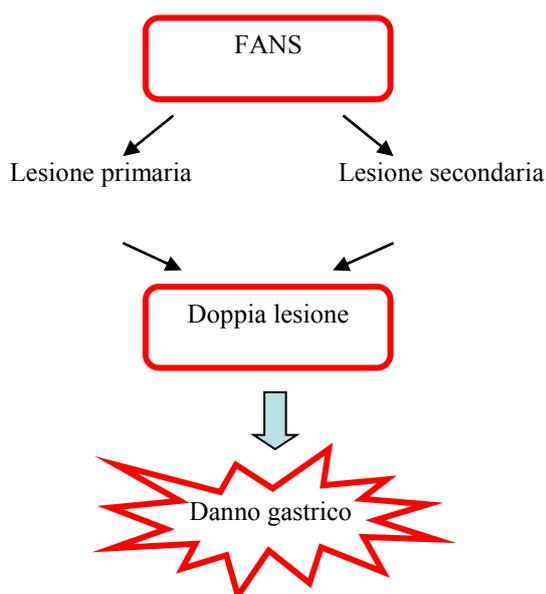


Fig. 9 Meccanismo gastrolesivo dei FANS.

Le lesioni gastriche prodotte dai FANS coinvolgono un doppio meccanismo di danno (**Fig. 9**).

La maggior parte dei FANS è costituita da composti acidi che producono una prima lesione per azione diretta dell'acido a livello della mucosa

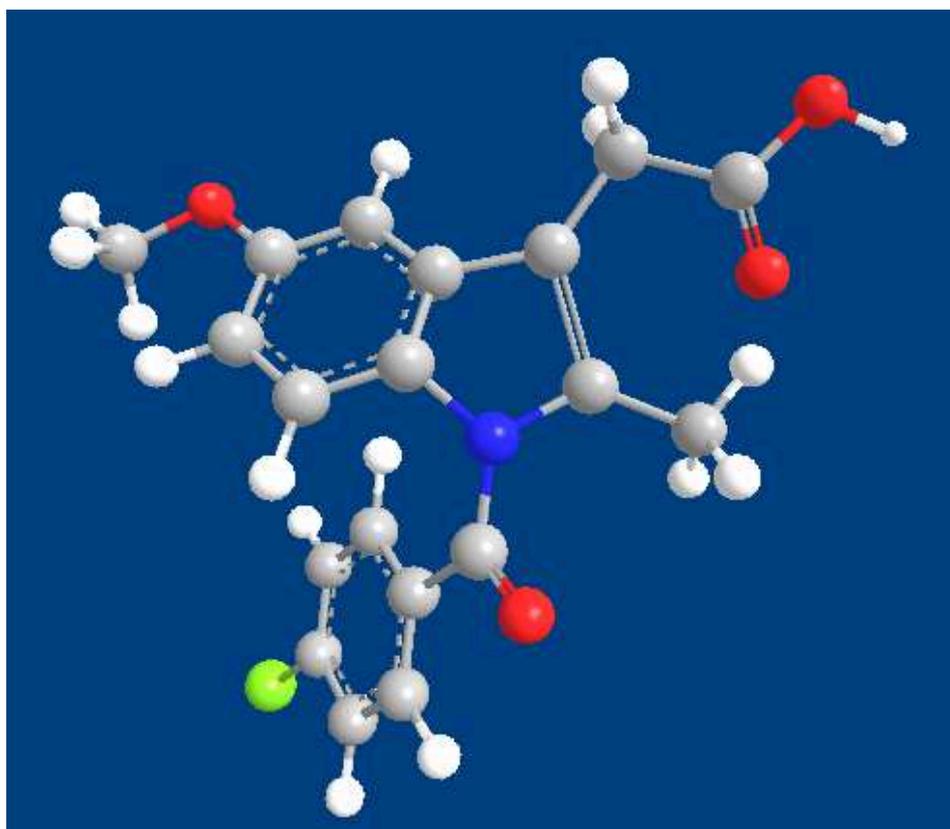
gastrica, un effetto indiretto di contatto, ed una retrodiffusione degli ioni idrogeno. Il danno secondario è dovuto principalmente all'inibizione della COX-1, enzima responsabile della sintesi delle prostaglandine che normalmente inibiscono la secrezione acida e svolgono un'azione citoprotettiva e di conservazione dell'integrità sulla mucosa nel tratto gastrointestinale. Le PGE e la PGI₂ inibiscono la secrezione acida indotta da gastrina e istamina. La PGE₁ esercita un effetto protettivo sulla mucosa gastroduodenale stimolando la secrezione di un muco alcalino e di ioni bicarbonato, e mantenendo o aumentando il flusso sanguigno della mucosa. L'insieme dei due meccanismi provoca tali lesioni.

Altri effetti indesiderati associati all'uso dei FANS includono reazioni cutanee e effetti renali avversi^{[11][12]}.

A causa di questi effetti collaterali gravi ne è limitato l'utilizzo clinico. Da uno studio effettuato su modelli sperimentali in vivo su ratti, i FANS determinano ulcere gastriche a livello antrale e molteplici erosioni intestinali^[13]. Per questo motivo la nostra attenzione è stata rivolta verso Indometacina, Ibuprofene, Acido Mefenamico, Flurbiprofene, Ketoprofene, Diclofenac.

Indometacina

L'indometacina appartenente alla categoria degli acidi aril- ed eteroarilacetici ha una notevole attività anti-infiammatoria ed inoltre un'attività antipiretica ed analgesica 10 volte superiore a quella dell'aspirina.



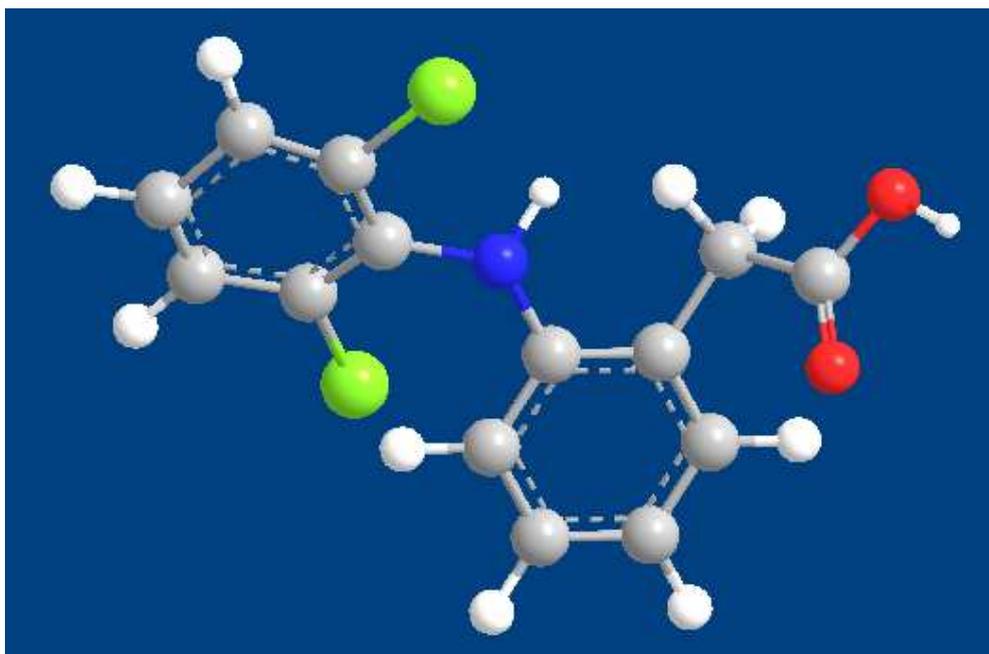
L'indometacina somministrata per via orale ha un rapido assorbimento e raggiunge il picco plasmatico in 2-3 ore creando un forte legame con le proteine plasmatica (97%) ciò dovuto alla sua acidità ($pK_a = 4.5$). Per via metabolica viene convertita in composti inattivi, il 50% dei quali in 5-O-demetilato ottenuto per azione del citocromo CYP2C9, ed il 10% dal coniugato con l'acido glucuronico. Inibisce in modo indiscriminato le COX-1 e le COX-2 e per tale motivo causa pesanti effetti collaterali.

L'indometacina è disponibile per il trattamento a breve termine dell'artrite reumatoide e gottosa acuta, del dolore acuto della spondilite anchilosante e

dell'osteoartrite. È disponibile anche una forma da ricostruire per dare un iniettabile del sale sodico triidrato^[11].

Diclofenac

Il diclofenac possiede caratteristiche strutturali che lo accomunano sia agli acidi arilalcanoici che agli acidi antranilici ed ha notevoli attività anti-infiammatorie, antipiretiche e analgesiche.



Nel test dell'edema da carragenina ha una potenza superiore a quella dell'indometacina ed aspirina, mentre nel test delle contorsioni indotte nel topo da fenilchinone presenta un effetto analgesico 6 volte superiore a quello dell'indometacina e 40 volte più dell'aspirina. Il diclofenac è l'unico FANS che agisce con tre diversi meccanismi d'azione:

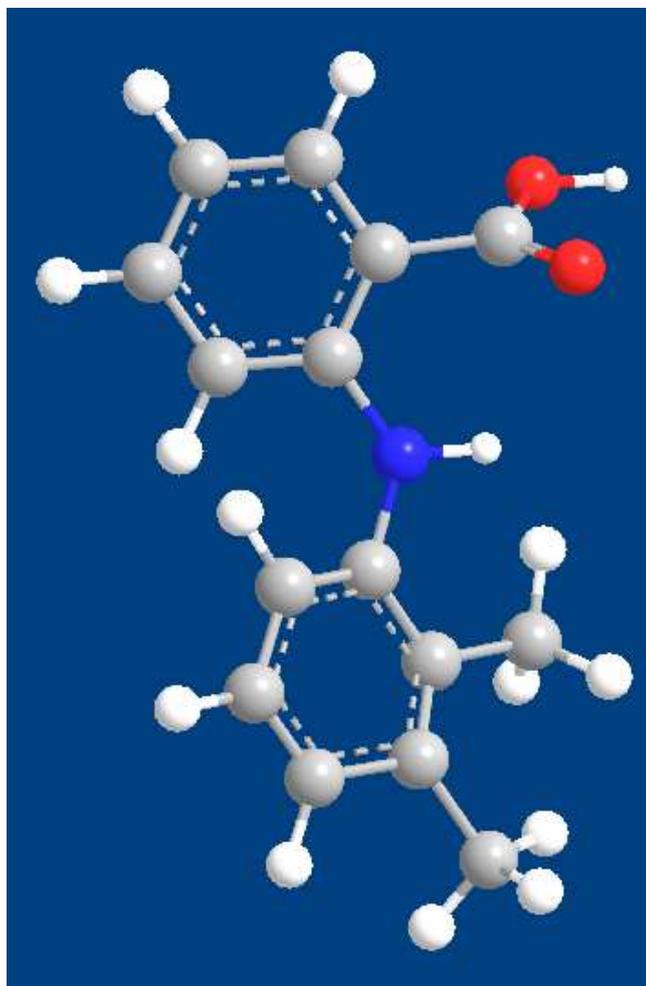
- 1) inibizione del sistema della cicloossigenasi dell'acido arachidonico, che porta ad una diminuzione nella produzione di prostaglandine e trombossani;
- 2) inibizione della via della lipoossigenasi con ridotta produzione di leucotrieni, in particolare del leucotriene B₄, che è un proinfiammatorio;

3) inibizione del rilascio dell'acido arachidonico e stimolazione del suo riassorbimento, che porta a minore disponibilità di tale acido.

Il diclofenac ha un rapido assorbimento (100%) con un picco plasmatico tra le 1.5-2.5 ore. Nella sua forma acida ($pK_a = 4$) è legato fortemente alle proteine plasmatiche (99.5%) in particolare all'albumina. Il problema principale di questo FANS è la sua elevata metabolizzazione epatica infatti solo il 50-60% della dose orale è biodisponibile. Il metabolita principale è il derivato con l'ossidrilico in 4' ottenuto dal CYP3A4. È utilizzato per il trattamento dell'artrite reumatoide, osteoartrite e spondilite anchilosante^[11]. Il Diclofenac provoca effetti collaterali nel 20% circa dei pazienti ed approssimativamente il 2% di essi sospendono la terapia. Gli effetti collaterali sono quelli comuni a tutti i FANS; sono stati osservati sanguinamento e ulcerazione o perforazione della parete intestinale^[14].

Acido mefenamico

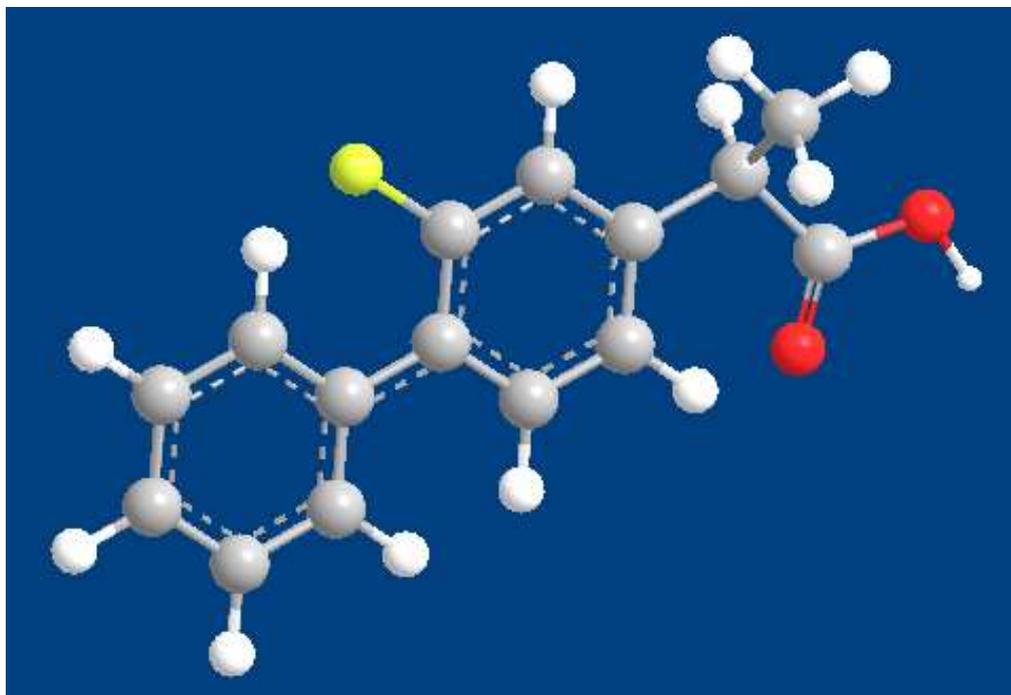
L'acido mefenamico appartiene alla classe degli acidi N-arilantranilici ed ha una discreta attività anti-infiammatoria e antipiretica, però è l'unico di questa classe a produrre analgesia centrale e periferica.



Per via orale ha un rapido assorbimento con picco plasmatico tra le 2 e le 4 ore. Ha un'ottima affinità con le proteine plasmatiche (78.5%) ed ha un'emivita plasmatica di 2-4 ore. Il gruppo metilico in 3' è sottoposto ad ossidazione durante la metabolizzazione epatica oltre alla glucuronidazione dell'acido^[11].

Flurbiprofene

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



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

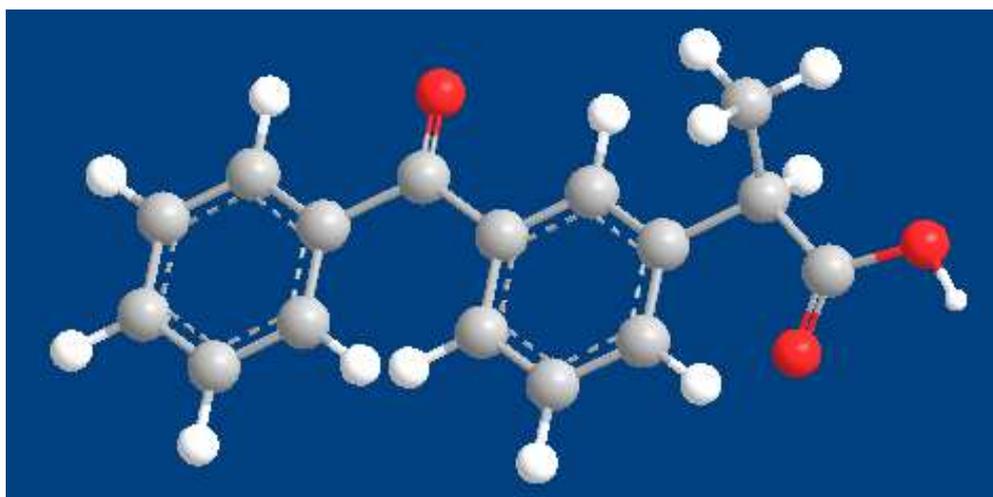
Il Flurbiprofene inibisce sia la COX-1 che la COX-2, con una tolleranza gastrointestinale migliore rispetto all'Aspirina e all'Indometacina, e paragonabile a quella dell'Ibuprofene e del Naprossene. Non ha mai

mostrato effetti epatotossici, teratogenici o cancerogeni. Gli effetti renali ed ipertensivi sono quelli comuni a tutti gli altri FANS.

Il Flurbiprofene è disponibile sotto forma di cerotti transdermici, in compresse o capsule da 50, 100 o 200 mg, ed è indicato per i disturbi di artrite, per la spondilite anchilosante, per la dismenorrea e per il dolore post-operatorio. Benché non sia uno dei più comuni FANS utilizzati in terapia, i recenti problemi incontrati con l'uso clinico di inibitori COX-2 selettivi hanno lasciato spazio ad una sua scelta tra i farmaci analgesici^[15].

Ketoprofene

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



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

Il principale meccanismo d'azione del farmaco è riconducibile all'inibizione della cicloossigenasi (COX) e al conseguente blocco della sintesi delle prostaglandine, responsabili del processo infiammatorio e del

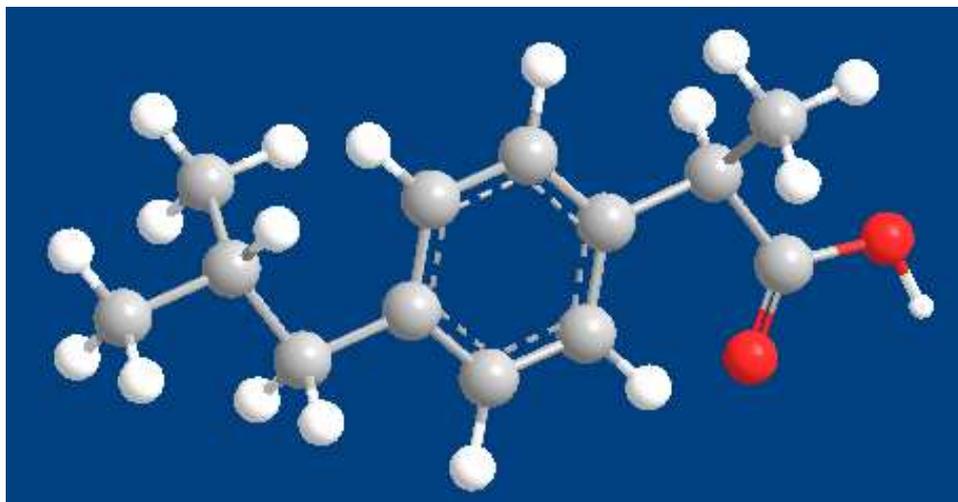
danno tissutale. E' probabile inoltre che il Ketoprofene espliciti la propria attività analgesica anche attraverso un meccanismo di tipo centrale, non oppioide, in cui sono coinvolte strutture sovraspinali quali i recettori glutammato tipo NMDA inducenti la sensibilizzazione centrale in cui sono implicati diversi mediatori biochimici, quali la sostanza P, la 5-HT, oltre alle stesse prostaglandine presenti a livello del SNC; questo spiegherebbe la rapidità dell'effetto antalgico del Ketoprofene. Inoltre, esso inibisce la sintesi dei leucotrieni, della bradichinina e stabilizza le membrane lisosomiali; è in grado di ridurre la sintesi di superossidi da parte dei polimorfonucleati, bloccando il sistema NADPH-NADPH ossidasi diminuendone la liberazione nel sito di flogosi.

