



# Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN  
"SCIENZE FARMACEUTICHE"

CICLO XXIII

COORDINATORE Prof. Manfredini Stefano

SVILUPPO DI NUOVE FORMULAZIONI  
DI MOLECOLE ATTIVE

SUL SISTEMA DOPAMINERGICO A LIVELLO CENTRALE

Settore Scientifico Disciplinare CHIM/09

**Dottorando**

Dott.ssa Strada Mariangela

**Tutore**

Prof. Dalpiaz Alessandro

Anni 2008/2010

---

## **INDICE**

<b>CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<b>1.1 LE FORMULAZIONI A RILASCIO MODIFICATO</b>	<b>2</b>
1.1.1 Potenziali vantaggi delle formulazioni a rilascio modificato	2
1.1.2 La ricerca e lo sviluppo di un nuovo farmaco: fasi, costi e normativa	2
<b>1.2 IL SISTEMA DOPAMINERGICO</b>	<b>6</b>
1.2.1 Organizzazione e funzioni a livello del Sistema Nervoso Centrale	6
1.2.2 I recettori dopaminergici	8
1.2.3 Patologie legate al sistema dopaminergico	8
<b>CAPITOLO 2 - IL MORBO DI PARKINSON</b>	<b>10</b>
<b>2.1 EZIOPATOGENESI</b>	<b>10</b>
<b>2.2 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO E NEUROPROTETTIVO</b>	<b>13</b>
<b>2.3 I FARMACI PIU' IMPIEGATI: POTENZIALITA' E LIMITI</b>	<b>15</b>
2.3.1 Dati di consumo in Italia dei farmaci antiparkinson	15
2.3.2 Efficacia terapeutica della levodopa	16
2.3.3 Complicazioni legate al trattamento a lungo termine con la levodopa	18
2.3.4 Nuovi sviluppi formulativi per rimediare alle complicazioni legate al trattamento con la levodopa	20
<b>CAPITOLO 3 - STUDIO DI INCAPSULAMENTO DELLA DOPAMINA IN MICROPARTICELLE LIPIDICHE</b>	<b>23</b>
<b>3.1 INTRODUZIONE</b>	<b>23</b>
<b>3.2 PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>24</b>
3.2.1 Materiali	24
3.2.2 Chimica	24
3.2.3 Sintesi del profarmaco della dopamina 3,4-O-Divaleroildopamina (DVD)	25
3.2.3.1 N-terbutilossicarbonildopamina	25
3.2.3.2 N-terbutilossicarbonil-3,4-O-divaleroildopamina	25
3.2.3.3 3,4-O-divaleroildopamina cloridrato	25

---

3.2.4	Analisi HPLC della dopamina e del profarmaco DVD	26
3.2.5	Preparazione delle microparticelle lipidiche	27
3.2.6	Analisi del contenuto delle microparticelle in dopamina e profarmaco DVD	27
3.2.7	Dissoluzione <i>in vitro</i> e studi di rilascio dalle microparticelle	27
3.2.8	Caratterizzazione delle microparticelle	28
3.2.9	Analisi cinetiche in acqua e tampone fosfato	28
3.2.10	Analisi cinetiche in plasma umano	28
<b>3.3</b>	<b>RISULTATI</b>	29
3.3.1	Stabilità della dopamina e studi di microincapsulamento	29
3.3.2	Preparazione del profarmaco DVD e studi di idrolisi	31
3.3.3	Incapsulamento del profarmaco DVD nelle microparticelle lipidiche	32
3.3.4	Studi di stabilità del profarmaco DVD incapsulato	34
<b>3.4</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	35
<b>3.5</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	36
 <b>CAPITOLO 4 - STUDI DI STABILITA' DI UN CONIUGATO DELL'ASPIRINA CON LA VITAMINA C</b>		37
<b>4.1</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	37
<b>4.2.</b>	<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	38
4.2.1	Materiali	38
4.2.2	Analisi HPLC	38
4.2.3	Studi di stabilità in tampone, plasma umano e sangue intero	39
<b>4.3</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	39
<b>4.4</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	44
 <b>CAPITOLO 5 - LA SCHIZOFRENIA</b>		45
<b>5.1</b>	<b>EZIOPATOGENESI</b>	45
<b>5.2</b>	<b>TRATTAMENTO FARMACOLOGICO</b>	47
<b>5.3</b>	<b>I FARMACI PIU' IMPIEGATI: POTENZIALITA' E LIMITI</b>	48
5.3.1	Dati di consumo in Italia dei farmaci antipsicotici	48
5.3.2	Complicazioni legate al trattamento con gli antipsicotici	48
5.3.3	Nuovi sviluppi formulativi per rimediare alle complicazioni legate al trattamento con gli antipsicotici	51
5.3.4	Potenziati vantaggi di una formulazione a rilascio modificato: il caso specifico della quetiapina	52
5.3.4.1	Limiti nell'uso della quetiapina come antipsicotico	52
5.3.4.2	Attività antidepressiva del metabolita della quetiapina N-desalchilquetiapina (norquetiapina)	54