Il Ketoprofene è rapidamente assorbito dopo somministrazione orale, si lega ampiamente alle proteine plasmatiche (99%), ed ha un'emivita plasmatica di circa 2 ore. Nel fegato viene coniugato all'acido glucuronico per poi essere eliminato per via renale. Il Ketoprofene attraversa rapidamente la barriera emato-encefalica raggiungendo concentrazioni in equilibrio con quelle plasmatiche, già a 15 minuti dalla sua somministrazione per via intramuscolare alla dose di 100 mg ^[14].

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

Ibuprofene

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



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

L'Ibuprofene *per os* è prescritto spesso a dosi più basse, alle quali ha effetto analgesico ma non antinfiammatorio. Si possono avere irritazione gastrointestinale ed emorragia, ma anche eruzione cutanee, prurito, acufeni, vertigini, cefalea^[16].

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

Come inibitore della cicloossigenasi è meno potente di Ketoprofene e Naprossene^[17], ma è più attivo di Propossifene nel trattamento del dolore odontoiatrico^[18] e della dismenorrea primaria.

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

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

In associazione ad Acido Acetilsalicilico a basse dosi (antiaggregante piastrinico), l'Ibuprofene (400 mg) antagonizza l'azione antiaggregante piastrinica dell'ASA riducendone l'azione cardioprotettiva^{[19][20][21]}.

GALATTOSIO COME VETTORE

Come affermato precedentemente la caratteristica del profarmaco è quella di essere costituita dal *parent drug* ed un vettore, il quale ha il compito di migliorare le caratteristiche farmacocinetiche del farmaco.

Il prodrug per essere efficace:

- non deve essere tossico;
- la velocità di idrolisi tra il vettore e il *parent drug* non deve essere molto lunga;
- il farmaco scisso deve mantenere l'attività farmacologica;
- il vettore libero non deve essere tossico.

Un ottimo vettore da utilizzare è il D-galattosio. Esso è un composto semplice e naturale dimostrandosi migliore nella strategia del profarmaco rispetto al D-glucosio, perché quest'ultimo è coinvolto in una serie di equilibri metabolici che potrebbero essere alterati dopo una somministrazione cronica di un profarmaco glucosilato; basti pensare a persone diabetiche, persone affette da mucopolisaccaridosi, quindi persone affette da dismetabolismi del glucosio le quali, potrebbero risentirne e avere complicanze all'atto di somministrazione di tali *prodrugs*, anche se le quantità dello zucchero utilizzate sono minime.

Ho scelto il D-Galattosio rispetto ad altri potenziali vettori per diversi motivi:

1. esercita una certa attività biologica senza generare effetti avversi;
2. possiede un'elevata solubilità intrinseca in acqua;
3. i suoi trasportatori sono ubiquitari, selettivi e iperespressi in condizioni patologiche;
4. le sue ottime caratteristiche chimiche facilitano le sintesi di profarmaci;

5. è uno dei componenti della mucosa gastrica.

Oltre ai motivi sopra citati è stata adottata la scelta del galattosio anche per i risultati incoraggianti ottenuti con il profarmaco galattosilato del ketorolac (Ketogal) che sono stati oggetto di brevetto presentato nel 2009 e rilasciato nel 2012.

Il Ketogal (**Fig.10**), infatti, ha mostrato avere non solo un'ottima riduzione della tossicità rispetto al suo *parent drug*, ma anche un'ottima attività farmacologica migliore anche a dosi più basse rispetto alla dose minima efficace del ketorolac (0.1 mg/Kg) ed evidenziatasi sia nella fase acuta 0-6 h sia nella fase cronica dell'infiammazione da edema da carragenina 24-48 h^[22].

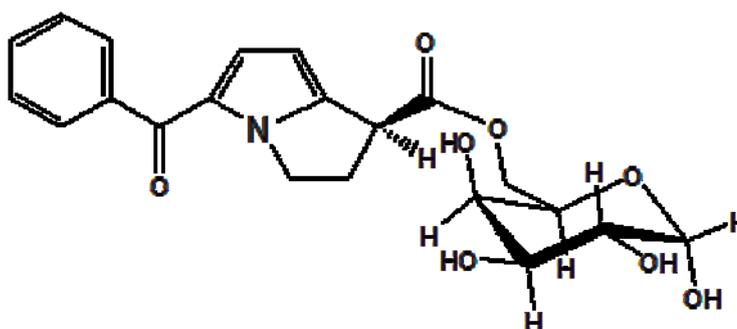


Fig. 10 Ketogal.

Attività biologica del galattosio

Il tratto gastrointestinale è coperto da un strato di muco-gel protettivo, essenziale per l'idratazione, la protezione meccanica, l'eliminazione dei contaminanti e la formazione di un ambiente adatto per il rinnovo di molecole con funzione difensiva incorporate nel muco.

Il muco è costituito approssimativamente dal 95% di acqua, 3% di Mucina e il 2% di altre molecole di varia natura.

La Mucina è una glicoproteina secreta dalle cellule mucose proprie del collo dello stomaco (cellule faveolari) e dalle cellule Goblet a livello intestinale. È formata da fucosio, galattosio (GAL), N-acetilglucosamina,

N-acetilgalattosammina ed acido sialico (SIA). La SIA occupa solitamente la posizione terminale della catena degli oligosaccaridi del glucoconiugato e questi residui terminali hanno un'influenza significativa sulla carica, sulla reologia e sulla degradazione del muco; sulla reologia perchè essi contribuiscono all'elevata viscosità del muco e quindi alla protezione degli strati endoteliali dell'intestino e stomaco; sulla carica perché essa può variare in funzione del pH. Infatti, a livello gastrico, è stato visto che a pH 2 il muco è un gel morbido, facilmente penetrabile da parte di particelle di varia natura dal momento che si presenta come polimero reticolato con pori pieni di acqua, i quali si aprono e permettono il passaggio. Invece a pH 6 il muco si trova allo stato di sol e le particelle non possono muoversi nel loro moto diffusivo, perché ostacolate dalla soluzione polimerica altamente viscosa^[23].

Agenti endogeni come pepsina e acido cloridrico e agenti esogeni come soluzioni saline ipertoniche possono attaccare la mucosa gastrica ed esaurirla di mucina inducendo così erosioni emorragiche. Il loro effetto ulcerogenico può essere correlato proprio alla desializzazione del muco gastrico durante la quale viene idrolizzato l'acido sialico dalla glicoproteina (mucina).

La desializzazione del muco comporta l'esposizione sulla sua superficie del galattosio ed una maggiore attività da parte delle glicosidasi. Queste ultime attaccano facilmente il muco desializzato liberando il galattosio, motivo per cui si realizza un aumento non solo di acido sialico libero, ma anche della concentrazione del galattosio a livello gastrico.

Lo zucchero liberato viene catalizzato dalla piruvato sialato liasi (PSL) in piruvato e nel corrispondente N-acil-mannosammina, componenti che possono attivare enzimi come sialotrasferasi, galattosiltrasferasi ovvero

enzimi che intervengono proprio per sostituire le glicoproteine e mucina erosi e quindi coinvolti nella ri-sintesi del muco^[24].

Paradossalmente, si può dire che il nostro vettore e quindi il Galattosio svolge una funzione protettiva, un'attività biologica ben precisa a livello gastrico infatti è coinvolto nella riparazione del muco, laddove quest'ultimo è stato danneggiato. Poiché uno degli effetti collaterali dei FANS è la lesione della mucosa gastrica per contatto diretto, si potrebbe immaginare che tale danno possa contemporaneamente essere compensato con l'aumento di galattosio che garantiamo con la somministrazione del nostro profarmaco e che potrebbe attivare la riparazione e la rigenerazione del muco gastrico. Inoltre il galattosio ed altri zuccheri possiedono dei trasportatori specifici GLUTs che in condizioni patologiche sono iperespressi^[25].

La famiglia dei trasportatori per gli esosi: i GLUTs.

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

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

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

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

Sono state individuate nei mammiferi sei isoforme di tali trasportatori, e i rispettivi geni^[26]. Vengono numerati da GLUT1 a GLUT7: il GLUT6 è uno pseudogene e non è espresso a livello proteico.

La principale caratteristica delle proteine, da cui esse derivano, è la presenza di 12 segmenti transmembranari ad α elica (**Fig.11**), con i domini ammino-terminale e carbossi-terminale citoplasmatici ed una catena oligosaccaridica (o sito di glicosilazione) presente sul primo *loop* extracellulare, probabilmente con fini regolatori. Cinque domini transmembranari ad α elica (eliche 3, 5, 7, 8 e 11) sono costituiti da regioni idrofile che formano un poro nella membrana, permettendo il passaggio del D-glucosio attraverso il doppio strato fosfolipidico.

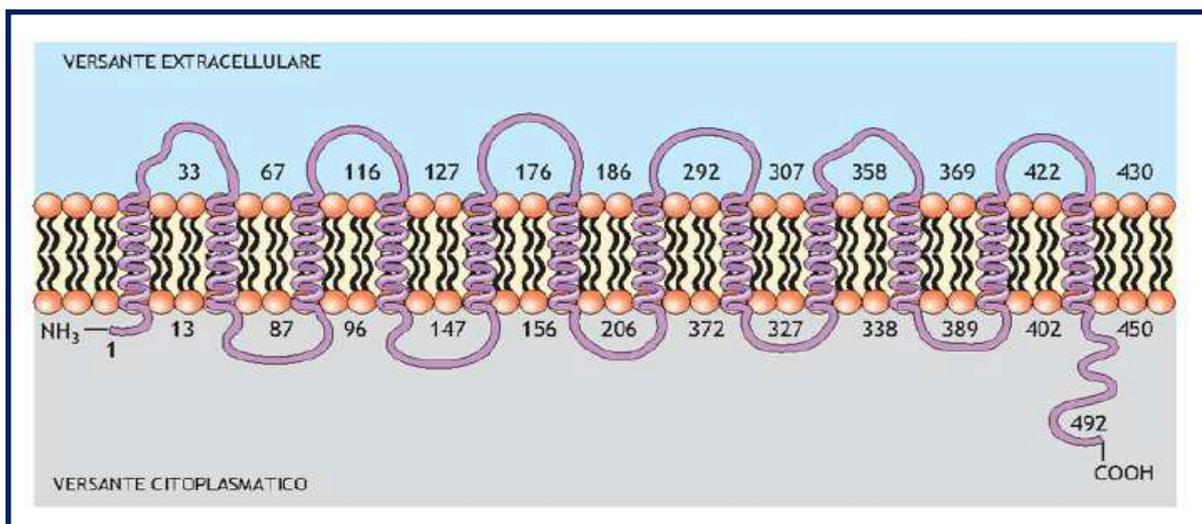


Fig.11 *Struttura transmembranaria tipica dei GLUTs.*

Confrontando le varie isoforme si evince che le sequenze aminoacidiche delle eliche transmembranarie sono quelle più conservate rispetto ai *loops* extramembranari ; inoltre è presente una sequenza di 5 aminoacidi (RXGRR), ripetuta nel *loop* citoplasmatico che connette il secondo e il terzo segmento transmembranario e in quello che connette l'ottavo e il nono segmento.

Ciò ha suggerito che questi trasportatori derivassero da un gene ancestrale che codificava per una proteina di sei segmenti transmembranari e che con l'evoluzione ha subito un evento di duplicazione. Queste isoforme hanno diversi ruoli funzionali, come si evince dalla loro specifica distribuzione tissutale e dalle loro distinte proprietà cinetiche e regolatorie. Infatti presentano una diversa efficienza e velocità di trasporto di diversi esosi e la loro espressione è regolata da diversi fattori sia endogeni che esogeni.

Il *GLUT1* è l'isoforma dei GLUTs più ampiamente espressa nelle cellule, in quanto serve a mantenere i livelli basali di glucosio intracellulare. È maggiormente espresso a livello di barriere epiteliali ed endoteliali, come la Barriera Emato Encefalica (BEE), la placenta, negli eritrociti ma si trova

anche in bassi livelli in molti tessuti e tipi di cellule, fetali ed adulte, spesso in presenza di altre isoforme. Ciò porta alla conclusione che il *GLUT1* sia presente costitutivamente sulla membrana plasmatica per mantenere il livello basale di glucosio necessario alla cellula. Quando nella cellula aumenta il fabbisogno energetico, ad esempio per scopi replicativi, si ha una maggiore espressione del *GLUT1*, per incrementare l'ingresso del glucosio. Questo avviene sia in presenza di fattori di crescita, sia a causa di oncogeni, come conferma la maggiore presenza di *GLUT1* nei tumori^[27]. Inoltre è caratterizzato da un'ampia specificità di substrato in quanto è in grado di trasportare un grande numero di aldosi, sia pentosi che esosi. La maggior parte degli studi di cinetica, di termodinamica e di *binding* sono stati eseguiti sul trasportatore *GLUT1*, l'unica isoforma della famiglia dei trasportatori degli esosi ad essere stata purificata grazie alla sua abbondanza negli eritrociti umani. La purificazione del *GLUT1* ha permesso la conferma dell'ipotesi sulla struttura tridimensionale del trasportatore, in cui tramite l'interazione di 5 eliche anfipatiche si forma un poro idrofilo, circondato da amminoacidi idrofobici che si posizionano nel *bilayer fosfolipidico*. Molte proprietà misurate sul GLUT1 sono applicabili a tutti gli altri membri della famiglia dei GLUTs, viste le loro simili caratteristiche strutturali. Il trasporto dello zucchero segue la semplice cinetica iperbolica di Michaelis-Menten, in varie condizioni sperimentali^[28].

Le altre isoforme comprendono il *GLUT2* che ha un'elevata K_M e si comporta come un sistema ad alta capacità di trasporto, per permettere un sostenuto flusso di glucosio. Si trova negli epatociti, nelle cellule β pancreatiche e nella membrana basolaterale delle cellule epiteliali intestinali e renali.

Il *GLUT3* è l'isoforma responsabile dell'ingresso del glucosio nei neuroni, ha una bassa K_M ed alta affinità per il glucosio, in modo da operare efficacemente anche a basse concentrazioni dello zucchero, per assicurare sempre ai neuroni questa fonte di energia.

Il *GLUT4* è localizzato in tessuti insulino-sensibili, come quello adiposo e muscolare, in cui come risposta all'insulina si ha un aumento del trasporto del glucosio. In queste cellule c'è un equilibrio tra processi di endocitosi ed esocitosi delle membrane ad alta concentrazione di *GLUT4*, presenti nell'apparato del Golgi. In condizioni basali questo equilibrio è spostato verso il fenomeno dell'endocitosi, permettendo l'accumulo del *carrier* su queste membrane; in seguito ad uno stimolo insulinico, invece, prevale la via esocitotica, con conseguente aumento del *GLUT4* sulla membrana plasmatica per la fusione con essa delle vescicole di esocitosi. Questa isoforma è coinvolta nell'omeostasi del glucosio nell'organismo, permettendo l'aumento dei livelli di glucosio nello stato postprandiale.

Il *GLUT5* è un trasportatore del fruttosio presente nella membrana apicale delle cellule epiteliali intestinali per l'assorbimento di questo zucchero dalla dieta e negli spermatozoi che, invece lo utilizzano nel fluido seminale.

Il *GLUT7* si trova sulla membrana del Reticolo Endoplasmatico (RE) e regola il flusso di glucosio libero che esce dal lume del RE in seguito all'azione della glucosio-6-fosfatasi, enzima che defosforila il glucosio-6-fosfato.

La **Tabella 1** riassume le varie isoforme, la loro distribuzione e le loro proprietà cinetiche nei confronti del D-Glucosio, del D-Galattosio e del D-Fruttosio^[29]. Si evince che il *GLUT1* e il *GLUT 3* sono in grado di trasportare con alta affinità sia il D-glucosio che il D-galattosio, questa è una caratteristica molto utile nella progettazione di profarmaci sia glicosilati che galattosilati, anche se l'utilizzo del D-galattosio come

vettore ci permette di evitare un'eccessiva somministrazione di D-glucosio. Inoltre, grazie alla sua alta capacità di trasporto il *GLUT1* può essere sfruttato per superare il problema dell'elevata lipofilia della BEE che spesso impedisce l'ingresso di importanti farmaci nel SNC, ma anche per direzionare farmaci antitumorali selettivamente a livello delle cellule tumorali che esprimono un maggior numero di *GLUT1*, riducendo gli effetti collaterali derivanti da una terapia antineoplastica^[30]. Il *GLUT3*, infine, può essere sfruttato per aumentare la concentrazione di profarmaci galattosilati all'interno delle cellule neuronali.

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

Tab. 1 *Isoforme dei GLUTs.*

SCOPO DEL LAVORO

Nel mio progetto di dottorato mi sono occupato della sintesi di profarmaci galattosilati dei FANS, dei relativi studi farmacologici, effettuati presso il Dipartimento di Farmacia “Federico II” di Napoli, e valutata la loro stabilità chimica ed enzimatica presso il Dipartimento di Chimica e Farmacia dell’Università di Sassari. Ho svolto anche un periodo di dottorato all’estero presso la Facoltà di Farmacia della Monash University di Melbourne in Australia, dove mi sono occupato dalla sintesi e dello studio del trasporto linfatico dei profarmaci dell’acido micofenolico utilizzando come vettore il digliceride 1,3-dipalmitato legato al *parent drug* attraverso vari linker.

La sintesi dei profarmaci galattosilati è stata condotta adoperando, ove possibile, i liquidi ionici. Le molecole neo sintetizzate dell’indometacina (Indogal), acido mefenamico (Mefegal), ibuprofene (Ibugal), flurbiprofene (Flugal), ketoprofene (Okigal) e diclofenac (Diclogal) sono state sottoposte a prove di stabilità chimica ed enzimatica e valutati i loro profili farmacologici e tossicologici.

Per gli studi di stabilità chimica i profarmaci sono stati sciolti in soluzioni a pH=1 in modo da mimare l’ambiente a livello gastrico e a pH=7.4 per valutare la loro maneggevolezza in soluzioni fisiologiche; mentre per la stabilità enzimatica sono stati sciolti in plasma umano.

Per valutare l’attività anti-infiammatoria e analgesica, i profarmaci sono stati sottoposti al test dell’edema da carragenina ed al writhing test rispettivamente e per valutarne il profilo tossicologico, il test dell’ulcerogenicità.

Esperienza all'estero

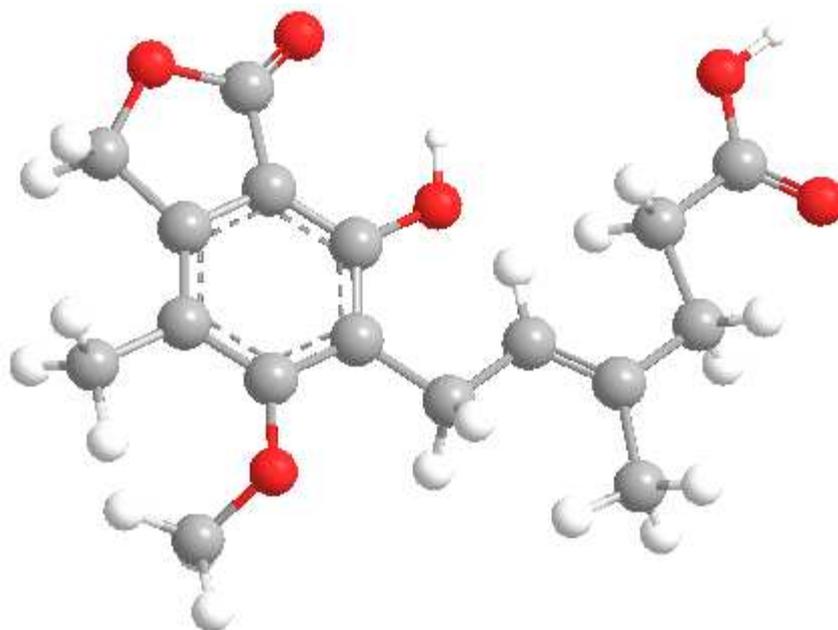
Durante il mio soggiorno in Australia mi sono occupato anche della sintesi di profarmaci dell'acido micofenolico.