---

<b>CAPITOLO 6 - STUDI DI CONFRONTO DEL PROFILO FARMACOCINETICO TRA LE DUE FORMULAZIONI A RILASCIO IMMEDIATO E PROLUNGATO DELLA QUETIAPINA</b>	<b>58</b>
<b>6.1 INTRODUZIONE</b>	<b>58</b>
<b>6.2 PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>59</b>
6.2.1 Analisi LC/MS/MS della quetiapina e del suo metabolita norquetiapina	59
6.2.1.1 Materiali	59
6.2.1.2 Condizioni strumentali	59
6.2.1.3 Preparazione delle soluzioni standard	61
6.2.2 Studi di farmacocinetica	61
<b>6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>62</b>
6.3.1 Confronto del profilo plasmatico della quetiapina tra le due formulazioni	62
6.3.2 Confronto del profilo metabolico della quetiapina tra le due formulazioni	64
<b>6.4 CONCLUSIONI</b>	<b>66</b>
 <b>CAPITOLO 7 - BIBLIOGRAFIA</b>	 <b>68</b>
 <b>CAPITOLO 8 - PUBBLICAZIONI RELATIVE AL TRIENNIO DI DOTTORATO</b>	 <b>85</b>
 <b>8.1 PUBBLICAZIONI SU RIVISTE NAZIONALI ED INTERNAZIONALI</b>	 <b>85</b>
<b>8.2 COMUNICAZIONI A CONGRESSI E SCUOLE</b>	<b>85</b>

## **1. INTRODUZIONE**

Da alcuni anni il mercato del settore farmaceutico vive una fase in cui, nonostante il progresso scientifico in campi quali quello delle biotecnologie, l'immissione in commercio di nuove molecole è sempre più limitata mostrando un declino sostanziale nel numero dei farmaci approvati (*The Lancet, 2011*).

La tendenza negli ultimi anni delle grandi aziende farmaceutiche è infatti quella di investire maggiormente sull'ottimizzazione di formulazioni di molecole già note e di riconosciuta efficacia clinica al fine di migliorarne l'impiego in terapia. Molto spesso la presenza di effetti collaterali, la complessa somministrazione giornaliera e il non raggiungimento in concentrazioni ottimali nel sito attivo rappresentano dei limiti nell'uso di formulazioni a rilascio convenzionale.

Nell'ambito della ricerca e lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici, il Sistema Nervoso Centrale (SNC) rappresenta un importante target considerato il suo ruolo nella regolazione delle funzioni vitali. Tra i sistemi di neurotrasmissione, il sistema dopaminergico è quello maggiormente implicato nella manifestazione di malattie spesso gravi e debilitanti a livello del SNC quali il Morbo di Parkinson e la schizofrenia.

Anni di ricerca hanno permesso di scoprire e sviluppare molecole di riconosciuta efficacia per il trattamento di queste malattie offrendo un potenziale miglioramento della qualità della vita per i pazienti. Purtroppo a causa della presenza della barriera ematoencefalica (BEE), del metabolismo periferico e della mancata selettività regio specifica, non sempre l'efficacia farmacologica si traduce in un'efficacia terapeutica e sono quindi necessari degli studi farmaceutici formulativi volti a migliorare l'impiego di queste molecole. In questa tesi verrà discusso come le formulazioni a rilascio modificato possano rappresentare un esempio di progresso di efficacia terapeutica.

## **1.1 LE FORMULAZIONI A RILASCIO MODIFICATO**

### **1.1.1 Potenziali vantaggi delle formulazioni a rilascio modificato**

L'inadeguata aderenza al trattamento da parte del paziente, a causa di un numero eccessivo di somministrazioni e per la comparsa di effetti collaterali, e il mancato effetto terapeutico, per un'inadeguata concentrazione a livello del sito d'azione, rappresentano dei potenziali limiti per le formulazioni a rilascio convenzionale che condizionano spesso il successo terapeutico di un trattamento farmacologico (*Claxton et al., 2001; Gray et al., 2002; Osterberg e Blaschke, 2005*).