Lo scopo del progetto è stato aumentare la concentrazione di acido micofenolico, un immunosoppressore, nei vasi linfatici in particolare nei linfociti, numerosi in tale distretto.

Per la realizzazione di tale progetto lo studio si è focalizzato sul di gliceride 1,3-dipalmitato come vettore legato all'acido micofenolico mediante l'utilizzo di diversi spacer.

Acido micofenolico

L'acido micofenolico è un potente immunosoppressore, derivato dal *Penicillium stoloniferum*, che ha un'attività inibente sulla inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH), un enzima citoplasmatico coinvolto nella biosintesi delle purine più specificatamente per il primo step di sintesi delle guanine. Questo processo è importante per la fase di mitogenesi dei linfociti.



L'acido micofenolico ha una bassa biodisponibilità dopo somministrazione orale (<40%). Il suo basso coefficiente di ripartizione e/o la sua bassa solubilità non spiegano con esattezza la sua bassa biodisponibilità. Comparando la solubilità intrinseca, il pK_a e il coefficiente di ripartizione oltre il range di valori di pH dell'acido micofenolico con quelli del naprossene, un composto con ottima biodisponibilità, si è riscontrato avere proprietà quasi identiche. Quindi questa diversa biodisponibilità è dovuta ad altri fattori come ad esempio la complessazione nel tratto gastrointestinale^[1].

Trasporto linfatico intestinale

Il tratto gastrointestinale è ricco di vasi sanguigni e linfatici e i materiali che sono assorbiti dalle cellule epiteliali (enterociti) possono potenzialmente essere assorbiti da entrambi i capillari. La maggior parte del cibo assorbito è trasportato nel sangue perché il flusso sanguigno è circa 500 volte maggiore del flusso linfatico a livello intestinale. La diffusione nell'endotelio capillare è limitata, infatti molecole ad alto peso molecolare

o materiali colloidali, sono selettivamente trasportati nella linfa intestinale, ciò dovuto al fatto che l'architettura dei capillari linfatici è più permeabile rispetto ai vicini capillari sanguigni. Dopo l'ingestione, il percorso di assorbimento dei trigliceridi (TG) inizia nel tratto gastrointestinale (GI) dove vengono idrolizzati dalle lipasi digestive nel lume gastrointestinale rilasciando 2-monogliceride (2-MG) e acidi grassi (AG) e successivamente assorbiti dagli enterociti. All'interno degli enterociti TG possono essere riassorbiti seguendo due percorsi; il percorso 2-monogliceride (2-MG) localizzato sul reticolo endoplasmatico liscio (SER) o il percorso glicerol-fosfato (G3P) localizzato sul reticolo endoplasmatico ruvido (RER) (Fig.12).

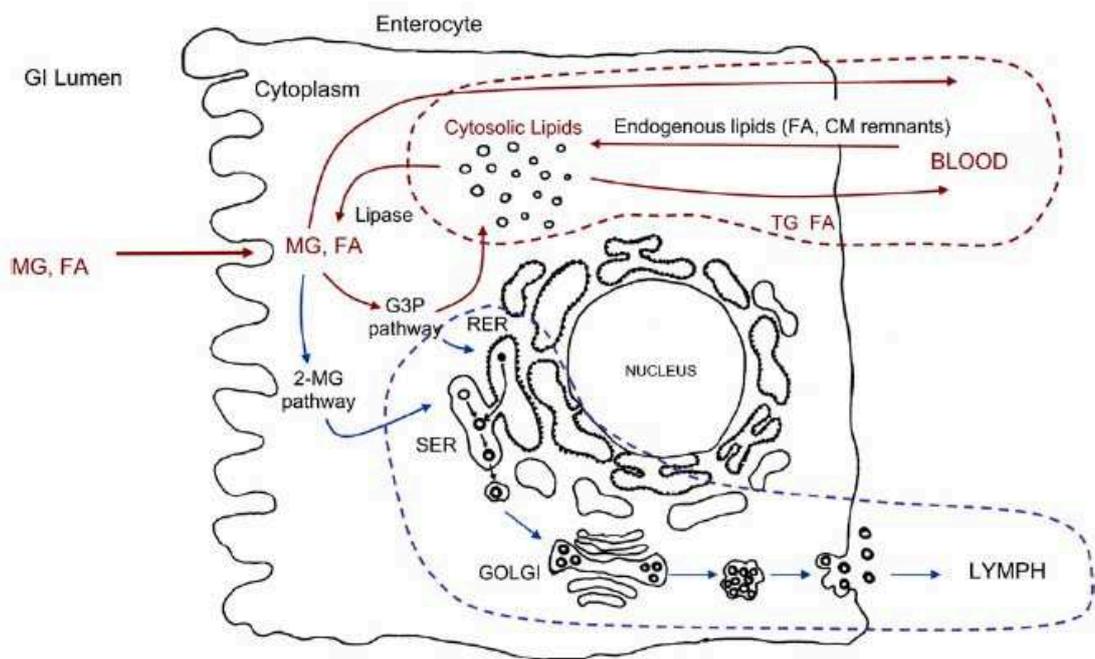


Fig.12 Meccanismo di assorbimento dei trigliceridi.

L'assemblaggio dei TG porta alla formazione del core delle lipoproteine (LPs). LPs sono successivamente esocitate dalla parte basolaterale degli enterociti nella lamina propria sottostante. Da qui l'accesso ai capillari

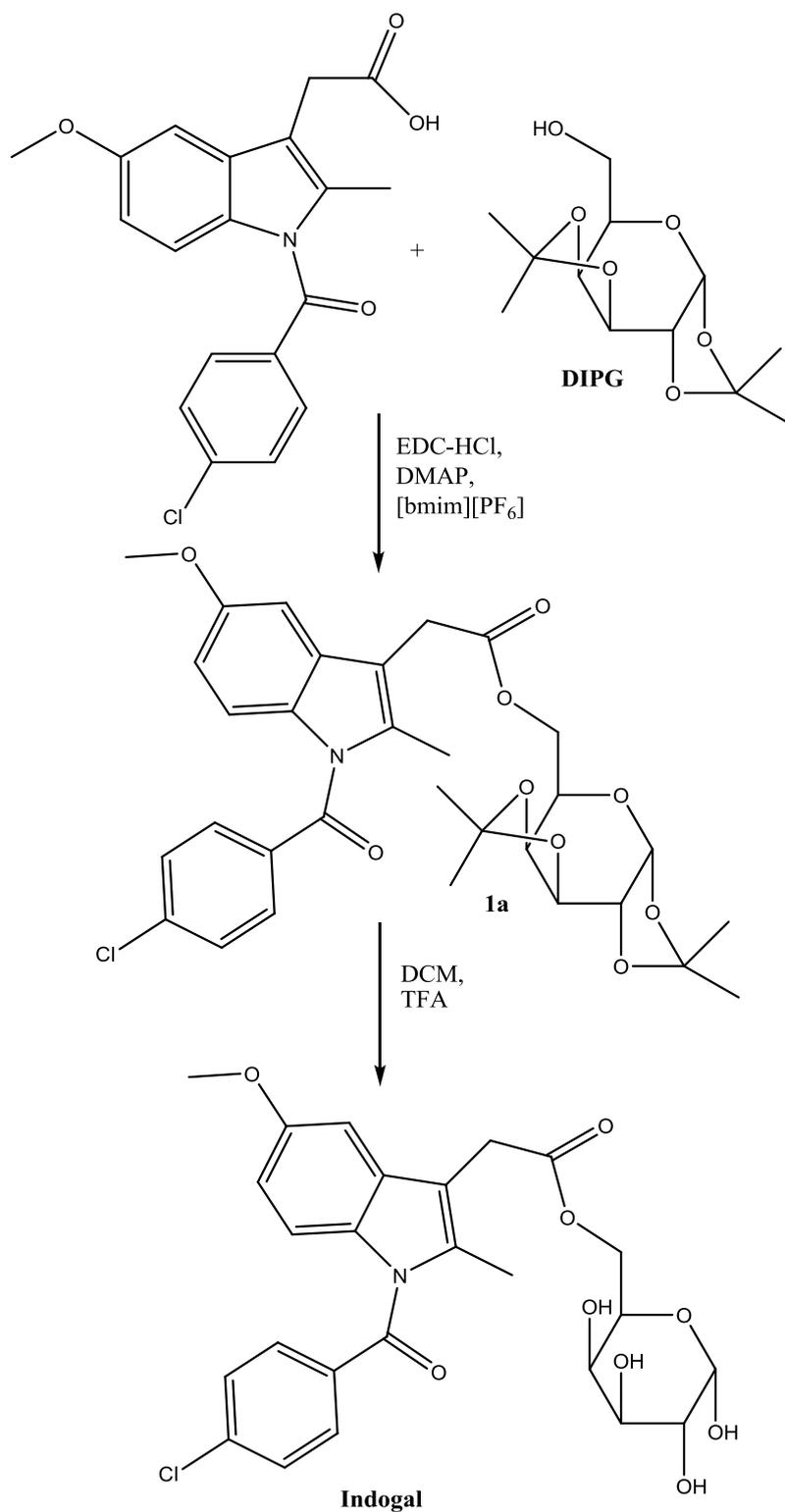
sanguigni è limitato dalle caratteristiche della barriera dell'endotelio vascolare. Infatti, le LPs accedono facilmente alla microlinfa intestinale, tramite enormi spazi inter-endoteliali e potenzialmente attraverso percorsi di trasporto attivo transcellulare. Gli acidi grassi a lunga catena (14 o più) sono ampiamente trasportati nella linfa (~40–60% dei lipidi è trasportato nella circolazione sistemica tramite la linfa intestinale, la restante parte attraverso la vena porta), mentre gli acidi grassi a corta catena, i quali sono più solubili in acqua, sono assorbiti via vena porta. Quindi acidi grassi a lunga catena e trigliceridi composti da acidi grassi a lunga catena possono più facilmente supportare i farmaci nel trasporto linfatico^[31].

RISULTATI

Sintesi Indogal

L'Indogal viene sintetizzato esterificando il gruppo carbossilico dell'indometacina con l'ossidrile in posizione 6' del galattosio. Per questa reazione è stato utilizzato l'1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-*D*- α -galattopiranosio (**DIPG**), in cui le quattro funzioni ossidriliche non interessate alla reazione sono protette dai chetali.

La reazione di esterificazione tra l'indometacina e il DIPG è stata condotta in presenza di *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimide cloridrato (EDC-HCl), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), come catalizzatore, in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]). Il coniugato protetto **1a** ottenuto, con una resa del 56%, è stato trattato con acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro per la rimozione dei chetali, in modo da ottenere l'**Indogal**, con una resa del 55.4% (**Schema 1**).

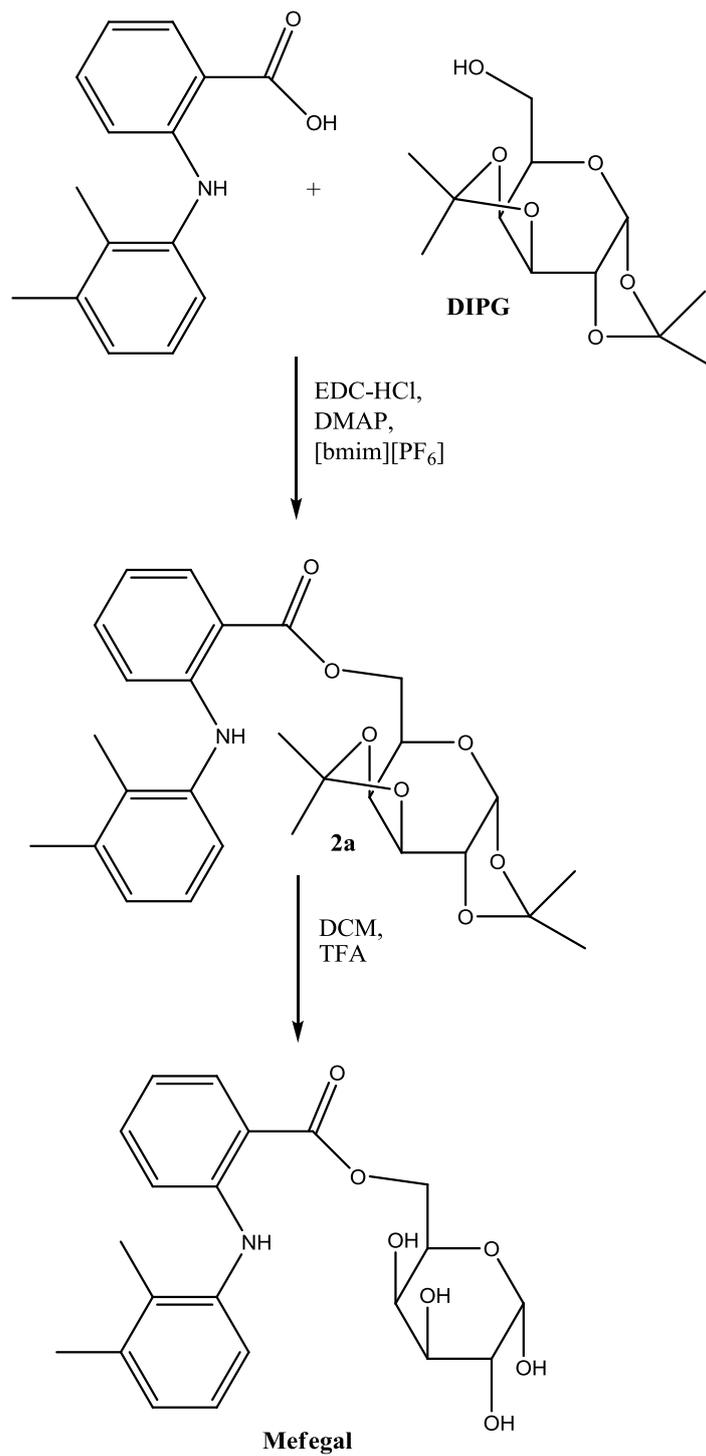


Schema 1

Sintesi Mefegal

Il Mefegal è stato sintetizzato tramite una reazione di condensazione tra la funzione carbossilica dell'acido mefenamico e l'ossidrile in posizione 6' dell'1,2,3,4-di-*O*-isopropilidene-D- α -galattopiranosio (**DIPG**).

La reazione è stata condotta in presenza di *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimide cloridrato (EDC-HCl), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP), come catalizzatore, in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]). Il coniugato protetto **2a** ottenuto, con una resa del 63%, è stato trattato con acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, per la rimozione dei chetali ottenendo così il **Mefegal**, con una resa del 53% (**Schema 2**).



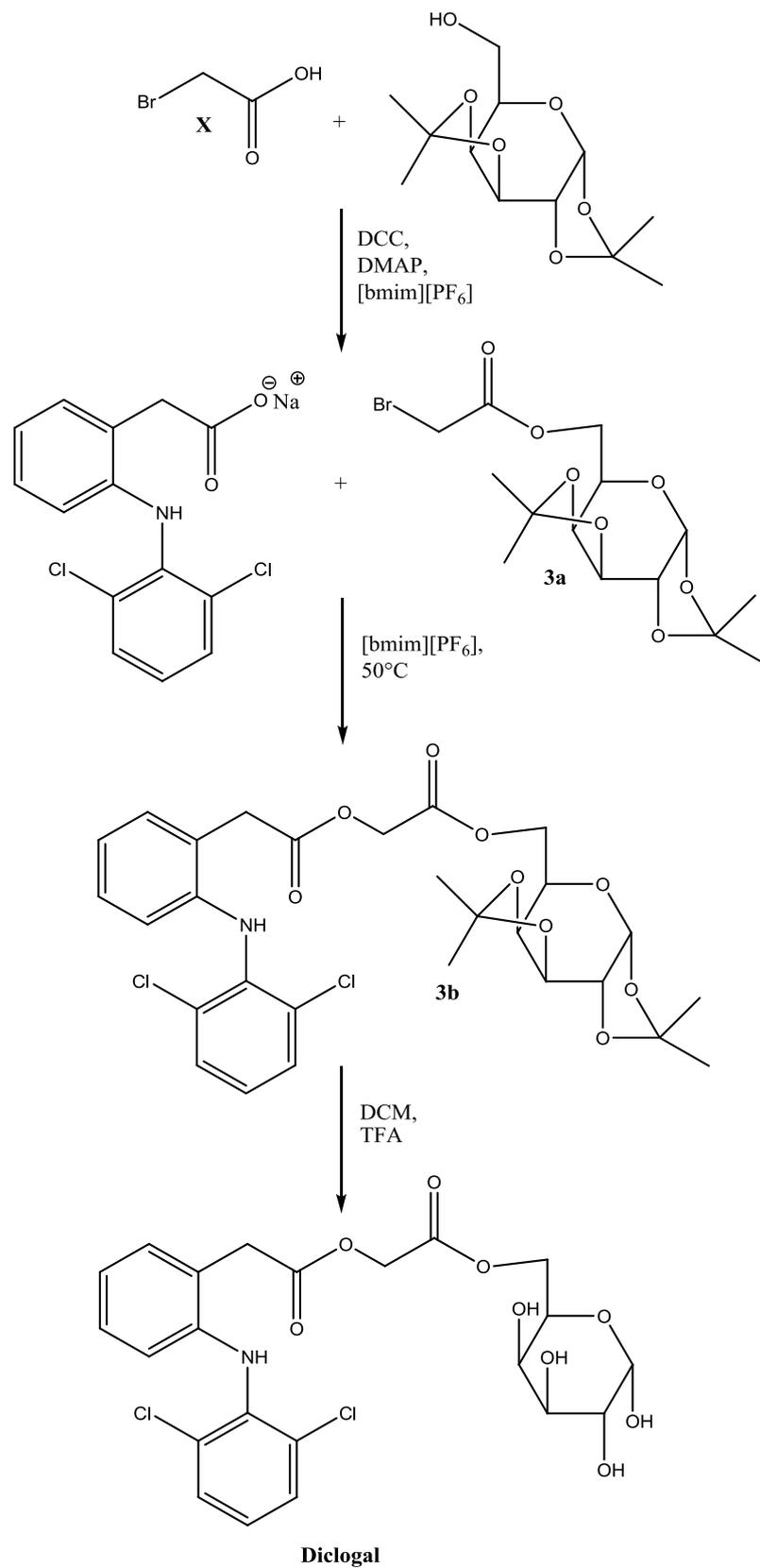
Schema 2

Sintesi Diclogal

La sintesi del Diclogal inizia dalla reazione di condensazione tra la funzione carbossilica dell'acido 2-bromo-acetico (**X**) e 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- α -galattopiranosio (**DIPG**) in presenza di dicitcloesilcarbodimmide (DCC), come agente condensante, 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP), come catalizzatore, tutto sciolto in 1-butyl-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]). La resa di questo step risulta essere del 59%.

Il prodotto ottenuto **3a** reagisce tutta la notte con il Diclofenac sodico in 1-butyl-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]) alla temperatura di 50°C. La resa in questo caso è del 73%.