Le formulazioni a rilascio modificato, rispetto a quelle convenzionali, consentono un controllo del tempo, della velocità e del luogo di rilascio del principio attivo, fattori che possono condizionarne notevolmente la risposta terapeutica. Con la progettazione di formulazioni a rilascio modificato è possibile infatti ottenere un controllo del livello ematico del principio attivo e un miglioramento della disponibilità a livello del sito d'azione, ridurre il numero di somministrazioni giornaliere, evitare i fenomeni di sovra e sotto dosaggio e minimizzare gli effetti indesiderati. Queste potenzialità possono offrire interessanti vantaggi terapeutici rispetto alle formulazioni convenzionali.

È importante inoltre evidenziare come le formulazioni a rilascio modificato richiedono per le aziende farmaceutiche dei costi di sviluppo inferiori rispetto all'immissione in commercio di molecole nuove: è stato infatti stimato che le spese per modificare un farmaco esistente si aggirano intorno a 1/3 delle spese totali per la ricerca e sviluppo di un nuovo farmaco in quanto è richiesto un processo semplificato e meno articolato. Non a caso i 2/3 dei farmaci approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) non sono nuovi principi attivi ma modifiche di molecole già autorizzate (*US Congressional Budget Office, 2006*).

### **1.1.2 La ricerca e lo sviluppo di un nuovo farmaco: fasi, costi e normativa**

Per la ricerca e lo sviluppo di una nuova molecola è stato stimato un costo medio per le aziende farmaceutiche di 802 milioni in 2000 dollari e un tempo di 12 anni (*DiMasi et al., 2003*).

Analizzando più in dettaglio il processo, la vita di un farmaco ha inizio con la scoperta di una serie di molecole potenzialmente attive che vanno incontro a lunghi anni di sperimentazione per testare la loro efficacia e sicurezza *in vivo*, ma mediamente solo

---

una su 5-10 mila molecole arriva con successo alla fine del processo. Sono necessari circa 12 anni per poter sviluppare l'idea di una molecola con potenziale terapeutico in un prodotto presente nel mercato farmaceutico. Questo lungo periodo è diviso in una serie di fasi (Figura 1):

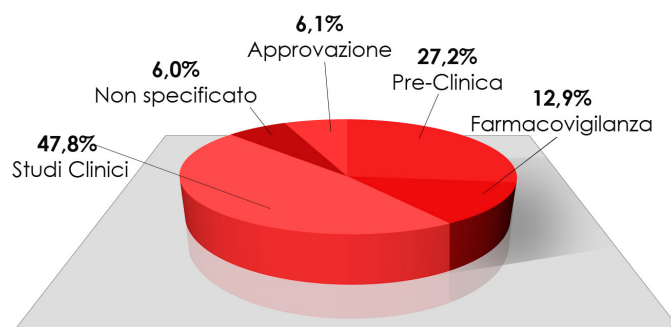
- I. Ricerca di base;
- II. Sviluppo preclinico;
- III. Richiesta di autorizzazione alla sperimentazione clinica;
- IV. Sviluppo clinico (fase clinica 1, 2 e 3);
- V. Richiesta di autorizzazione di immissione in commercio;
- VI. Produzione su larga scala e commercializzazione
- VII. Farmacovigilanza (fase clinica 4) (European commission, 2005).

Figura 1. Processo di ricerca e sviluppo di un farmaco dalla scoperta all'immissione in commercio

ANNO	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
DOCUMENTAZIONE NECESSARIA				richiesta di autorizzazione alla sperimentazione clinica							richiesta di autorizzazione all'immissione in commercio (AIC)		ottenimento dell'AIC
NORMATIVA			GLP				GCP						GMP
RICERCA E SVILUPPO	ricerca iniziale e identificazione del target	scoperta del farmaco e sviluppo preclinico		sviluppo clinico									produzione su larga scala FASE 4
N° DI SOSTANZE	> 10.000	100	10	2-3	1		1		1				1

Come si può osservare in Figura 2, gli investimenti della ricerca e sviluppo sono incentrati principalmente nella fase di sperimentazione clinica ([www.farmaindustria.it](http://www.farmaindustria.it)).

Figura 2. Suddivisione in percentuale degli investimenti per le diverse fasi della ricerca e sviluppo



La possibilità di commercializzare un prodotto farmaceutico è subordinata ad un'autorizzazione di immissione in commercio (AIC) concessa rispettivamente dalla

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) per l'Europa e dalla Food and Drug Administration (FDA) per gli USA, dopo un'attenta e scrupolosa valutazione dei Dossier Registrativi che raccolgono tutta la documentazione relativa a test farmaceutici (fisico-chimici, biologici e microbiologici), test preclinici (tossicologici e farmacologici) e studi clinici come definito nell'articolo 8 (3) della direttiva 2001/83/EC includendo la letteratura di riferimento e le pubblicazioni scientifiche come dati di supporto (*European commission, 2005*).

Le agenzie internazionali devono anche verificare l'ottemperamento delle aziende ad una serie di normative volte a garantire la qualità del prodotto e la sicurezza nel suo utilizzo. Caratteristica peculiare di queste normative è la costante presenza sin dalle prime fasi della ricerca fino a quella prettamente commerciale (*Figura 1*). Più in dettaglio si parla di:

- Good Laboratory Practices (GLP): garantiscono all'interno della ricerca di base e dello sviluppo preclinico una condotta corretta nei laboratori di ricerca fornendo informazioni relative al personale, alla manutenzione delle attrezzature, al protocollo di studio, alla documentazione e al trattamento degli animali;
- Good Clinical Practices (GCP): garantiscono la condotta eticamente corretta nella fase dello sviluppo clinico con l'obiettivo principale di tutelare gli individui che si sottopongono alla sperimentazione dopo essere stati adeguatamente informati e aver dato il consenso al trattamento;
- Good Manufacturing Practices (GMP): in materia di qualità del prodotto farmaceutico, l'industria deve poter disporre di un sistema di *Quality Assurance*, ovvero di garanzia di qualità, che prevede l'adozione di queste norme per una produzione conforme agli standard di qualità. In particolare, esse stabiliscono che:
  - i processi di produzione devono essere ben definiti e sistematicamente rivisti;
  - deve essere garantito il training e l'adeguatezza del personale, dei luoghi, del materiale impiegato, dei contenitori, degli imballaggi, dello stoccaggio e dei trasporti;
  - istruzioni, responsabilità manageriali e procedure devono essere chiaramente definite e scritte in un linguaggio non ambiguo;
  - tutti i processi devono essere documentati;
  - ogni lotto deve poter essere rintracciato;
  - devono essere verificati gli eventuali reclami sul prodotto in vendita.

Tutti i proprietari di un'autorizzazione alla produzione devono disporre di un dipartimento specifico per tale scopo gestito da una persona qualificata. Il personale del controllo qualità deve: poter avere accesso all'area di produzione per rilevare campioni e fare le appropriate indagini mediante test convalidati, assicurare la corretta etichettatura di materie prime e prodotti e monitorare la stabilità del prodotto in accordo con procedure scritte. Tutte le fasi del controllo qualità devono essere documentate.



La valutazione sul prodotto finito deve tener conto di una serie di fattori quali: le condizioni di produzione, i risultati dei test eseguiti durante il processo, la revisione della documentazione relativa alla produzione (incluso il *packaging*), la conformità alle specifiche richieste e l'esame finale del prodotto confezionato (*European Commission, 1997*).

Recentemente il concetto di *Quality Assurance* ha subito un'evoluzione e ci si è resi conto che il controllo di qualità da solo non è sufficiente, ma che l'industria farmaceutica deve poter disporre di nuovi mezzi che oltre a verificare la qualità dei propri prodotti possono anche migliorarla. Si tratta di strumenti sviluppati dall'esperienza di persone come Walter Shewhart e Edward Deming che hanno individuato la necessità di adottare dei criteri statistici per controllare e ottimizzare il processo di produzione. In particolare si fa riferimento all'impiego di strumenti matematici come istogrammi, grafici e diagrammi causa-effetto che permettono di verificare la stabilità del processo e di ridurre la variabilità (*statistical process control*) e all'adozione di una strategia per ottenere la maggior efficienza e precisione in modo da poter ridurre i costi e gli sprechi (*design of experiment*). Quindi dalla semplice esecuzione di saggi convalidati sul prodotto si passa alla necessità di effettuare ispezioni seguite da eventuali correzioni durante il processo (*in-process control*) in modo da verificare e garantire la qualità del prodotto durante il processo stesso (*Wehrlé, 2007*).