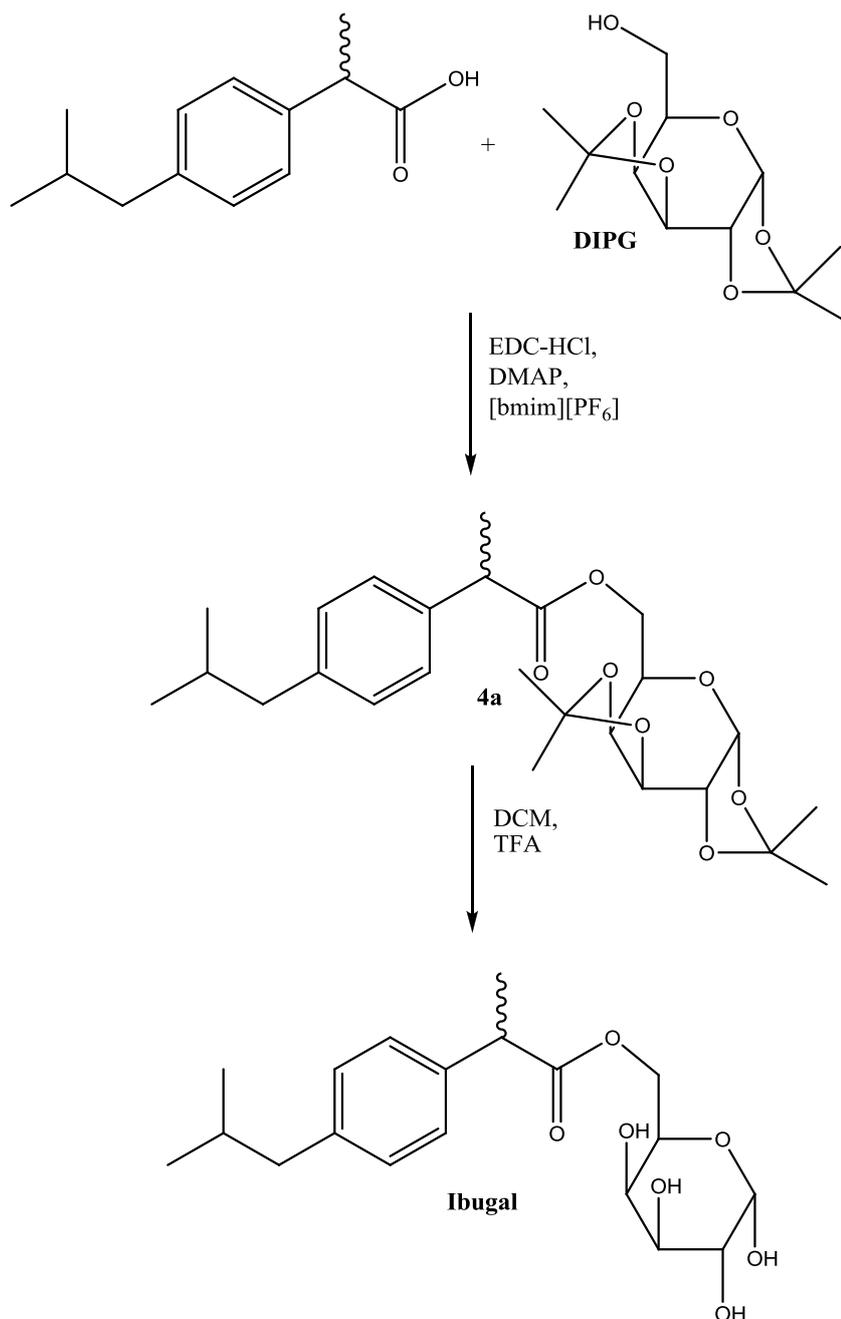
L'ultimo step di reazione è il trattamento della molecola **3b** con acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, in modo da ottenere il nostro profarmaco galattosilato **Diclogal** con una resa del 38%(**Schema 3**).



Schema 3

Sintesi Ibugal

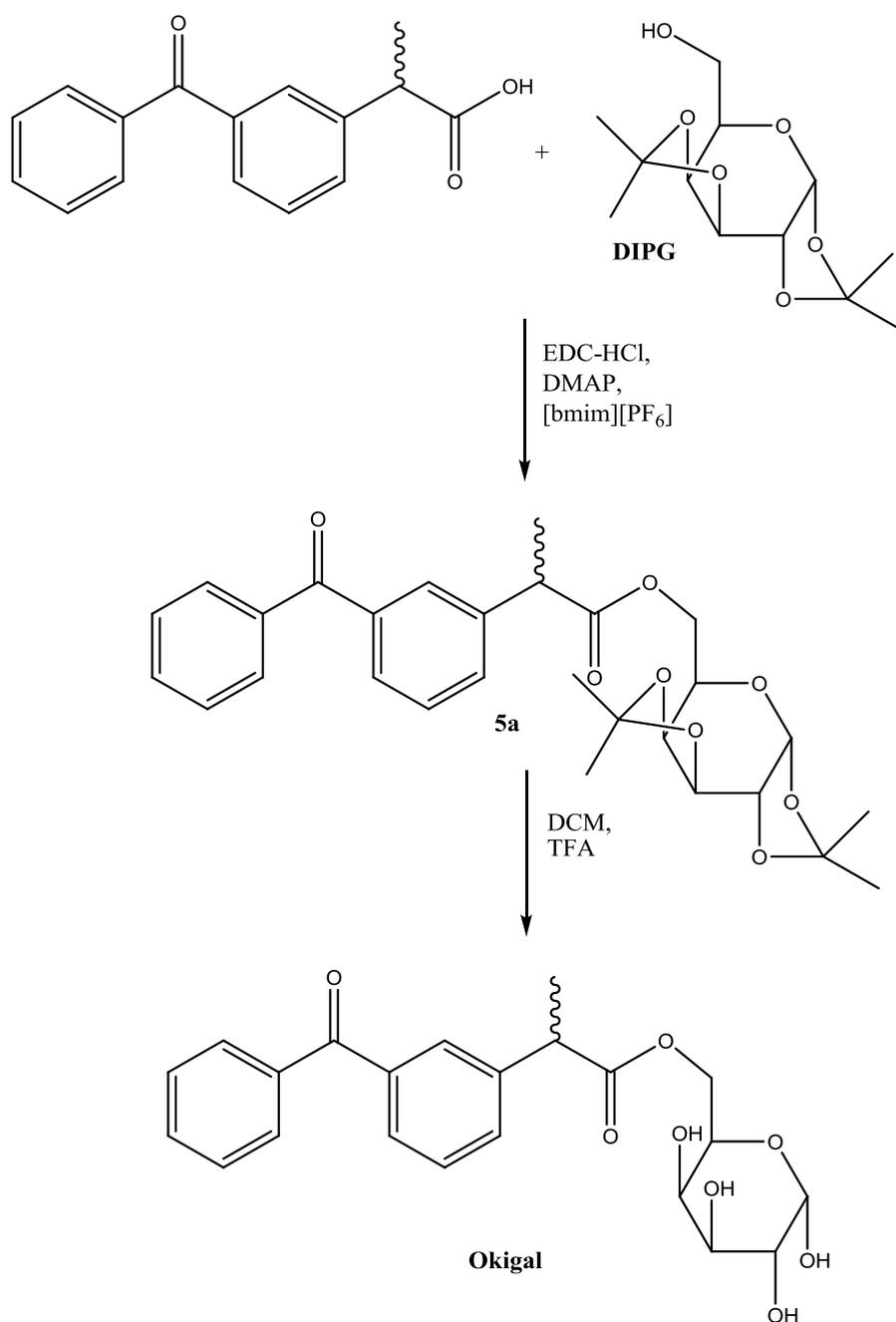
Il profarmaco è stato ottenuto facendo prima reagire l'Ibuprofene con il DIPG in presenza di *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimide cloridrato (EDC-HCl), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), come catalizzatore, in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]). Successivamente il coniugato protetto **4a** ottenuto, con una resa del 58%, è stato trattato con acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, ottenendo così l'**Ibugal**, con una resa del 53% (**Schema 4**).



Schema 4

Sintesi Okigal

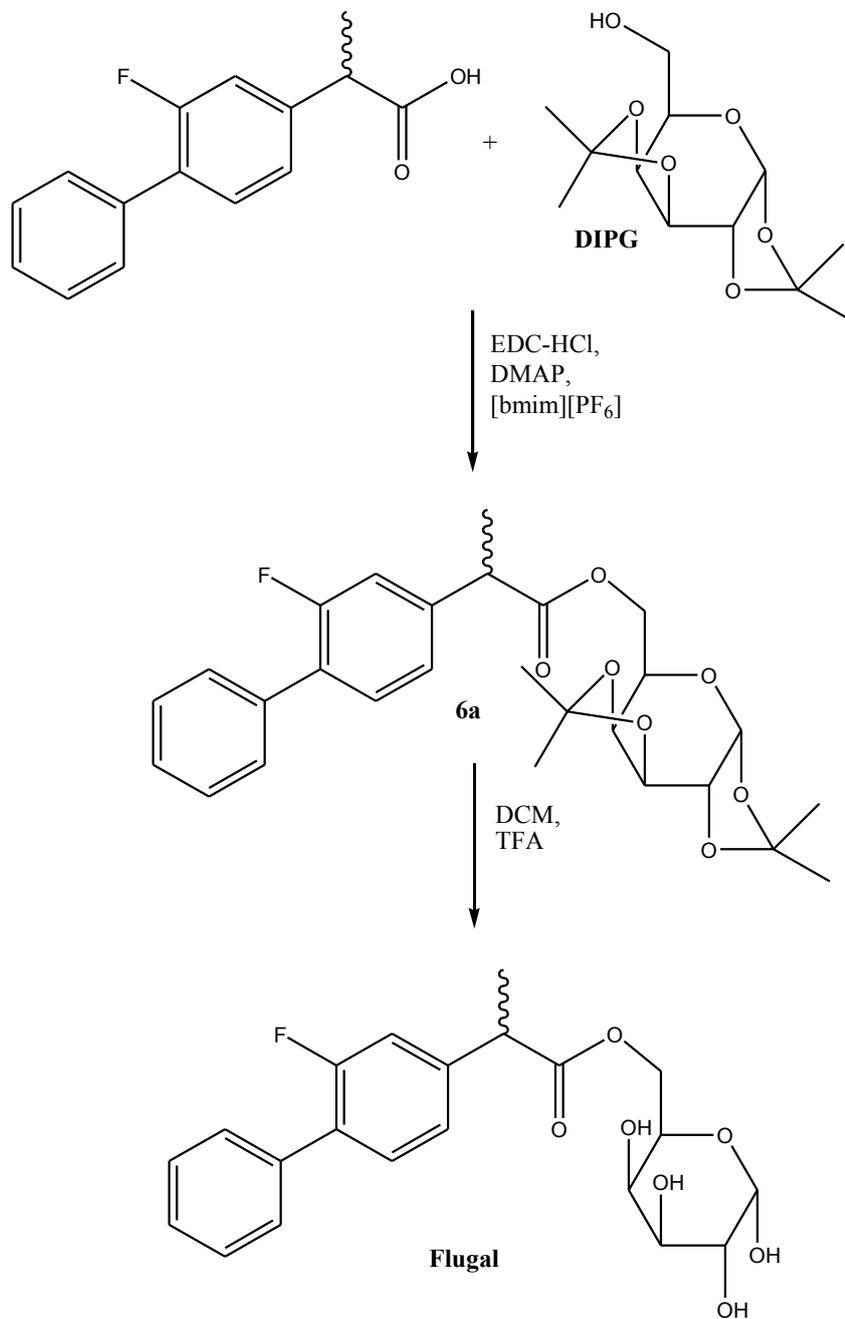
Per l'Okigal il primo step di reazione è l'esterificazione tra il Ketoprofene e il DIPG in presenza di *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimide cloridrato (EDC-HCl), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP), come catalizzatore, in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]). Il coniugato protetto **5a**, che presenta una resa del 72%, è trattato con acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, per rimuovere i gruppi protettori ottenendo l'Okigal, con una resa del 55% (**Schema 5**).



Schema 5

Sintesi Flugal

Anche per la sintesi del Flugal si è utilizzato il DIPG che reagendo con il flurbiprofene in presenza di *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimide cloridrato (EDC-HCl), come agente condensante, e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP), come catalizzatore, in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]) si ottiene il coniugato protetto **6a** con una resa del 70%. I chetali vengono completamente rimossi mediante acido trifluoroacetico (TFA), in diclorometano anidro, in modo da ottenere il **Flugal**, con una resa del 53% (**Schema 6**).



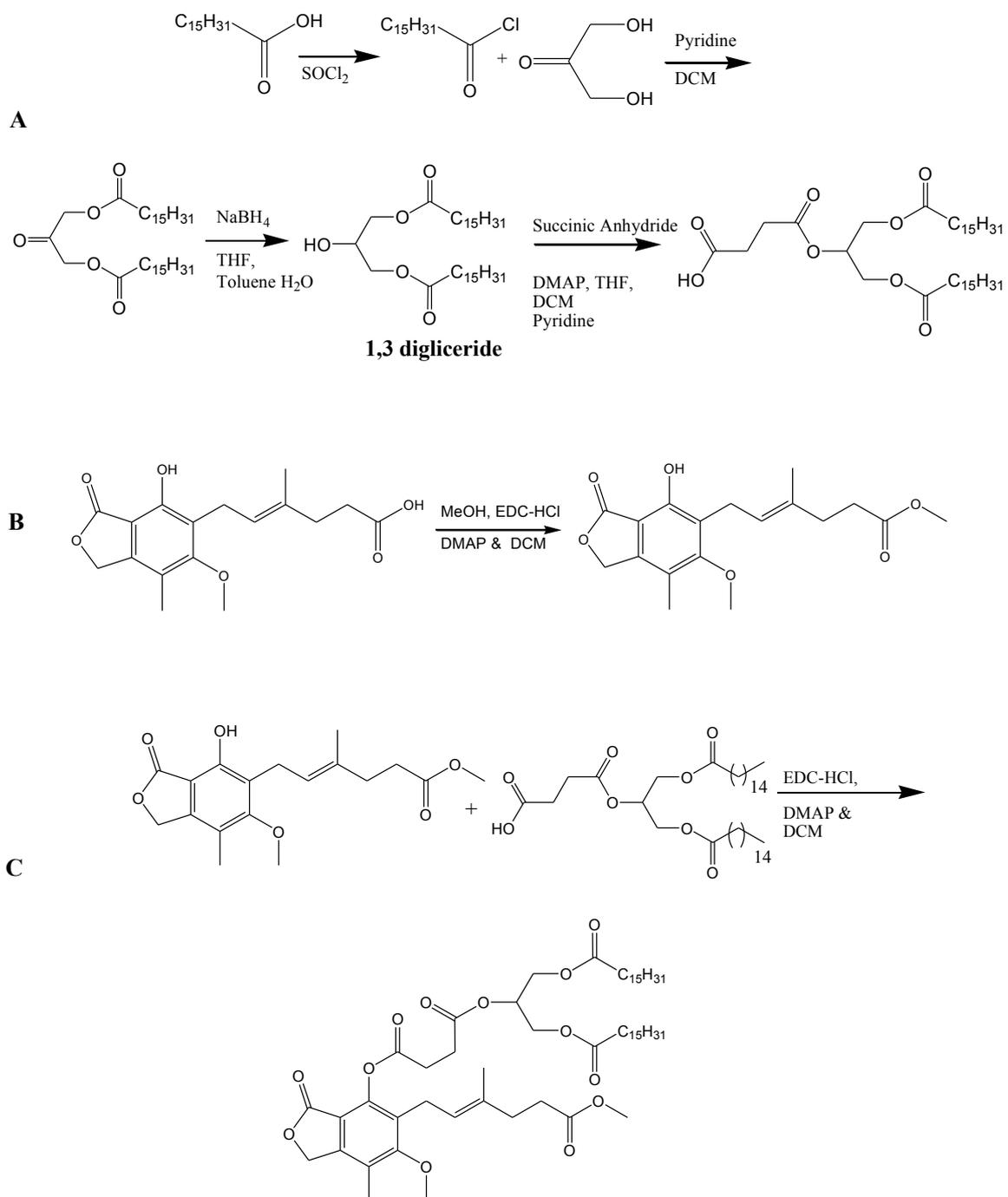
Schema 6

Sintesi Metil 8-(2-succinildigliceride)-micofenolato

In primo luogo, per la sintesi del Metil 8-(2-succinildigliceride)-micofenolato, è necessario preparare l'1,3-digliceride che si ottiene aumentando la reattività dell'acido palmitico mediante l'ausilio del cloruro di tionile che lo trasforma in cloruro di palmitoile con una resa del 91%. Grazie alla sua aumentata reattività reagisce con il dimero del 1,3-idrossiacetone sciolto in diclorometano in presenza di dimetilformammide. Il risultato di tale reazione, con una resa del 64%, è l'acetone 1,3-dipalmitato di cui la funzione chetonica è stata successivamente ridotta ad alcol mediante NaBH₄ tetraidrofurano, acqua e toluene, ottenendo così l'1,3-digliceride con una resa del 42%. L'1,3-digliceride preparato può reagire con l'anidride succinica in presenza di piridina, dimetilamminopiridina utilizzando come solvente il diclorometano per ottenere il 2-succinildigliceride la cui resa è del 49%(A).

A parte è stato sintetizzato il metilmicofenolato facendo reagire l'acido micofenolico con metanolo in presenza di diclorometano, 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) ed *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimide cloridrato (EDC-HCl) la resa è stata del 45% (B).

In ultimo il metilmicofenolato ha reagito con il 2-succinildigliceride in presenza di *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimide cloridrato (EDC-HCl) e 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) sciolti in diclorometano per ottenere così Metil 8-(2-succinildigliceride)-micofenolato la cui resa è del 42% (C)(Schema 7).