L'ottemperamento ad una normativa così scrupolosa e l'esigenza di adottare nuovi strumenti per adattarsi all'evoluzione tecnologica del settore giustificano da una parte gli ingenti investimenti delle aziende per la ricerca e lo sviluppo e dall'altra come diventi sempre più difficile immettere sul mercato nuove molecole. Il 2010 è stato infatti definito un anno deludente per lo sviluppo di nuovi farmaci. Le cifre della European Medicines Agency, EMA, mostrano per il 2010, con un andamento che riproduce il 2009, un declino sostanziale nel numero dei farmaci approvati per uso umano e basati sulla valutazione delle autorizzazioni presentate per la commercializzazione (*The Lancet, 2011*).

Lo sviluppo di nuove formulazioni di molecole già autorizzate implica un processo semplificato rispetto a quello descritto in precedenza poichè non richiede di effettuare tutti gli studi, preclinici e clinici, volti a dimostrare l'efficacia e la tollerabilità del principio attivo in quanto già note, di conseguenza vengono ridotti i tempi e i costi necessari e semplificate le procedure per l'approvazione, da parte delle agenzie preposte, rispetto alla commercializzazione di nuove molecole.

## 1.2 IL SISTEMA DOPAMINERGICO

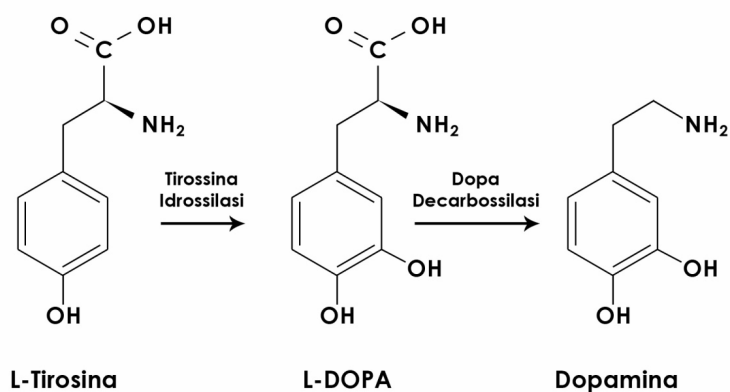
### 1.2.1 Organizzazione e funzioni a livello del Sistema Nervoso Centrale

Il coinvolgimento e l'importanza della dopamina come neurotrasmettitore nella regolazione di differenti funzioni fisiologiche a livello del SNC sono ben noti (*Vallone et al., 2000*).

La dopamina è un neurotrasmettitore catecolaminaergico che esplica la sua attività tramite l'attivazione di recettori dopaminergici specifici. Essa è prodotta in diverse aree del cervello, tra cui la sostanza nera e la zona ventrale tegmentale del mesencefalo (VTA). Grandi quantità si trovano nei gangli della base, soprattutto nel telencefalo, nel nucleo accumbens, nel tubercolo olfattorio, nel nucleo centrale dell'amigdala, nell'eminenza mediana e in alcune zone della corteccia frontale.

In dettaglio, la dopamina viene prodotta a partire dall'aminoacido L-tirosina mediante un processo di idrossilazione catalizzato dall'enzima tirosina idrossilasi, ottenendo l'intermedio L-DOPA, e una successiva decarbossilazione catalizzata dall'enzima dopa-decarbossilasi (*Figura 3*) (*Vallone et al., 2000*).

Figura 3. Sintesi della dopamina a partire dall'aminoacido L-tirosina



Nessun altro sistema neuronale ha ricevuto tanta attenzione negli ultimi anni quanto quello dopaminergico. La trasmissione dopaminergica è infatti quella maggiormente coinvolta nelle ipotesi dei deficit sensomotori, nei disturbi affettivi e psicotici e nella fisiopatologia delle sostanze d'abuso. Considerata infatti l'ampia distribuzione a livello cerebrale, la dopamina è coinvolta in una serie di processi quali: il comportamento, la cognizione, il movimento volontario, la motivazione, la punizione e la soddisfazione, la

produzione di prolattina (coinvolta nell'allattamento materno e nella gratificazione sessuale), il sonno, l'umore, l'attenzione, la memoria e l'apprendimento (*Vallone et al., 2000*).

Come si può osservare in *Figura 4*, i neuroni dopaminergici formano un sistema di neuromodulazione con origine nella sostanza nera, nella VTA e nell'ipotalamo e sono collegati tramite assoni ad ampie zone del cervello attraverso quattro percorsi principali (*Vallone et al., 2000*):

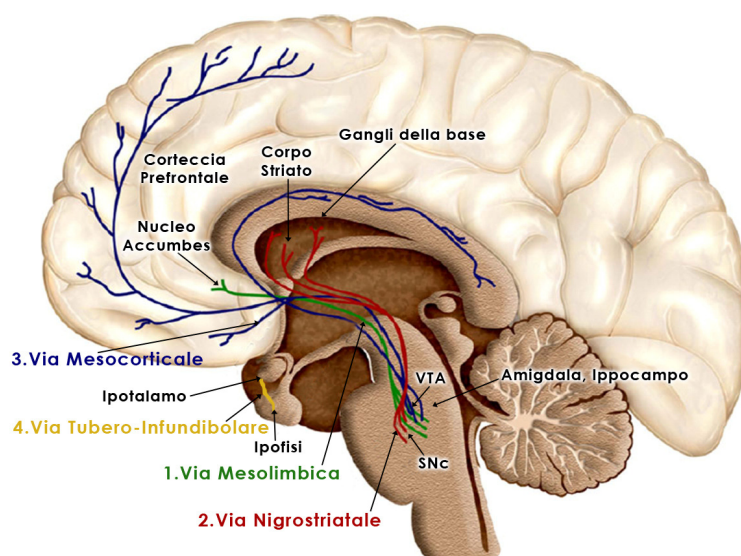
(1) La **Via Mesolimbica** collega la VTA al nucleo accumbens attraverso l'amigdala e l'ippocampo facenti parte del Sistema Limbico. Si pensa che questa via controlli il comportamento e in modo particolare produca delirio ed allucinazioni quando iperattiva. È anche la via che regola il senso della gratificazione ed è quindi coinvolta nei fenomeni di dipendenza (*Koob e Bloom, 1988*);

(2) La **Via Nigrostriatale** collega la sostanza nera al corpo striato ed è coinvolta nel controllo dei movimenti attraverso un circuito neuronale che verrà spiegato in dettaglio nel capitolo successivo (*Gerfen, 1992*);

(3) La **Via Mesocorticale** collega la VTA alla corteccia pre-frontale ed è coinvolta nel controllo di aspetti cognitivi quali l'apprendimento e la memoria (*Le Moal e Simon, 1992*);

(4) La **Via Tubero-Infundibolare** collega l'ipotalamo alla ghiandola pituitaria e controlla il rilascio di prolattina inibendolo (*Doppler, 1994*).

*Figura 4. Organizzazione a livello centrale del sistema dopaminergico*



### 1.2.2 I recettori dopaminergici

Le diverse azioni fisiologiche della dopamina sono mediate da 5 distinti sottotipi recettoriali accoppiati a proteine G. I 5 recettori sono stati isolati, caratterizzati e suddivisi in 2 sottofamiglie, D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub>, sulla base delle loro proprietà biochimiche e farmacologiche. In dettaglio, i recettori della sottofamiglia D<sub>1</sub> includono i D<sub>1</sub> ed i D<sub>5</sub> ed attivano l'enzima adenilato ciclasi; quelli della sottofamiglia D<sub>2</sub> includono, oltre ai D<sub>2</sub>, i recettori D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub> ed inibiscono l'adenilato ciclasi mentre attivano i canali del K<sup>+</sup> (*Vallone et al., 2000*).

I recettori D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> sono i più rappresentati rispetto ai membri della stessa sottofamiglia. In particolare il recettore D<sub>1</sub> è maggiormente espresso nel nucleo accumbens, tubercolo olfattorio, corteccia cerebrale e amigdala ed è sintetizzato dai neuroni striatali che mandano le loro proiezioni alla sostanza nera per via diretta (*Jackson e Westlind-Danielsson, 1994*). I recettori D<sub>2</sub> sono espressi in modo predominante nel tubercolo olfattorio, nucleo accumbens, nella sostanza nera pars compacta (SNc) e a livello della VTA con una localizzazione anche presinaptica, differentemente dai recettori D<sub>1</sub> che sono localizzati solo a livello postsinaptico (*Civelli et al, 1991*). Al di fuori del SNC, il recettore D<sub>2</sub> è localizzato a livello della retina, del rene, del sistema vascolare e della ghiandola pituitaria (*Ng et al., 1994; Jackson e Westlind-Danielsson, 1994; Picetti et al., 1997*).

L'azione della dopamina liberata nello spazio sinaptico viene rapidamente bloccata attraverso diversi meccanismi, quali il suo re-uptake da parte della terminazione nervosa da cui è stata liberata e la trasformazione enzimatica ad opera della monoaminoossidasi B (MAO di tipo B) o tramite la catecol-O-metiltrasferasi (COMT).