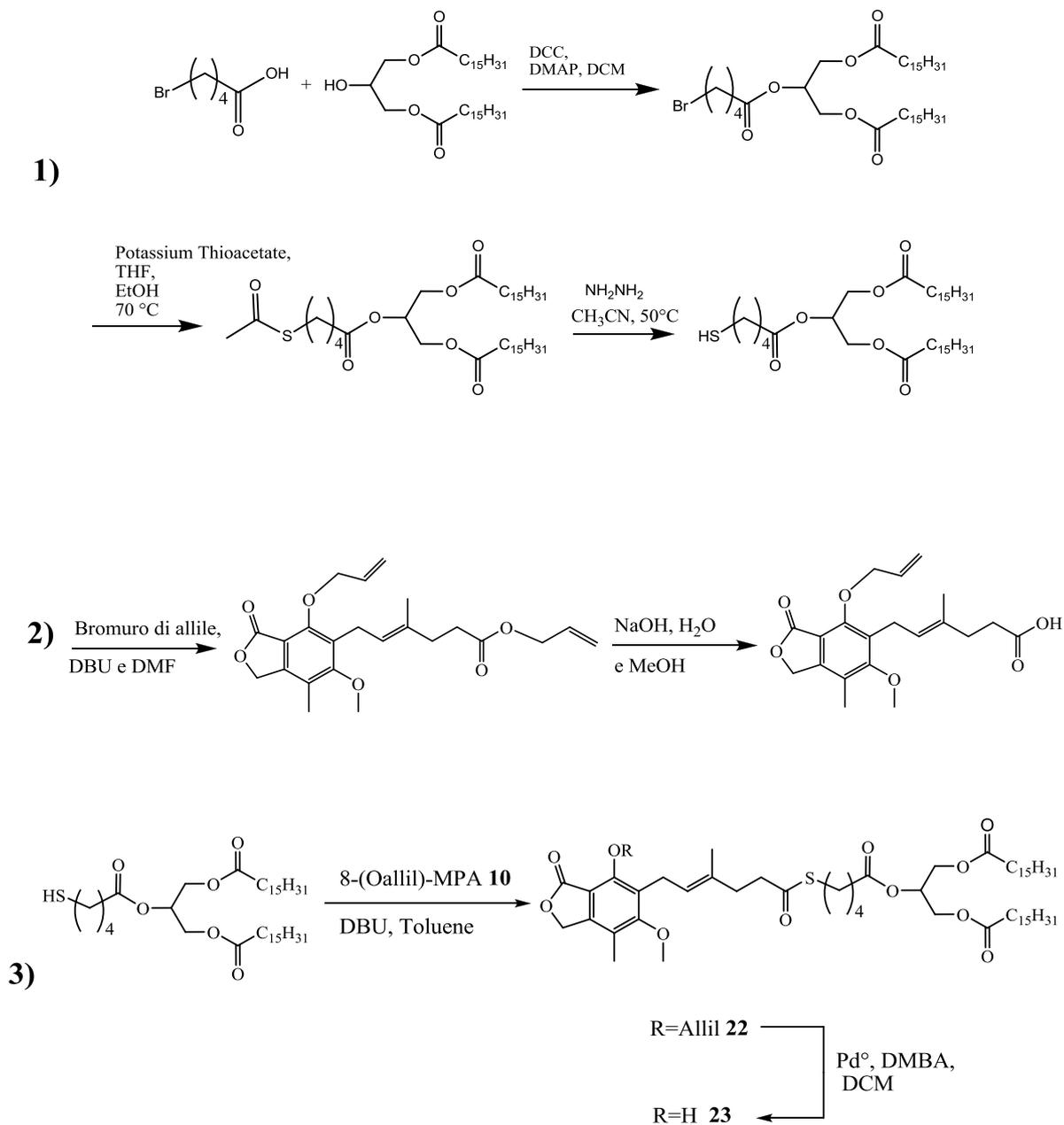


Schema 7

Sintesi 5-tiovaleratodigliceride micofenolato

Per la sintesi del 5-tiovaleratodigliceride micofenolato è necessario l'1,3-digliceride che, ottenuto mediante il processo sintetico presente in **A**, reagisce con l'acido 5-bromovalerico in diclorometano in presenza di *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimide cloridrato (EDC-HCl) e 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) in modo da ottenere il 2-(5-bromovalerato)-digliceride con una resa del 37%. Il prodotto ottenuto reagisce, a riflusso, con il tiocianato di potassio in etanolo e tetraidrofurano ottenendo il 2-(5-acetiltiovalerato)-digliceride con una resa del 90%. Successivamente il prodotto è sottoposto a deacetilazione mediante idrazina in acetonitrile a 50°C ottenendo il 2-(5-tiovalerato)-digliceride con una resa del 82% (**1**). A parte è stato sintetizzato 8-(Oallil)-micofenolato partendo dall'acido micofenolico che reagisce con il bromuro di allile in 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) e dimetilammina dando l'acido micofenolico protetto sulla funzione carbossilica e fenolica con una resa del 93%, di seguito il trattamento con NaOH in acqua e metanolo libera la funzione carbossilica la resa in questo caso è dell'83% (**2**).

8-(Oallil)-micofenolato e il 2-(5-tiovalerato)-digliceride reagiscono in diclorometano in presenza di *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etil-carbodiimide cloridrato (EDC-HCl) e 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) in modo da ottenere 5-tiovaleratodigliceride 8-(Oallil)-micofenolato con una resa del 42%, che successivamente viene trattato con il palladio in diclorometano e DMBA per ottenere così il profarmaco 5-tiovaleratodigliceride micofenolato con una resa del 95% (**3**) (**Schema 8**).



Schema 8

Stabilità chimica ed enzimatica dei profarmaci galattosilati

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

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

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

La stabilità chimica è stata misurata sciogliendo il profarmaco in un tampone fosfato a pH 7.4 e a pH 1. In quest'ultimo caso viene valutata la stabilità a tale pH per verificare la possibilità di proteggere la funzione acida del farmaco per ridurre la sua azione tossica diretta. Le due soluzioni sono state mantenute al buio, alla temperatura di 37°C, per 24 ore. Ogni ora è stata prelevata un'aliquota da una delle due soluzioni ed analizzata all'HPLC con rivelatore a diodi. L'emivita chimica del profarmaci è stata calcolata misurando la sua scomparsa dalle soluzioni in esame ed è superiore alle 8 ore. La stabilità enzimatica è stata misurata incubando i profarmaci nel plasma umano. Come per la stabilità chimica, ogni ora è stata prelevata un'aliquota ed analizzata mediante HPLC.

Dai risultati ottenuti, mostrati nella **Tabella 2**, si può prevedere per le molecole neosintetizzate una buona stabilità, che ne permette anche la somministrazione per via orale. In tal modo i profarmaci non saranno liberati a livello gastrico, causando i classici effetti collaterali, e potranno espletare la loro azione farmacologica una volta raggiunto il circolo sanguigno.

Composto	t _{1/2} (ore)		
	pH 7.4	pH 1	Plasma
Indogal	>8	>8	2
Mefegal	>8	>8	6
Diclogal	3	>8	1
Ibugal	>8	>8	1
Okigal	>8	>8	4
Flugal	>8	>8	1

Tab. 2 *Stabilità chimica ed enzimatica dei profarmaci galattosilati.*

Ulcerogenicità profarmaci galattosilati

Le lesioni gastriche sono state valutate in topi maschi Swiss. Agli animali a digiuno (16-18 h) sono stati somministrati per via orale un *parent drug* (10 mg/Kg), la dose equimolare del corrispettivo profarmaco o il veicolo. Dopo 4 ore, i topi sono stati sacrificati e lo stomaco prelevato, inciso lungo la grande curvatura, lavato con soluzione fisiologica e la mucosa esaminata per la valutazione della presenza di petecchie e/o lesioni gastriche. I punteggi delle lesioni gastriche sono stati assegnati in base le dimensioni dell'ulcera (Tabella 3).

Gastric Lesion Score	
0	= <i>no ulcera</i>
1	= <i>ulcera di 1-2 mm</i>
2	= <i>ulcera di 2-3 mm</i>
3	= <i>ulcera > di 3 mm</i>

Tab. 3 Gastric lesion score.

Lo studio dell'attività ulcerogena ha mostrato come tutti profarmaci presentano una ridotta tossicità gastrica (**Tabella 4**). A 4 ore tutti hanno una notevole riduzione dell'ulcerogenicità rispetto ai *parent drug*, ciò dovuto alla scomparsa del danno da contatto che si ha quando i FANS transitano nel tratto gastrointestinale dopo somministrazione per via orale. Invece a 48 ore anche i profarmaci presentano un'attività ulcerogena anche se inferiore o uguale a quella dei rispettivi farmaci. Questo lieve effetto ulcerogenico è dovuto al rilascio dei farmaci da parte dei profarmaci galattosilati, che andando ad inibire le COX-1, riduce la produzione delle prostagandine deputate all'inibizione della secrezione acida, svolgendo un'azione citoprotettiva.

Composto	Dose orale (mg/Kg)	Tossicità	
		4 h	48 h
Controllo (CMC 0.5%)	—	0	0
Indometacina	10	3	2
Indogal	14.6	0	1
Ac. mefenamico	10	2	0.5
Mefegal	16.7	0	1.5
Diclofenac	10	2	0.5
Diclogal	17,4	0	1.5
Ibuprofene	10	2	1.5
Ibugal	17,8	0	1.5
Ketoprofene	10	2.5	1.5
Okigal	16.4	1	1
Flurbiprofene	10	2	1.5
Flugal	16.6	0	0.5

Tab. 4 *Ulcerogenicità dei profarmaci confrontata con quella dei rispettivi parent drugs.*

Attività anti-infiammatoria profarmaci galattosilati

L'attività anti-infiammatoria è stata testata mediante il test dell'edema da carragenina. I topi sono stati divisi in gruppi da sei. I volumi iniziali della zampa di tutti gli animali sono stati misurati utilizzando un idropletismometro. L'edema viene indotto sulla zampa mediante iniezione sub plantare di 50 μ L di soluzione salina contenente l'1% di carragenina. Il volume della zampa è stato misurato a diversi intervalli di tempo. In tale modello sperimentale si sviluppano due fasi: una prima fase acuta di 6 ore ed una seconda fase cronica, fino a 96 ore.

Indogal

Il trattamento con Indometacina (10 mg/Kg) ha inibito in modo significativo la formazione dell'edema entro le 6 h dopo l'iniezione di carragenina. La dose equimolare di Indogal (14,6 mg/Kg), invece, non provoca nessuna modifica sull'edema nella prima fase (0-6 h), mentre produce un significativo effetto anti-infiammatorio durante la seconda fase (24-96 h) (Fig. 13).

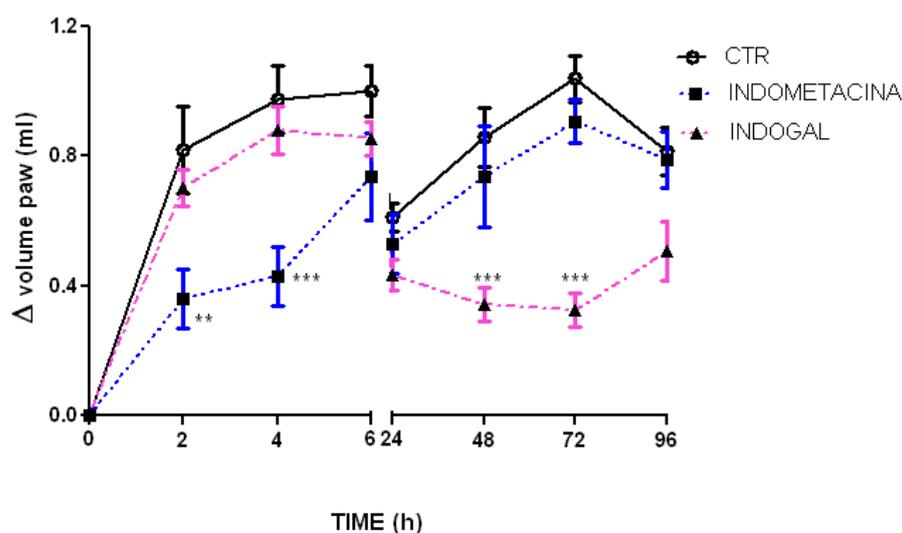


Fig. 13 Attività anti-infiammatoria Indogal.

Mefegal

Il trattamento con acido mefenamico (10 mg/Kg) ha inibito in modo significativo la formazione dell'edema entro le 6 h dopo l'iniezione di carragenina. La dose equimolare di mefegal (16,7 mg/Kg), invece, non provoca nessuna modifica sull'edema nella prima fase (0-6 h), mentre si ha la comparsa dell'effetto anti-infiammatorio durante la seconda fase (24-96 h) (Fig. 14).

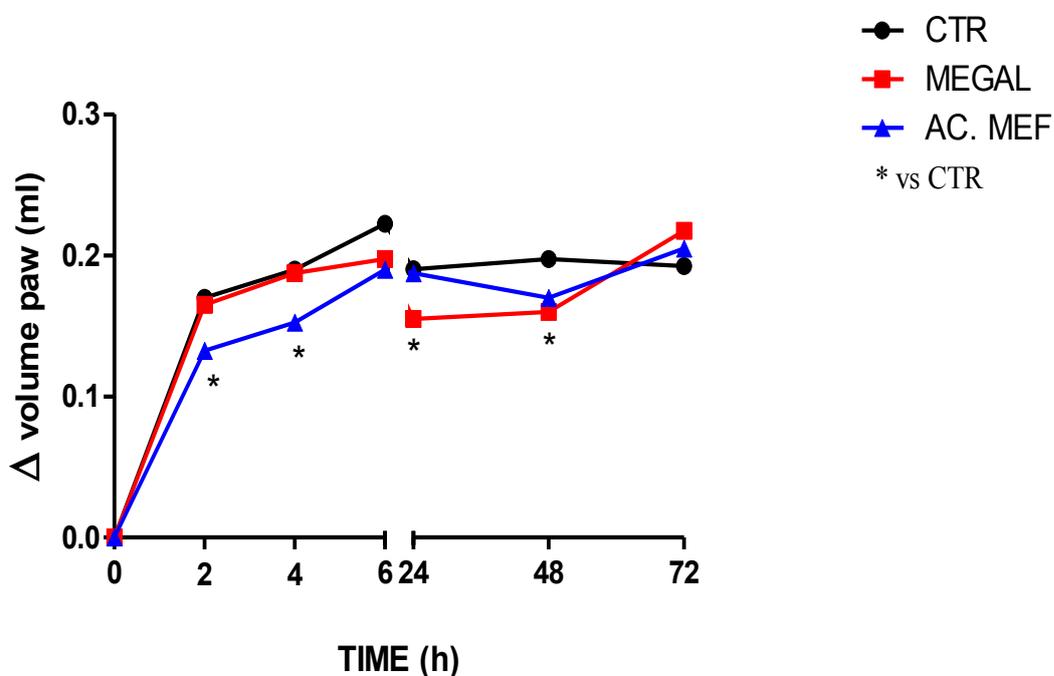


Fig. 14 *Attività anti-infiammatoria Mefegal.*

Ibugal

Il trattamento con Ibuprofene (10 mg/Kg) ha inibito in modo significativo la formazione dell'edema entro le 48 h dopo l'iniezione di carragenina. La dose equimolare di Ibugal (17.9 mg/Kg), invece, non provoca nessuna modifica sull'edema nella prima fase (0-6 h), mentre produce un significativo effetto anti-infiammatorio durante la seconda fase (24-96 h). (Fig. 15).

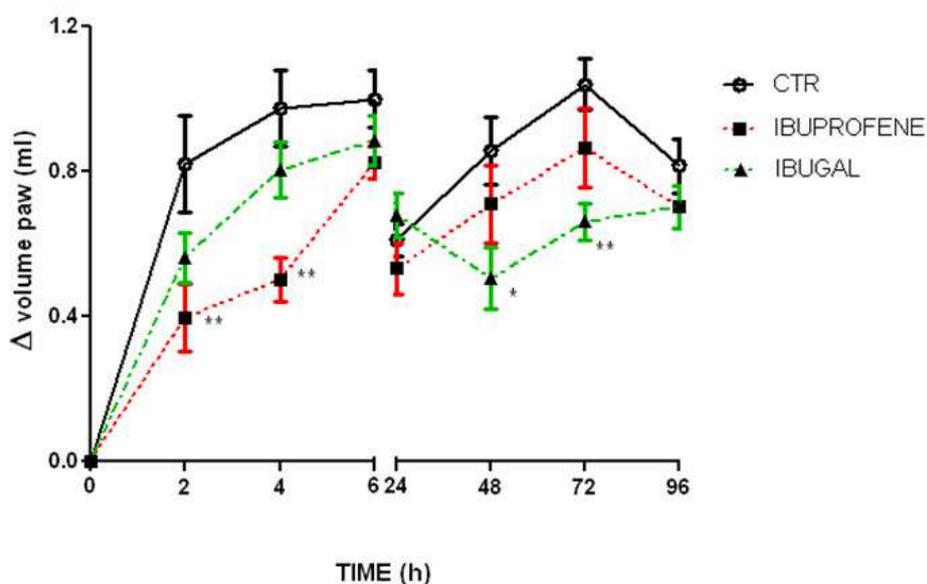


Fig. 15 *Attività anti-infiammatoria Ibugal.*

Okigal

Il trattamento con Ketoprofene (10 mg/Kg) ha inibito in modo significativo la formazione dell'edema entro le 48 h dopo l'iniezione di carragenina. La dose equimolare di Okigal (16.4 mg/Kg), invece, ha solo una moderata azione sull'edema nella prima fase (0-6 h), mentre produce un significativo effetto anti-infiammatorio durante la seconda fase (24-96 h) (**Fig. 16**).

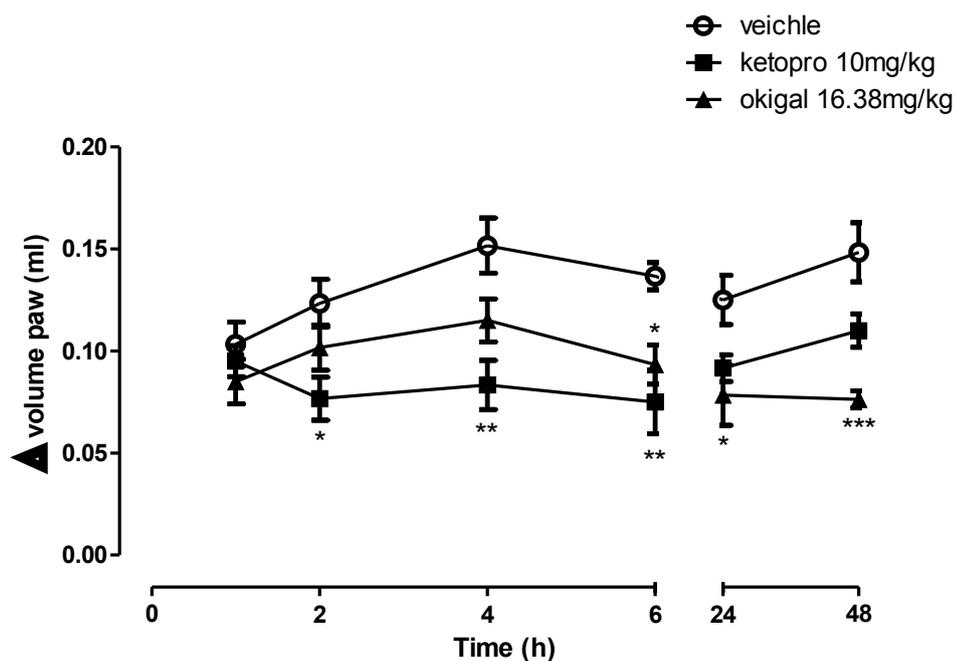


Fig. 16 Attività anti-infiammatoria Okigal.

Flugal

Il trattamento con Flurbiprofene (10 mg/Kg) ha inibito in modo significativo la formazione dell'edema entro le 48 h dopo l'iniezione di carragenina. La dose equimolare di Flugal (16.6 mg/Kg), invece, non provoca nessuna modifica sull'edema nella prima fase (0-6 h), mentre produce un significativo effetto anti-infiammatorio durante la seconda fase (24-96 h) (**Fig. 19**). Il Flugal ha quindi dimostrato di non avere di per sé un'attività anti-infiammatoria, in quanto non agisce sulla prima fase, ma è in grado di rilasciare nel tempo il farmaco attivo, prolungandone la durata d'azione.

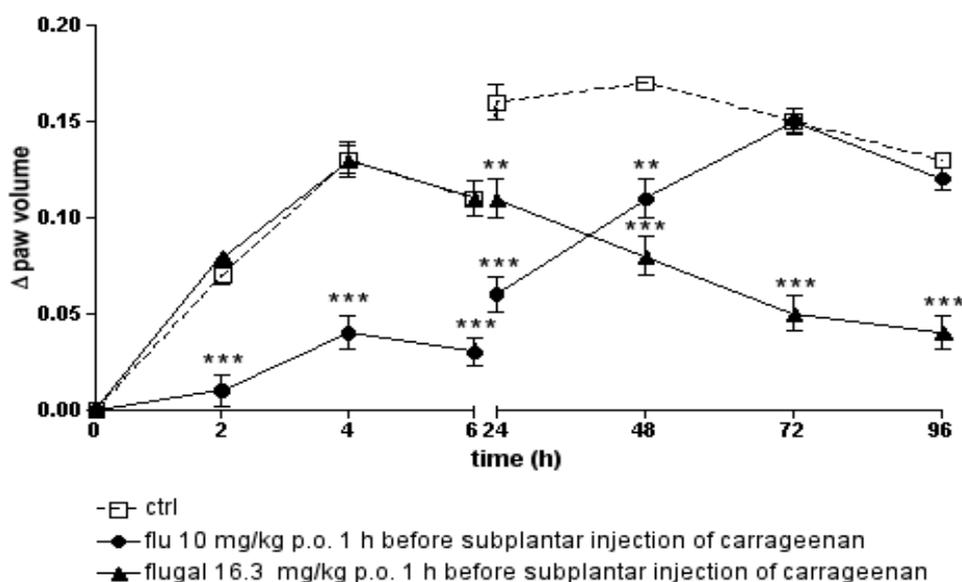


Fig. 17 *Attività anti-infiammatoria Flugal.*

Attività analgesica profarmaci galattosilati

L'attività analgesica è stata studiata utilizzando il "writhing test" da acido acetico. Ai topi è somministrato per via intraperitoneale 1 mL di soluzione all'1% di acido acetico ed il numero di stiramenti è valutato per 20 min, dopo 5 minuti dalla somministrazione della soluzione di acido acetico intraperitoneale. Uno stiramento è definito come una contrazione dei muscoli addominali accompagnata dall'allungamento del corpo e delle zampe posteriori. I *parent drugs* ed i loro rispettivi profarmaci sono stati somministrati per via orale 60 minuti prima della somministrazione della soluzione di acido acetico. L'effetto analgesico è espresso in numero di stiramenti rispetto al controllo. A due ore (Fig. 18) i profarmaci non presentano attività analgesica.

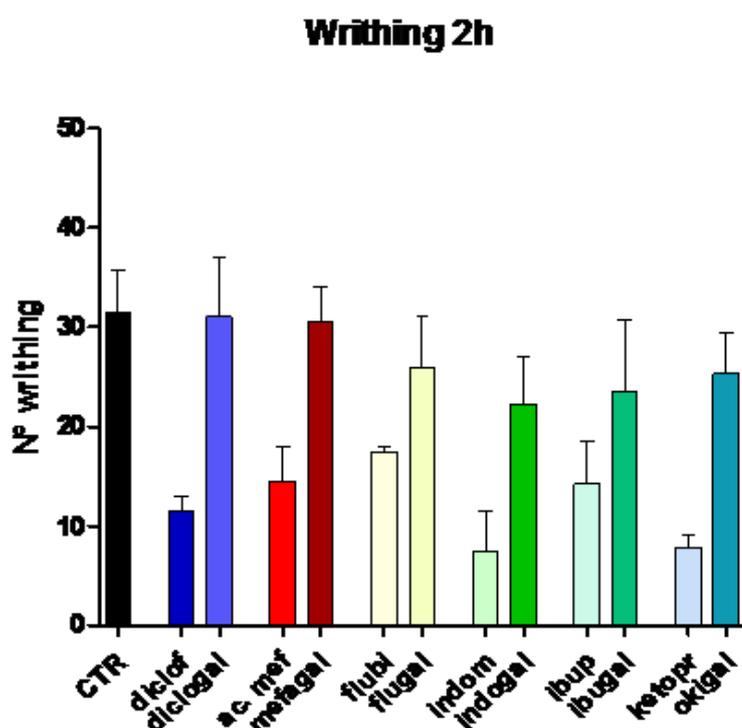


Fig. 18 Attività analgesica profarmaci a 2h.

A 48 ore (Fig.19) tutti i profarmaci presentano un'ottima attività analgesica soprattutto per il Mefegal (acido mefenamico) e Indogal (indometacina).

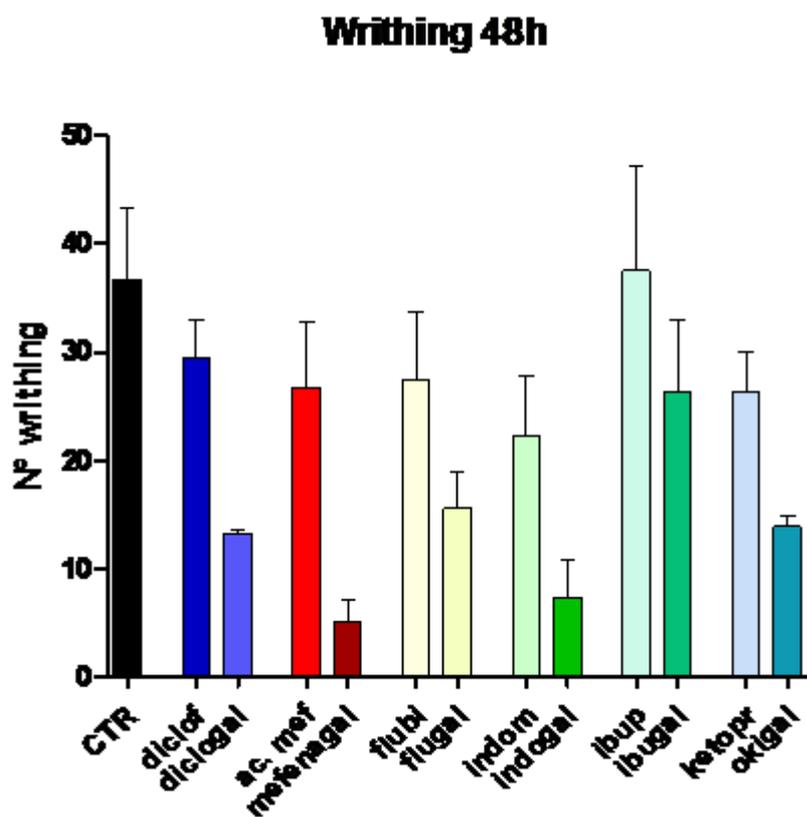


Fig. 19 Attività analgesica profarmaci a 48h.

Trasporto linfatico profarmaci dell'acido micofenolico

Nello studio sul trasporto linfatico sono stati utilizzati i ratti (280-320 g), mantenuti con una dieta standard e tenuti a digiuno durante la notte con libero accesso all'acqua prima di esperimenti. I ratti anestetizzati, con ketamina, xilazina e acepromazina, sono stati collocati su un tappetino riscaldato a 37 ° C e inserite le cannule nel duodeno. La formulazione composta da 2 mg di profarmaco, 40 mg di acido oleico, 25 mg di Tween 80 e 5,6 mL di una soluzione salina a pH 7.4 è stata somministrata nei ratti per 2 ore e poi un infuso salino (2,8 mL/h) per reidratare. Ogni ora è stata poi recuperata un'aliquota di linfa e analizzata all'HPLC-MS (previo trattamento per la rimozione del vettore dal *parent drug*), per valutare il contenuto di acido micofenolico nei vasi linfatici.

I risultati mostrano come il metil 8-(succinildigliceride)-micofenolato (MPA-O-C4-ES-2-TG) e il 5-tiovaleratodigliceride micofenolato (MPA-S-C5-ES-2-TG) hanno portato un aumento della concentrazione dell'acido micofenolico rispettivamente del 0,35% e 10,17% rispetto al trasporto linfatico del *parent drug* che è 0,17% (**Fig. 20**).

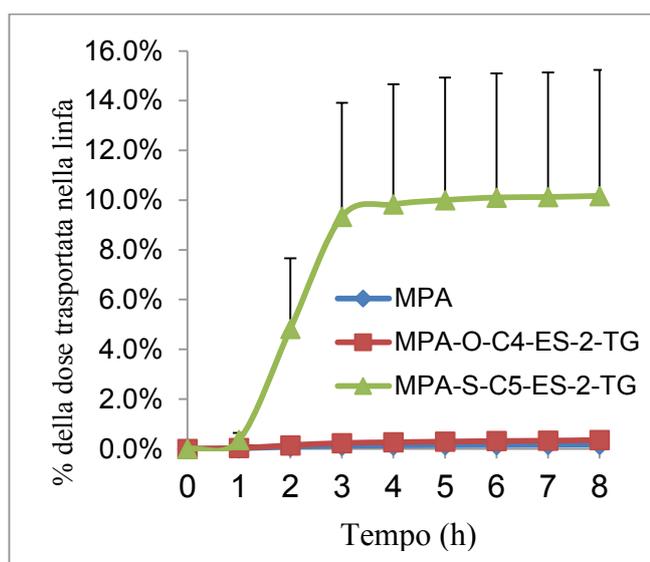


Fig. 20 *Trasporto linfatico profarmaci dell'acido micofenolico.*

CONCLUSIONI

In conclusione, il D-galattosio grazie alle sue proprietà, ha dimostrato una riduzione della tossicità dei *parent drugs*, infatti le molecole neosintetizzate presentano una nulla o lieve attività gastrolesiva e una prolungata attività farmacologica. Inoltre un approccio strategico differente nella sintesi ha portato ad una maggiore maneggevolezza del prodotto ad ogni stadio, la riduzione di materiali di scarto, e anche all'ottenimento di un prodotto più pulito con un contenuto ridotto di materiali tossici.

Per quanto riguarda i profarmaci dell'acido micofenolico, l'utilizzo del digliceride come vettore, ha mostrato un moderato aumento della concentrazione dell'immunosoppressore nei vasi linfatici, richiedendo così, uno studio più approfondito in questo settore al fine di migliorarne il trasporto linfatico.

Potenzialità e vantaggi dell'approccio proposto

L'ampio ventaglio di indicazioni cliniche e il diffuso concetto di maneggevolezza e facilità d'impiego dei farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) che spesso induce all'autoprescrizione, costituiscono i principali fattori per cui questa categoria di farmaci rientra tra i preparati farmaceutici di maggior consumo nel mondo. Il costante incremento dell'uso dei farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) appare legato principalmente alle migliorate aspettative di vita della popolazione con conseguente aumento della prevalenza delle malattie reumatiche, degenerative osteoarticolari e cardiovascolari. I FANS sono, tuttavia, responsabili di un numero rilevante di reazioni avverse e di complicanze gravi. Infatti, il rischio di emorragia gastrointestinale è aumentato di 4-5 volte ed il rischio di mortalità è tra le 3 e le 8 volte rispetto a quello di una popolazione di controllo.

Durante la terapia con FANS i sintomi dispeptici sono presenti in una larga quota di pazienti con percentuali variabili sia per la non omogenea definizione della dispepsia che per il largo uso di FANS che determina una sovrapposizione casuale con la dispepsia funzionale. Il dolore epigastrico è spesso presente nei pazienti che assumono FANS e si accentua con il prolungarsi della terapia, tanto da essere responsabile, in un certo numero di casi, di interruzione della terapia.

Per la presenza di questi rischi, un consolidato comportamento terapeutico induce alla prescrizione di farmaci gastroprotettori, fra questi i più utilizzati sono gli inibitori della pompa protonica. Tuttavia, il capitolo di spesa dei farmaci gastroprotettori va indubbiamente tenuto sotto controllo, ma anche la comparsa di reazioni avverse da FANS comporta un notevole impegno di risorse economiche per l'utilizzo degli accessi ambulatoriali e di ricovero.

Quindi, anche in questo caso, come in tanti altri settori della medicina bisogna elaborare le migliori strategie di trattamento in termini di costo-efficacia. Inoltre l'immissione sul mercato di farmaci come gli anti-COX2 che vantano minore gastrolesività ma maggiore costo ha inserito una nuova variabile che ha contribuito a rendere più complessa la valutazione del bilancio tra costo ed efficacia delle terapie antinfiammatorie e della conseguente gastroprotezione.

In questo scenario, appare evidente quanto sia rilevante la ricerca di farmaci che abbiano una efficace attività antiinfiammatoria ed una corrispondente minore gastrolesività. Una strategia di modifica strutturale di farmaci già in commercio e di cui è riconosciuta l'attività terapeutica è senza dubbio la migliore soluzione in termini economici, di sicurezza e di efficacia; coadiuvata inoltre dall'utilizzo di modelli di simulazione multiscale, capaci di predire il comportamento del profarmaco nel nostro organismo, si riducono così a monte la sintesi di potenziali molecole che *in vivo* poi potrebbero risultare inefficaci. Questo tipologia di strategia che associa profarmaco e metodi di simulazione abbraccia appieno, a mio avviso, la filosofia della "Green Chemistry" .

MATERIALI E METODI

Sintesi

I prodotti utilizzati per la sintesi, sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italy). L'andamento delle reazioni e la purezza dei prodotti sono stati monitorati mediante cromatografia su strato sottile TLC, impiegando lastre di gel di silice su supporto di alluminio 60F254 della Merck. Le macchie su TLC sono state evidenziate con lampade UV e per esposizione ai vapori di iodio. La purificazione dei composti intermedi e di quelli finali è stata ottenuta con cromatografia su gel di silice (Aldrich 230-400 mesh). I prodotti sono stati caratterizzati mediante spettrometria NMR ^1H e ^{13}C utilizzando uno spettrometro Varian Mercury 400. Gli spettri di massa sono stati effettuati con uno spettrometro Applied Biosystem API 2000, equipaggiato con una sorgente ESI.

Sintesi del Diacetone 6'-O-Indometacina-D-galattopiranoside

158 mg di indometacina **1** (0.44 mmol), 114 mg di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- α -galattopiranosio (0.44 mmol), 101 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide-HCl (EDC-HCl) (0.53 mmol) e 5 mg di 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0.041 mmol) vengono sciolti in 1-butil-3-metilimidazolo esafluorofosfato ([bmim][PF₆]) (1 mL). La miscela di reazione, dopo 12 ore sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente, viene trattata con etere. La fase organica è poi lavata con acqua basica (HCO₃⁻) e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione, purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etere, si ottengono 147 mg di **1a** con una resa del 56 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.30, 1.31, 1.40, 1.41 (4s, 12H, chetali); 2.3 (s, 3H, -CH₃ indo); 3.39 (s, 2H, -CH₂ indo); 3.7 (s, 3H, -OCH₃ indo); 4.05 (m, 1H, 4'-H); 4.15 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 5.35 (m, 1H, 1'-H); 6.22 (s, 1-H, 4-ind); 6.7 (2d, 2H, 6- e 7-ind); 7.4 (2d, 2H, 3- e 5-ph); 7.7 (2d, 2H, 2- e 6-ph).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 13.3 (CH₃ indo); 24.4, 24.9, 25.8 e 26 (4CH₃-chetali); 30 (CH₂ indo); 55.7 (OCH₃ indo); 64 (C-6'); 66(C-2'); 70.4 (C-3'); 70.7 (C-4'); 71 (C-5'); 96 (C-1'); 101.3 (C-4 ind); 108.7 e 109.6(C-chetali); 111.7 (C-3 ind); 112(C-6 ind); 115 (C-7 ind); 129 (C-1, ind);130.6 (C-3 α , ph); 130.8(C-7 α , ind); 131 (C-3 ph e C-5 ph); 134 (C-2 ph e C-6 ph); 136 (C-2 ind); 139 (C-4 ph); 156 (C-5 ind); 168 (CO ind); 170.6 (CO-ester).
m/z: 601 (M + H)⁺.

Sintesi dell'indometacina-D-galactos-6'-il estere

Alla molecola **1a** (313 mg; 0.52 mmol) sciolta in diclorometano anidro (2.5 mL) viene aggiunto 1 mL di acido trifluoroacetico (TFA). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 12 ore. Allontanando il solvente si ottiene un residuo che viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice disattivata usando come eluente CHCl₃ in gradiente di CH₃OH, ottenendo così 150 mg di **Indogal** con una resa del 55.4%.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 2.3 (s, 3H, -CH₃ indo); 3.39 (s, 2H, -CH₂ indo); 3.45 (m, 1H, 4'-H); 3.5 (m, 1H, 5'-H); 3.7 (s, 3H, -OCH₃ indo); 3.8 (m, 2H, 6'-H); 4.20 (m, 1H, 2'-H); 4.40 (m, 1H, 3'-H); 5.15 (m, 1H, 1'-H); 6.22 (s, 1H, 5-ind); 6.7 (2d, 2H, 6- e 7-ind); 7.4 (2d, 2H, 3- e 5-ph); 7.7 (2d, 2H, 2- e 6-ph).

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 12 (CH₃ indo); 29.2 (CH₂ indo); 54.8 (-OCH₃ indo); 64 (C-6'); 68.9 (C-4'); 69.5 (C-3'); 72.5 (C-5'); 73 (C-2'); 97 (C-1'); 101 (C-4 ind) 111 (C-3 ind); 111.3 (C-6 ind); 112.6 (C-7 ind); 114 (C-3α ind); 128.8 (C-1 ph); 130.6 (C-7α ind); 131 (C-3 ph e C-5 ph); 134 (C-2 ph e C-6); 135.6 (C-2 ind); 138.8 (C-4 ph); 156 (C-5 ind); 168 (CO ind); 171 (CO-ester). m/z: 521 (M + H)⁺.

Sintesi del Diacetone 6'-O-Mefenamico-D-galattopiranoside

212 mg di acido mefenamico (0.88 mmol), 114 mg di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- α -galattopiranosio (0.44 mmol), 202 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide-HCl (EDC-HCl) (1.06 mmol) e 10 mg di 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0.082 mmol) vengono sciolti in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]) (1.5 mL). La miscela di reazione, dopo 12 ore sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente, è trattata con etere. La fase organica è poi lavata con acqua basica (HCO₃⁻) e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione, purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etere, ottenendo 133 mg di **2a** con una resa del 63 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.34-1.36(d, 6H, chetali); 1.49, 1.52 (d, 6H, chetali); 2.16 (s, 3H,3''' -CH₃); 2.32 (s, 3H, 2'''-CH₃); 4.23 (m, 1H, 4'-H); 4.36 (m, 1H, 5'-H); 4.45 (m, 2H, 6'-H); 4.50 (m, 1H, 2'-H); 4.60-4.70 (d, 1H, 3'-H); 5.57-5.58 (d, 1H, 1'-H); 6.66 (t, 6'''-H, ph);6.71-6.73 (d, 4'''-H,ph);7.01-7.03 (d, 6''-H, ph); 7.10 (t, 5'''-H, ph); 7.13 (t, 4''-H, ph) 7.22-7.23 (d, 5''-H, ph); 7.97-8.00(d, 3''-H, ph).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 13.96 (3'''-CH₃, ph); 20.6 (2'''-CH₃, ph); 26 (-CH₃, chetali); 63 (C-6'); 66 (C-2'); 70.6 (C-3'); 70.7 (C-4') 71(C-5'); 96.3 (C-1'); 108.8 e 109.7 (C-chetali); 111 (C-2'' ph); 113.6 (C-6''' ph);116 (C-4'' ph); 123 (C-4''' ph); 125.9 (C-6'' ph); 126.8 (C-2''' ph); 131.7 (C-5''' ph); 132.6 (C-3'' ph); 134.2 (C-5'' ph); 138.2 (C-3''' ph); 138.7 (C-1''' ph); 149.5 (C-1'' ph); 168.4 (CO-ester) m/z: 484 (M + H)⁺.

Sintesi del Mefenamico-D-galactos-6'-il estere (Mefegal)

Al prodotto **2a** (603 mg; 1.25 mmol) sciolto in 4 mL di diclorometano anidro vengono aggiunti 3 mL di acido trifluoroacetico (TFA). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 24 ore. Allontanando il solvente si ottiene un residuo che viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice disattivata usando come eluente CHCl_3 in gradiente di CH_3OH , ottenendo così 183 mg di **Mefegal** con una resa del 40 %.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 2.14 (s, 3H, 3''' - CH_3); 2.31 (s, 3H, 2'''- CH_3); 3.49 (m, 1H, 4'-H); 3.5 (m, 1H, 3'-H); 3.9 (m, 2H, 2'-H); 4.1 (m, 1H, 5'-H); 4.50(m, 1H, 6'-H); 5.18-5.20 (d, 1H, 1'-H); 6.6 (t, 4'''-H e 6'''-H, ph); 7.02-7.03 (d, 6''-H, ph); 7.7 (t, 4''-H e 5'''-H, ph); 7.24 (t, 5''-H, ph) 7.95-7.97 (d, 3''-H, ph);

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ 12.7 (3'''- CH_3 , ph); 19 (2'''- CH_3 , ph); 63.7 (C-6'); 69.1(C-4'); 69.8 (C-3'); 72.7 (C-5') 73.4(C-2'); 97.3 (C-1'); 110.4 (C-2'' ph); 113.1 (C-6''' ph); 115.8 (C-4'' ph); 123 (C-4''' ph); 125.7 (C-6'' ph); 126.6 (C-2''' ph); 131.4 (C-5''' ph); 132 (C-3'' ph); 134 (C-5'' ph); 137.9 (C-3''' ph); 138.4 (C-1''' ph); 149.5 (C-1'' ph); 168.3 (CO-ester) m/z: 404 (M + H)⁺.