### 1.2.3 Patologie legate al sistema dopaminergico

Considerato il suo coinvolgimento nella regolazione di differenti funzioni fisiologiche a livello del SNC, un'alterazione del normale sistema di neurotrasmissione della dopamina è correlato ad una serie di patologie quali il Morbo di Parkinson, la Sindrome di Tourette, la schizofrenia, il disturbo da deficit dell'attenzione e iperattività (ADHD) e i tumori della ghiandola pituitaria (*Vallone et al., 2000*), malattie note da anni per cui anni di ricerca e sviluppo hanno permesso di ottenere farmaci efficaci che possono migliorare la qualità della vita dei pazienti ma che presentano una serie di criticità che limitano il loro impiego.

All'interno di questo contesto nel corso del mio dottorato di ricerca mi sono occupata di studiare i potenziali vantaggi, rispetto a quelle già in uso, di nuove formulazioni che riguardano il Morbo di Parkinson, mediante studi di ricerca di base universitari, e la schizofrenia, mediante valutazione di studi clinici nel corso della mia esperienza formativa presso l'azienda farmaceutica AstraZeneca S.p.A. Le due patologie, i relativi trattamenti farmacologici e gli studi condotti verranno descritti nei capitoli appositi.

## **2. IL MORBO DI PARKINSON**

### **2.1 EZIOPATOGENESI**

Il Morbo di Parkinson è una sindrome clinica caratterizzata da disturbi nel movimento quali tremore, rigidità, elementi di bradicinesia (lentezza nei movimenti), ipocinesia (riduzione dei movimenti), acinesia (mancanza di movimenti) e anormalità posturali (Marsden, 1994). Queste manifestazioni cliniche sono legate alla degenerazione dei neuroni dopaminergici della via nigrostriatale (Figura 4), cioè di quei neuroni che interconnettono i nuclei dei gangli della base (GB) situati alla base degli emisferi cerebrali e coinvolti nella regolazione del movimento (Marsden, 1994).

Il centro operativo dei GB è il corpo striato che riceve afferenze glutamatergiche dalla corteccia cerebrale e afferenze dopaminergiche dalla sostanza nera pars compacta (SNc). I principali neuroni efferenti striatali sono neuroni inibitori GABAergici. Esistono due distinte sottopopolazioni di neuroni GABAergici striatali che danno origine alle due principali vie neuronali attraverso le quali lo striato regola gli input eccitatori talamo-corticali: la via diretta (o striatonigrale) e la via indiretta (o striatopallidale). I neuroni GABAergici striatali della via diretta, che contengono anche sostanza P e dinorfina, proiettano direttamente al globo pallido interno/sostanza nera pars reticolata (Gpi/SNr) che, a loro volta, mandano afferenze GABAergiche al talamo ed al tronco encefalico. L'attivazione di questa via, attraverso la doppia stazione inibitoria GABAergica, determina disinibizione del talamo, conseguente aumento dell'attività eccitatoria glutamatergica talamo-corticale e facilitazione motoria. I neuroni GABAergici striatali della via indiretta, contenenti anche encefaline, proiettano, invece, indirettamente al Gpi/SNr attraverso un circuito tri-sinaptico: neuroni GABAergici striato-globo pallido esterno (Gpe), neuroni GABAergici Gpe – nucleo subtalamico (STN) e neuroni glutamatergici STN-Gpi/SNr. L'attivazione della via indiretta induce un aumento del controllo inibitorio esercitato dal Gpi/SNr sul talamo con conseguente riduzione degli input eccitatori talamo-corticali e riduzione dell'attività motoria.