Sintesi del Diacetone 6'-O-(2-Bromo)-Aceto-D-galattopiranoside

61 mg di acido 2-bromo acetico (**X**) (0.44 mmol), 114 mg di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- α -galattopiranosio (0.44 mmol), 101 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide-HCl (EDC-HCl) (0.53 mmol) e 5 mg di 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0.041 mmol) vengono sciolti in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]) (1 mL). La miscela di reazione, dopo 12 ore sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente, è trattata con etere. La fase organica è poi lavata con acqua basica (HCO₃⁻) e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etere, si ottengono 56 mg di diacetone 6'-O-(2-Bromo)-Aceto-D-galattopiranoside (**3a**) avente consistenza solida con una resa del 59%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.44, 1.51(2s, 12H, chetali); 3.87 (s, 2H, Br-CH₂-); 4.04 (m, 1H, 4'-H); 4.23-4.25 (d, 1H, 5'-H); 4.33 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.61-4.63 (d, 1H, 3'-H); 5.53-5.52 (d, 1H, 1'-H);

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 25.7 (Br-CH₂-); 26 (-CH₃, chetali); 65.1 (C-6'); 66 (C-2'); 70.4 (C-3'); 70.7 (C-4') 71 (C-5'); 96.2 (C-1'); 108.9 e 109.7 (C-chetali); 167.2 (CO-ester) m/z: 382 (M + H)⁺.

Sintesi del Diacetone 6'-O-(2-Diclofenac)-Aceto-D-galattopiranoside

A 220 mg di **3a** (0.6 mmol) sciolti in 2 mL di 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]), vanno aggiunti 222 mg di diclofenac sodico (0.7 mmol). La miscela di reazione, dopo 24 ore sotto agitazione elettromagnetica a 50°C, è trattata con etere. La fase organica è poi lavata con acqua basica (HCO₃⁻) e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, si ottengono 331 mg di diacetone 6'-O-(2-Diclofenac)-Aceto-D-galattopiranoside (**3b**) con una resa 73%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.43 (s, 6H, chetali); 1.5 (s, 6H, chetali); 3.9 (s, 2H, ph-CH₂-C); 4 (m, 1H, 3'-H); 4.16-4.18 (d, 1H, 4'-H); 4.3 (m, 2H, 6'-H); 4.3 (m, 1H, 5'-H); 4.58-4.60 (d, 1H, 2'-H); 4.7 (s, 2H, -CH₂- acetato); 5.5-5.51 (d, 1H, 1'-H); 6.54-6.56 (d, 6''-H, ph); 6.7 (s, 4'''-H, ph); 7 (t, 4''-H, ph); 7.13 (t, 5''-H, ph) 7.24-7.26 (d, 3''-H, ph); 7.32-7.34 (d, 2H, 3'''-H e 5'''-H, ph).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 25-26 (-CH₃, chetali); 38 (ph-CH₂-) 64.3 (C-6'); 65.8 (C-2'); 70.4 (C-3'); 70.7 (C-4') 70.9 (C-5'); 96.2 (C-1'); 108.8 e 109.7 (C-chetali); 118.4 (C-4'', ph); 122 (C-6'', ph); 123.9 (C-4''', ph); 124 (C-2'', ph); 128.1 (C-3''' e C-5''', ph); 128.8 (C-5'', ph); 129.6 (C-2''' e C-6''', ph); 131 (C-3'', ph); 138 (C-1''', ph); 142.7 (C-1'', ph); 167.2 (CO-acetato); 171.4 (CO-diclofenac) m/z: 597 (M + H)⁺.

Sintesi del (2-Diclofenal)-Aceto -D-galactos-6'-il estere (Diclogal)

A 113 mg del composto **3b** (0.19 mmol) sciolti in diclorometano anidro (1 mL) vengono aggiunti 0.15 mL di acido trifluoroacetico (TFA); la miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 24 ore. Allontanato il solvente si ottiene un residuo che viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice disattivata usando come eluente cloroformio in gradiente di etilacetato, ottenendo così 36 mg di **Diclogal** con una resa del 37 %.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 3.7 (m, 3H, 2'-H, 3'-H e 4'-H); 3.92 (s, 2H, ph-CH₂-C); 4.15-4.17 (d, 1H, 6'-H); 4.27 (m, 2H, 5'-H); 4.37-4.39 (d, 1H, 6'-H); 4.58-4.60 (d, 1H, 2'-H); 4.72 (s, 2H, -CH₂- acetato); 5.13-5.14 (d, 1H, 1'-H); 6.4-6.42 (d, 6''-H, ph); 6.9 (t, 2H, 4'''-H e 4''-H, ph); 7.1 (t, 5''-H, ph); 7.24-7.26 (d, 3''-H, ph); 7.38-7.4 (d, 2H, 3'''-H e 5'''-H, ph).

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 37 (ph-CH₂-); 61 (-CH₂- acetato); 64.3 (C-6'); 65.5 (C-2'); 69 (C-3'); 72 (C-5') 73 (C-2'); 92.8 (C-1'); 117 (C-4'', ph); 122 (C-6'', ph); 124 (C-4''', ph); 124.5 (C-2'', ph); 128 (C-3''' e C-5''', ph); 129 (C-5'', ph); 130 (C-2''' e C-6''', ph); 131 (C-3'', ph); 138 (C-1''', ph); 143 (C-1'', ph); 168 (CO-acetato); 172 (CO-diclofenac) m/z: 517 (M + H)⁺.

Sintesi del Diacetone 6'-O-Ibuprofene-D-galattopiranoside

91 mg di ibuprofene (0.44 mmol), 114 mg di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- α -galattopiranosio (0.44 mmol), 101 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide-HCl (EDC-HCl) (0.53 mmol) e 5 mg di 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0.041 mmol) vengono sciolti in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]) (1 mL). La miscela di reazione, dopo 12 ore sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente, è trattata con etere. La fase organica è poi lavata con acqua basica (HCO₃⁻) e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etere, si ottengono 100 mg del composto **4a** con una resa del 58%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.01 (2s, 6H, -CH₃ ibu); 1.30, 1.31, 1.40, 1.41 (4s, 12H, chetali); 1.5 (d, 3H, -CH₃); 2.22 (m, 1H, -CH ibu); 2.51 (d, 2H, -CH₂ ibu); 3.78 (m, 1H, -CH); 4.05 (m, 1H, 4'-H); 4.15 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 5.35 (m, 1H, 1'-H); 7.1 (2d, 4-H, ph).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 185 (-CH₃); 22.3 (2-CH₃ ibu); 24.4 e 26 (4-CH₃ chetali); 30 (CH ibu), 44 (CH); 45 (CH₂ ibu); 64 (C-6'); 66 (C-2'); 70.5 (C-3'); 70.7 (C-4'); 71 (C-5'); 96 (C-1'); 108.6 e 109.5 (C-chetali); 127 (C-2 ph e C-6 ph); 129 (C-3 ph and C-5 ph); 137.6 (C-1 ph); 140.4 (C-4 ph); 174.5 (CO-ester). m/z: 448 (M + H)⁺.

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

Al composto **4a** (0.99 g; 2.2 mmol) sciolto in 10 mL di diclorometano anidro vengono aggiunti 2 mL di acido trifluoroacetico (TFA). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 48 ore. Rimosso il solvente si ottiene un residuo che che purificato su colonna cromatografica con gel di silice disattivata usando come eluente CHCl₃ in gradiente di CH₃OH, ottenendo così 550 mg di **Ibugal** con una resa del 55 %.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.01 (2s, 6H, -CH₃ ibu); 1.5 (d, 3H, -CH₃); 2.0 (m, 1H, -CH ibu); 2.51 (d, 2H, -CH₂ ibu); 3.78 (m, 1H, -CH); 3.45 (m, 1H, 4'-H); 3.5 (m, 1H, 5'-H); 3.8 (m, 2H, 6'-H); 4.20 (m, 1H, 2'-H); 4.40 (m, 1H, 3'-H); 5.15 (m, 1H, 1'-H); 7.1 (2d, 4-H, ph).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 17.8 (CH₃); 21.4 (2CH₃ ibu); 30 (CH ibu), 44.6 (CH); 44.8 (CH₂ ibu); 64 (C-6'); 68 (C-4'); 69 (C-3'); 72 (C-2'); 73 (C-5'); 97 (C-1'); 127 (C-2 ph e C-6 ph); 129 (C-3 ph and C-5 ph); 137.8 (C-1 ph); 140 (C-4 ph); 174 (CO-ester). m/z: 368 (M + H)⁺.

Sintesi del Diacetone 6'-O-Ketopropene-D-galattopiranoside

224 mg di ketopropene (0.88 mmol), 114 mg di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- α -galattopiranosio (0.44 mmol), 202 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimide-HCl (EDC-HCl) (1.06 mmol) e 10 mg di 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) (0.082 mmol) vengono sciolti in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]) (1.5 mL). La miscela di reazione, dopo 12 ore sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente, è trattata con etere. La fase organica è poi lavata con acqua basica (HCO₃⁻) e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etere, si ottengono 157 mg del composto **5a** con una resa del 72%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.30, 1.31, 1.40, 1.41 (4s, 12H, chetali); 1.5 (d, 3H, -CH₃); 3.70 (m, 1H, -CH); 4.05 (m, 1H, 4'-H); 4.15 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 5.35 (m, 1H, 1'-H); 7.31 (m, 2H, 5''-H and 6''-H); 7.36 (m, 2H, 3'''-H and 5'''-H); 7.45 (m, 1H, 3-H, 4'''-H); 7.56 (s, 1-H, 2''-H); 7.7 (m, 2-H, 2'''-H and 6'''-H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.5 (-CH₃); 24.4 e 25 (4CH₃-chetali); 45.3 (CH); 63.7 (C-6'); 66 (C-2'); 70.4 (C-3'); 70.7 (C-4'); 71 (C-5'); 96.2 (C-1'); 108.6 e 109.6 (C-chetali); 128.2 (C-3''' and C-5'''); 128.5 (C-5'') 129 (C-4''); 129.3 (C-2''' and C-6'''); 129.3 (C-2''); 130 (C-4'''); 131.6 (C-6''); 132.4 (C-1''); 137.6 (C-1'') 138 (C-1'''); 140.6 (C-3''); 174 (CO-ester); 196.3 (CO-chetone). m/z: 497 (M + H)⁺.

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

Alla molecola **5a** (0.99 g; 2.4 mmol) sciolta in 10 mL di diclorometano anidro vengono aggiunti 2 mL di acido trifluoroacetico (TFA). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 48 ore. Con la rimozione del solvente si ottiene un residuo che viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice disattivata usando come eluente CHCl₃ in gradiente di CH₃OH, ottenendo così 550 mg di **Okigal**, la cui resa è del 55 %.

¹H-NMR (CD₃OD): δ 1.5 (d, 3H, -CH₃); 3.45 (m, 1H, 4'-H); 3.70 (m, 1H, -CH); 3.8 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.30 (m, 1H, 2'-H); 4.40 (m, 1H, 3'-H); 5.15 (m, 1H, 1'-H); 7.31 (m, 2H, 5''-H and 6''-H); 7.36 (m, 2H, 3'''-H and 5'''-H); 7.45 (m, 1H, 3-H, 4'''-H); 7.56 (s, 1-H, 2''-H); 7.7 (m, 2-H, 2'''-H and 6'''-H).

¹³C-NMR (CD₃OD): δ 17.6 (CH₃); 45 (CH); 64 (C-6'); 67.6 (C-4'); 69 (C-3'); 72.4 (C-5'); 73.3 (C-2'); 97 (C-1'); 128 (C-3''' e C-5''' ph); 128.5 (C-5'' ph); 128.6 (C-4'' ph); 129 (C-2''' e C-6''' ph); 129.7 (C-2''); 131.7 (C-4'''); 132 (C-6'); 137 (C-1''); 137.7 (C-1'''); 141 (C-3''); 174 (CO-ester); 197 (CO-chetone). m/z: 417 (M + H)⁺.

Sintesi del Diacetone 6'-O-Flurbiprofene-D-galattopiranoside

216 mg di flurbiprofene (0.88 mmol), 114 mg di 1,2,3,4-di-O-isopropilidene-D- α -galattopiranosio (0.44 mmol), 202 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide-HCl (EDC-HCl) (1.06 mmol) e 10 mg di 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0.082 mmol) vengono sciolti in 1-butil-3-metilimidazolo esafluoroposfato ([bmim][PF₆]) (1.5 mL). La miscela di reazione, dopo 12 ore sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente, è stata trattata con etere. La fase organica è stata poi lavata con acqua basica (HCO₃⁻) e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etere, si ottengono 150 mg del composto **6a** con una resa del 70%.

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.30, 1.31, 1.40, 1.41 (4s, 12H, chetali); 1.5 (d, 3H, -CH₃); 3.70 (m, 1H, -CH); 4.05 (m, 1H, 4'-H); 4.15 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.40 (m, 1H, 2'-H); 4.50 (m, 1H, 3'-H); 5.35 (m, 1H, 1'-H); 7.17 (m, 2H, 6,5-Biph); 7.36 (m, 1H, 3-Biph); 7.43 (m, 3-H, 9,10,12-Biph); 7.52 (m, 2-H, 8,12-Biph).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.4 (CH₃); 24.4 e 26 (4CH₃-chetali); 45 (CH); 64 (C-6'); 65.7 (C-2'); 70.5 (C-3'); 70.7 (C-4'); 71 (C-5'); 96 (C-1'); 108.7 e 109.6 (C-chetali); 115 (C-2'' ph); 115.5 (C-6'' ph); 123.7 (C-4''' ph); 127.8 (C-2'''' ph e C-6'''' ph); 128 (C-3'''' ph e C-5'''' ph); 129 (C-5'' ph); 131 (C-4'' ph); 136 (C-1'' ph); 141.7 (C-1'''' ph); 161 (C-3'' ph); 173.7 (CO estereo). m/z: 487 (M + H)⁺.

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

Al composto **6a** (1.21 g; 2.5 mmol) sciolto in 10 mL di diclorometano anidro vengono aggiunti 2 mL di acido trifluoroacetico (TFA). La miscela di reazione è tenuta sotto agitazione elettromagnetica a temperatura ambiente per 48 ore. Svaporando il solvente si ottiene un residuo che viene purificato su colonna cromatografica con gel di silice disattivata usando come eluente CHCl_3 in gradiente di CH_3OH , ottenendo così 538 mg di **Flugal** con una resa del 53 %.

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 1.5 (d, 3H, $-\text{CH}_3$); 3.45 (m, 1H, 4'-H); 3.70 (m, 1H, -CH); 3.8 (m, 1H, 5'-H); 4.20 (m, 2H, 6'-H); 4.30 (m, 1H, 2'-H); 4.40 (m, 1H, 3'-H); 5.15 (m, 1H, 1'-H); 7.17 (m, 2H, 6,5-Biph); 7.36 (m, 1H, 3-Biph); 7.43 (m, 3-H, 9,10,12-Biph); 7.52 (m, 2-H, 8,12-Biph).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ 16 ($-\text{CH}_3$); 43 (CH); 62.6 (C-6'); 66.7 (C-4'); 69 (C-3'); 70.8 (C-5'); 72 (C-2'); 95.8 (C-1'); 113.6 (C-2'' ph); 122.4 (C-6'' ph); 125.9 (C-4''' ph); 126.2 (C-2''' e C-6''' ph); 126.6 (C-3''' e C-5''' ph); 127 (C-5'' ph) 129 (C-4'' ph); 134 (C-1'' ph); 140.7 (C-1''' ph); 159 (C-3''); 172 (CO estereo). m/z: 407 (M + H)⁺.

Cloruro di palmitoile

L'acido palmitico (10 g, 39 mmol) è stato sciolto in 8 mL di cloruro di tionile con una goccia di dimetilformammide (DMF). La reazione, dopo un'ora sotto agitazione elettromagnetica a 90°C, è stata raffreddata e l'eccesso di cloruro di tionile è stato rimosso. Si sono ottenuti 12,3 g di cloruro di palmitoile con una resa del 91.22 %.

¹H NMR (CDCl₃) δ 2.88 (t, 1H), 1.76 – 1.65 (m, 1H), 1.36 – 1.20 (m, 12H), 0.88 (t, 1H).

Sintesi dell'acetone 1,3-dipalmitato

0.175 g del dimero dell' 1,3-diidrossiacetone (0,97 mmol) sono stati sciolti in 2 mL diclorometano e 0,37 mL piridina. Il cloruro di palmitoile è stato aggiunto goccia a goccia (1,0827 g, 3,9 mmol). La reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica tutta la notte e successivamente è stata diluita con acqua e cloroformio. La fase organica è stata anidrificata con magnesio solfato anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Si è ottenuto un solido cristallino giallo che è stato ricristallizzato in metanolo. Il peso del prodotto è stato di 0.707 g quindi la resa del 64 %.

¹H NMR (CDCl₃) δ 4.75 (s, 4H), 2.42 (t, 4H), 1.66 (dt, 4H), 1.33 – 1.19 (m, 48H), 0.88 (t, 6H).

Sintesi del 1,3 digliceride

L'acetone 1,3 dipalmitato (0,7 mmol, 400 mg) è stato sciolto in 10 mL di tetraidrofurano, 2 mL di toluene e 0,6 mL di acqua. Una volta aggiunta l'acqua la reazione è stata raffreddata approssimativamente a 5°C e aggiunto il sodio boroidrato (1.06 mmol 1,5 eq. ,40 mg). Dopo cinque ore sotto agitazione elettromagnetica, l'eccesso di boroidrato è stato neutralizzato con acido acetico, e la soluzione diluita con cloroformio. Successivamente la fase organica è stata trattata con acqua basica (HCO_3^-) e anidrificata con magnesio solfato anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. La purificazione del prodotto è avvenuta mediante ricristallizzazione in metanolo e ha portato a 167 mg di polvere bianca con una resa del 42 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 4.24 – 4.09 (m, 5H), 2.43 (d, 1H), 2.37 (t, 4H), 1.70 – 1.60 (m, 4H), 1.30 (d, 48H), 0.94 – 0.87 (m, 6H).

Sintesi del metilmicofenolato

200 mg di acido micofenolico (0,624 mmol) sono stati sciolti in 3 mL di metanolo e 3 mL di diclorometano; in seguito sono stati aggiunti 7 mg 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) e 202 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide-HCl (EDC-HCl) (0,87 mmol, 167 mg). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica tutta la notte. La fase organica è stata trattata con acqua basica (HCO_3^-) e anidrificata con solfato di sodio anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografia con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, si ottengono 93 mg del prodotto con una resa del 45 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.66 (s, 1H), 5.22 (m, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.37 (d, 2H), 2.42 – 2.36 (m, 2H), 2.33 – 2.26 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.78 (s, 3H).

Sintesi 2-succinildigliceride

121 mg di 1,3 digliceride (0,21 mmol) sono stati sciolti in 1,4 mL di diclorometano, 1,4 mL di tetraidrofurano e 0,6 mL di piridina. Dopo l'aggiunta dell'anidride succinica 42 mg (0,42 mmol) la reazione ha reagito tutta la notte. Successivamente è stata diluita con etilacetato, lavata con acqua, anidrificata con magnesio solfato anidro, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografia con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, si ottengono 68,5 mg del 2-succinildigliceride. La resa in questo caso è del 49 %.

¹H NMR (CDCl₃) δ 5.28 (m, 1H), 4.31 (dd, 2H), 4.16 (dd, 2H), 2.72-2.64 (m, 4H), 2.32 (t, 4H), 1.65 – 1.55 (m, 4H), 1.34-1.22 (m, 48H), 0.88 (t, 6H).

Sintesi del profarmaco metil 8-(succinildigliceride)-micofenolato

62,2 mg di succinildigliceride (0,093 mmol) con 32,1 mg di *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimide-HCl (EDC-HCl) (0,167 mmol) e 11,4 mg di 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) sono stati sciolti in 4 mL di diclorometano anidro. Dopo 15 min alla soluzione è stato aggiunto il metil micofenolato (31 mg, 0,093 mmol) e la reazione è stata lasciata sotto agitazione elettromagnetica per 24 ore. La fase organica è stata trattata con acqua, anidrificata con magnesio solfato, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografia con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, si ottengono 38,5 mg di prodotto con una resa del 42 %.

¹H NMR (CDCl₃) δ 5.28 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 5.12 (m, 1H), 4.29 (dd, 2H), 4.16 (dd, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.35 (d, 2H), 3.03 (t, 2H), 2.83 (t, 2H), 2.41 – 2.35 (m, 2H), 2.33 – 2.27 (m, 6H), 2.22 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.64 – 1.55 (m, 4H), 1.37 – 1.17 (m, 48H), 0.87 (t, 6H).

Sintesi 2-(5-bromovalerato)-digliceride

253 mg di acido 5-Bromovalerico (1.4 mmol) è stato sciolto in 10 mL di diclorometano insieme a 289 mg di dicicloesilcarbodiimmide (DCC) (1,4 mmol) e 103 mg di 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP)(0,84 mmol). In ultimo alla reazione è stata aggiunto l'acetone 1,3-dipalmitato (318 mg, 0,56 mmol) e lasciata sotto agitazione elettromagnetica per 24 ore. La fase organica trattata con acqua basica (HCO_3^-), anidrificata con magnesio solfato, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, si è ottenuto 150 mg con una resa 37 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.31 – 5.22 (m, 1H), 4.31 (dd, 2H), 4.14 (dd, 2H), 3.41 (t, 2H), 1.95 – 1.86 (m, 2H), 1.83 – 1.75 (m, 2H), 1.63 – 1.58 (m, 43H), 1.34 – 1.22 (m, 48H), 0.88 (t, 6H).

Sintesi del 2-(5-acetiltiovalerato)-digliceride

20 mg di 2-(5-bromovalerato)-digliceride (0,027 mmol) sono stati sciolti in 2 mL di tetraidrofurano e 1 mL di etanolo. In ultimo alla soluzione è stata aggiunto 6 mg di potassio tioacetato (0,055 mmol) e lasciata sotto agitazione elettromagnetica tutta la notte. La reazione è stata diluita con diclorometano e trattata con acqua basica (HCO_3^-), anidrificata con magnesio solfato, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice, usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, si ottengono 18 mg di prodotto la cui resa è del 90 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.26 (m, 1H), 4.30 (dd, 2H), 4.14 (dd, 2H), 2.87 (t, 2H), 2.38 – 2.27 (m, 6H), 2.32 (s, 3H), 1.74 – 1.65 (m, 2H), 1.65 – 1.55 (m, 6H), 1.33 – 1.21 (m, 48H), 0.92 – 0.83 (m, 6H).

Sintesi del 2-(5-tiovalerato)-digliceride

33 mg di 2-(5-acetiltiovalerato)-digliceride (0,045 mmol) sono stati sciolti in 0.8 ml di acetonitrile e 0,3 mL di diclorometano e dimetilformammide. In ultimo alla soluzione sotto agitazione elettromagnetica è stata aggiunta una soluzione di idrazina/acetonitrile (35 μ L 1:3 v/v, 0,18 mmol) e riscaldata a 30°C per 5 ore. La reazione è stata diluita con diclorometano e trattata con acqua basica (HCO_3^-), acqua acida, anidrificata con magnesio solfato, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, si ottengono 24 mg di prodotto con resa del 82%.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 5.31 – 5.22 (m, 1H), 4.31 (dd, 2H), 4.14 (dd, 2H), 2.54 (dd, 2H), 2.34 (t, 2H), 2.31 (t, 4H), 1.79 – 1.70 (m, 2H), 1.69 – 1.54 (m, 6H), 1.32 – 1.23 (m, 48H), 0.88 (t, 6H).

Sintesi Allil 8-(Oallil)-micopenolato

1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) (602 μ L, 4.03 mmol) e il bromuro allilico (238 μ L, 2.82 mmol) sono stati aggiunti ad una soluzione di acido micofenolico (250 mg, 0.809 mmol) in 15 mL di DMF e lasciati sotto agitazione elettromagnetica per 18 ore. La reazione è stata diluita in etilacetato e trattata con acqua. La fase acquosa è stata estratta con etilacetato e le fase organiche sono state unite e riestratte con acqua saline. La fase organica anidrificata con magnesio solfato, è stata filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografia con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato si ottengono 292 mg di prodotto con una resa del 93%.

¹H NMR (CDCl₃): δ 6.09 (ddt, 1H), 5.86 (ddt, 1H), 5.37 (dq, 1H), 5.30-5.15 (m, 4H), 5.13 (s, 2H), 4.78 (dt, 2H), 4.52 (dt, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.41 (d, 2H), 2.44-2.39 (m, 2H), 2.35-2.27 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.79 (s, 3H).

Sintesi acido 8-(Oallil)-micopenolico

L'Allil 8-(Oallil)-micopenolato (44.0 mg, 0.110 mmol) è stato sciolto in 330 μL di NaOH (2 M, 0.660 mmol), 1 mL di acqua e 1.3 mL di metanolo. Dopo 1.5 ore sotto agitazione elettromagnetica la reazione è stata acidificata con HCl pH 1 (1M), diluita con acqua ed estratta con etilacetato. La fase organica è stata anidrificata con magnesio solfato, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato si ottengono 32,7 mg di prodotto puro. La resa in questo caso è dell' 83%.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 6.09 (m, 1H), 5.36 (ddd, 1H), 5.25-5.16 (m, 2H), 5.13 (s, 2H), 4.77 (dt, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.42 (d, 2H), 2.45-2.39 (m, 2H), 2.35-2.25 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.79 (s, 3H).

Sintesi 5-tiovaleratodigliceride 8-(Oallil)-micofenolato

15 mg di acido 8-(Oallil)-micopenolico (0,042 mmol) sono stati aggiunti ad una soluzione di 3 mL di diclorometano con 13 mg di dicitloesilcarbodimmide (0,063 mmol) e 5 mg di 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0,042 mmol). In ultimo alla reazione sono stati aggiunti 24 mg di 2-(5-tiovalerato)-digliceride (0,035 mmol). Dopo 24 ore la reazione è stata diluita con diclorometano e trattata con acqua basica (HCO_3^-), anidrificata con magnesio solfato, filtrata e portata a secco *in vacuo*. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, ottenendo così 15 mg di prodotto la cui resa è del 42 %.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.09 (ddt, 1H), 5.37 (d, 1H), 5.28 – 5.15 (m, 3H), 5.13 (s, 2H), 4.78 (d, 2H), 4.32 – 4.25 (dd, 2H), 4.13 (dd, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.41 (d, 2H), 2.83 (t, 2H), 2.33 – 2.25 (m, 8H), 2.18 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.70 – 1.64 (m, 2H), 1.26 (d, 48H), 0.93 – 0.80 (m, 6H).

Sintesi del profarmaco 5-tiovaleratodigliceride micofenolato

18 mg di 5-tiovalerato digliceride 8-(Oallil)-micofenolato (0,017 mmol) sono stati sciolti in diclorometano 1 mL con Pd⁰ (13 mg, 0,0017 mmol) e 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) (0,5 mg, 0,0034 mmol). Dopo un'ora la reazione è stata filtrata con un tampone di silice utilizzando etilacetato come eluente. Dal grezzo di reazione purificato su colonna cromatografica con gel di silice usando come eluente esano in gradiente di etilacetato, si ottengono 16 mg di prodotto con una resa del 95 %.

¹H NMR (CDCl₃) δ 5.28 – 5.21 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.29 (dd, 2H), 4.13 (dd, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.38 (d, 2H), 2.83 (t, 2H), 2.65 – 2.57 (m, 2H), 2.37 – 2.25 (m, 4H), 2.14 (s, 3H), 1.79 (s, 3H), 1.73 – 1.52 (m, 2H), 1.35 – 1.23 (m, 48H), 0.87 (t, 6H).

Prove di stabilità chimica ed enzimatica dei profarmaci galattosilati

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

Sistema HPLC

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

Per il Flugal, Okigal, Ibugal, Indogal ed i loro rispettivi *parent drugs* la fase mobile è costituita da acetonitrile ed una soluzione acquosa di acido fosforico 1 mM (pH 3) nel rapporto di 68:32. Il flusso è di 1 mL/min, con un volume di iniezione di 20 µL. Tutti i reattivi e i solventi utilizzati sono di grado analitico. L'acqua distillata e demonizzata è stata purificata mediante un Milli Q system (Millipore). La lunghezza d'onda utilizzata è 313 nm.

Per il Mefegal la fase mobile è costituita da metanolo ed una soluzione acquosa di acido fosforico 2 mM (pH 3) nel rapporto di 90:10. Il flusso è di 1 mL/min. La lunghezza d'onda utilizzata è 280 nm.

Per il Diclogal la fase mobile è costituita da acetonitrile ed una soluzione acquosa di acido formico 0.1% mM (pH 3) nel rapporto di 80:20. Il flusso è di 1 mL/min. La lunghezza d'onda utilizzata è 275 nm.

I tempi di ritenzione dei composti sono: Flurbiprofene (11 min), Flugal (6 min); Ketoprofene (7 min), Okigal (9 min); Ibuprofene (7 min), Ibugal (16 min); Indometacina (6.2 min), Indogal (4.6 min); Acido Mefenamico (3.2 min), Mefegal (2.6 min); Diclofenc (2.9 min), Diclogal (1.8 min).

Esperimenti farmacologici

Gli animali utilizzati per lo studio della gastrolesività e per gli esperimenti di attività farmacologica, sono topi maschi CD1 di 20-25 g di peso, acquistati presso Harlan Italy (San Pietro al Natisone, UD, Italy). Vengono tenuti in gabbia (24×72×12 cm), in gruppi di 5-6, con cibo e acqua. Le condizioni ambientali vengono mantenute a temperatura costante di circa 24°C, con un valore di umidità del 65%, e con cicli di luce/buio di 12 ore.

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

Test dell'Edema da Carragenina

L'attività anti-infiammatoria è stata testata mediante il test dell'edema da carragenina. I topi sono stati divisi in gruppi da quattro. L'edema viene indotto sulla zampa anteriore sinistra mediante iniezione sub-plantare di 20 µL di soluzione salina contenente l'1% di Carragenina. L'andamento temporale dell'edema è stato monitorato con un idropletismometro per topi ai seguenti intervalli di tempo dopo l'induzione: 0, 2, 4, 6, 24, 48, 72 ore. L'incremento di volume della zampa misurato per ciascun punto di osservazione ed il volume basale della zampa misurato immediatamente prima dell'induzione dell'edema (Δ volume in mL). In tale modello sperimentale si sviluppano due fasi: una prima fase acuta di 6 ore ed una seconda fase cronica fino a 72 ore.

Trasporto linfatico dei profarmaci dell'acido micofenolico

Preparazione di campioni di linfa

Le analisi all'HPLC-MS delle concentrazioni di acido micofenolico libero nella linfa sono state effettuate aggiungendo 640 μL acetonitrile a 20 μL di campioni di linfa e vortexati per 0.5 min. Successivamente l'aggiunta di 140 μL di acqua promuove la solubilizzazione del farmaco. In ultimo i campioni sono stati vortexati per un minuto, centrifugati a 4500 g per cinque minuti e 150 μL di supernatate analizzati per mezzo di HPLC-MS. Per l'analisi dei profarmaci, 20 μL di campioni di linfa sono stati diluiti in 1:20 o 1:40 v/v con acetonitrile, vortexati per 1 minuto, centrifugati a 4500 g per 5 minuti e 150 μL di supernatante analizzato all'HPLC-MS. Considerando che il gliceride *prodrug* è soggetto a risintesi con acidi grassi sconosciuti nell'enterocita, generando una varietà di gliceridi derivati dell'immunosoppressore, è stato adoperato un metodo per quantizzare il contenuto di derivati dell'acido micofenolico nella linfa. In breve a 20 μL di campione è stato aggiunto 140 μL 0.5 M NaOH in 1:1 (v/v) etanolo:acqua e riscaldato a 80 °C per 5 min. Successivamente, 70 μL di 1 M HCl in acqua sono stati aggiunti ad ogni campione per fermare l'idrolisi. Dopo il vortex per 0.5 minuti, un'aliquota di 70 μL del campione è stata diluita con 930 μL fase mobile, vortexata per un altro minuto, centrifugata a 4500 g per 5 minuti e 150 μL di supernatante analizzato all'HPLC-MS.

Preparazione di campioni di plasma

Per la determinazione della concentrazione di acido micofenolico nel plasma, a 20 μL di plasma sono stati aggiunti a una soluzione di 10 μL di uno standard interno (IS) (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ketoprofene in 1:1 (v/v) acetonitrile-acqua) e vortexato per 0.5 minuti. Le proteine plasmatiche sono precipitate per mezzo di 170 μL di una soluzione di solfato di ammonio saturo e vortex di 0.5 min. Al campione sono stati poi aggiunti 400 μL di acetonitrile, nuovamente vortexato per 0.5 minuti e centrifugato a 10600 g per 5 minuti. 150 μL di supernatante sono stati utilizzati per l'analisi.

Per determinare le concentrazioni plasmatiche dei due profarmaci è stato prelevato 100 μL di plasma, unito con 5 μL di soluzione IS e vortexato per 0.5 minuti. Le proteine plasmatiche sono precipitate per mezzo di 50 μL di una soluzione di solfato di ammonio saturo e vortex di 0.5 minuti. Al campione sono stati poi aggiunti 250 μL di acetonitrile, nuovamente vortexato per 0.5 minuti e centrifugato a 10600 g per 5 minuti. 150 μL di supernatante sono stati utilizzati per l'analisi.

Analisi HPLC-MS

L'HPLC-MS utilizzato è stato uno Shimadzu LC-MS 2010 system (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan) costituito da un CBM-20A system controller, un DGU-20A5 solvent degasser, due LC-20AD pumps, un SIL-20AC autosampler, un CTO-20A column oven (mantenuto a 40°C), un SPD-20A UV/Vis detector, e uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo con un electrospray ionization interface (ESI). La curved desolvation line (CDL) e l'heat block sono stati mantenuti a 250°C and 200°C rispettivamente. Interfaccia, CDL e il voltaggio del detector è stato 4.5 kV, -50.0 V e 1.5 kV, rispettivamente.

BIBLIOGRAFIA

1. Stella V. J., "Prodrugs: challenges and rewards". **2007**;
2. Stanczak A.; Ferra A.; "Prodrugs and soft drugs". *Pharmacol Rep.* **2006**, 58, 599-613.
3. Wermuth C.G., "Le applicazioni della chimica farmaceutica". **2000**, EdiSES, Napoli.
4. Arends I., "Green Chemistry and Catalysis", **2007**.
5. Scott T. Handy "Ionic liquids – Classes and Properties", **2011**.
6. John S. Wilkes "A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents", *Green Chemistry*, **2002**, 4, 73–80.
7. Andreas Heintz "Ionic liquids: A most promising research field in solution chemistry and thermodynamics", *Pure Appl. Chem.*, **2006**, Vol. 78, No. 8, pp. 1587–1593.
8. Tom Welton, "Ionic Liquids in Catalysis".
9. Christopher I., "Esterification reactions in ionic liquids. The efficient synthesis of ferrocenyl esters in the ionic liquids [bmim][BF₄] and [bmim][PF₆]", *Green Chemistry*, **2002**, 4, 159–160
10. Thomas Eissing, "A computational systems biology software platform for multiscale modeling and simulation: integrating whole-body physiology, disease biology, and molecular reaction networks.", *Frontiers in Physiology, Computational Physiology and Medicine*, **2011**, Vol. 2.
11. Lemke T.S.; Williams D.A. "Foye's Principi di Chimica Farmaceutica". V Edizione italiana condotta sulla VI americana a cura di F. Dall'Acqua e S. Cafieri. **2010**, PICCIN, Padova.
12. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. "Farmacologia". III edizione. Edizione italiana a cura di Alfredo Gorio e Annamaria Di Giulio. **2005**.
13. Laudanno O.M., "In vivo selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal ulcers in rat". *Dig Dis Sci.* **2000**, 45(7), 1359-6.

14. Goodman and Gilman *“Le Basi Farmacologiche della Terapia”*. IX Edizione. McGraw-Hill, **2000**.
15. Sultan A., *“Single dose oral flurbiprofen for acute postoperative pain in adults”*. *The Cochrane Database System Review*. **2009**, 3.
16. Katzung, B.G. *“Farmacologia generale e clinica”*. V Edizione italiana sulla VIII di lingua inglese. **2003**, PICCIN, Padova.
17. Todd P. A., *“Oxaprozin. A Preliminary Review of Its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy”*. *Drugs*. **1986**, 32(4), 291-312.
18. Cooper S.A., *“Five studies on ibuprofen for postsurgical dental pain”*. *Am J Med*. **1984**, 77(1A), 70-7.
19. MacDonald T.M., *“Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin”*. *Lancet*. **2003**, 361(9357), 573-4.
20. Kimmel S.E., *“The effects of nonselective non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory medications on the risk of nonfatal myocardial infarction and their interaction with aspirin”*. *J Am Coll Cardiol*. **2004**, 43(6), 985-90.
21. Patel T.N., *“Use of aspirin and ibuprofen compared with aspirin alone and the risk of myocardial infarction”*. *Arch Intern Med*. **2004**, 164(8), 852-6.
22. Patent: US 2011212904. International Publication Date: 01/09/2011. *“Galactosylated prodrugs of non-steroidal anti-inflammatories with improved pharmacokinetic characteristics and reduced toxicity of the starting drug”*.
23. Celli J., *“Viscoelastic Properties and Dynamics of Porcine Gastric Mucin”*. **2005**, 6 (3), pp 1329–1333.
24. Yusuf S., *“Correlation of gastric mucosal damage with sialic acid profile in rats: effect of hydrochloric acid, pepsin and hypertonic saline”*. **2005**; 23: 339–345.
25. Curcio A., *“Galactosyl Prodrug of Ketorolac: Synthesis, Stability, and Pharmacological and Pharmacokinetic Evaluations”*. *J. Med. Chem*. **2009**, 52(12), 3794-3800.

26. Mueckler M., “Facilitative glucose transporters”. *Eur J Biochem.* **1994**, 219, 713-725.
27. Smith T.A., “Facilitative glucose transporter expression in human cancer tissue”, *Br J Biomed Sci.* **1999**, 56(4), 285-292.
28. Baldwin S.A., “Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins”. *Biochim. Biophys. Acta.* **1993**, 1154, 17–49
29. Amidon e Sadée “Membrane transporters as Drug Targets”. **1999**.
30. Melisi D., “D-Galactose as a Vector for Prodrug Design.” *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, 11, 2288-2298.
31. Trevaskis N.L., “Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update” *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, 60, 702–716.