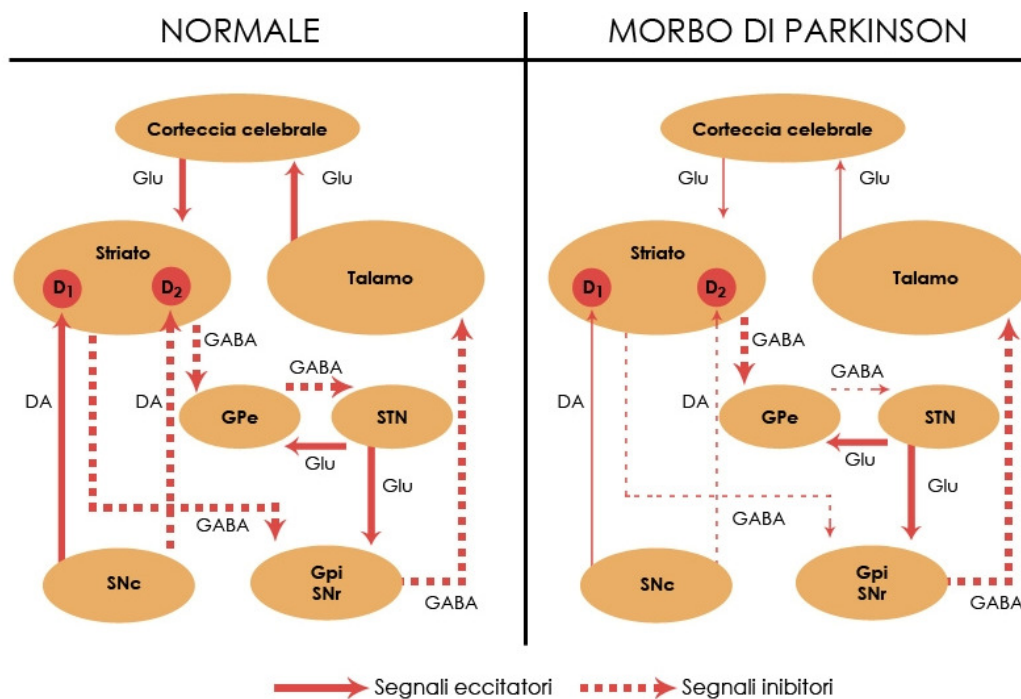
La dopamina rilasciata nello striato dai neuroni dopaminergici che hanno il corpo cellulare nella SNc, svolge un ruolo modulatore essenziale ed opposto sull'attività delle due vie: essa ha un'azione eccitatoria sui neuroni GABAergici della via diretta che esprimono recettori di tipo D<sub>1</sub> e un'azione inibitoria sui neuroni GABAergici della via indiretta, i quali esprimono recettori di tipo D<sub>2</sub>.

All'interno di questo circuito, sono coinvolti anche interneuroni colinergici che ricevono input modulatori glutamatergici talamo-corticali e input inibitori dopaminergici dalla SNc

ed esercitano un'azione eccitatoria sia sulla via diretta che sulla via indiretta (Pisani et al., 2003).

Nell'individuo sano, il rilascio di dopamina nello striato induce un'attivazione della via diretta, facilitante il movimento, ed un'inibizione della via indiretta, inibente invece il movimento, con conseguente facilitazione motoria (Figura 5).

Figura 5. Schema dell'organizzazione del sistema motorio extrapiramidale e dei difetti alla base del Morbo di Parkinson. DA: dopamina; GABA: acido γ-aminobutirrico; Glu: glutammato; Gpe: globo pallido esterno; GPi: globo pallido interno; SNc: sostanza nera pars compacta; SNr: sostanza nera pars reticolata; STN: nucleo subtalamico



La perdita del normale controllo dopaminergico nigrostriatale fa sì che nel Morbo di Parkinson, la via diretta non sia eccitata e che la via indiretta non sia inibita. Inoltre vengono meno gli input inibitori dopaminergici sugli interneuroni colinergici con conseguente iperattività colinergica (Pisani et al., 2003). Questo porta alla riduzione della trasmissione eccitatoria talamo-corticale, con conseguente perdita dell'attivazione delle aree corticali coinvolte nella programmazione e nella regolazione del movimento e quindi a difficoltà motoria.

Nel Morbo di Parkinson la degenerazione colpisce principalmente i neuroni dopaminergici della SNc, ma potrebbe interessare anche le cellule del locus ceruleus, dei nuclei dorsali del vago, dei nuclei basali del Meynert e di alcune strutture cerebrali catecolaminergiche inclusa la VTA (Damier et al., 1999).

La perdita di cellule nervose è accompagnata dalla presenza dei corpi di Lewy nei restanti neuroni, riconosciuti come un carattere distintivo del Morbo di Parkinson dal punto di vista anatomico-patologico. I corpi di Lewy sono inclusioni sferiche ialine che si formano in seguito ad un accumulo anomalo della proteina  $\alpha$ -sinucleina che diventa resistente alla degradazione intracellulare (*Wakabayashi et al., 2007; Greffard et al., 2010*). Con un meccanismo sconosciuto, i corpi di Lewy rendono i neuroni particolarmente sensibili allo stress ossidativo e quindi alla degenerazione (*Olanow e Tatton, 1999*).

E' interessante osservare come la presenza di corpi di Lewy anche a livello neocorticale è comune nei pazienti con Morbo di Parkinson con gravi perdite della memoria in cui si presentano delle manifestazioni simili all'Alzheimer (*Hurtig et al., 2000*).

Nonostante questa patologia sia riconosciuta come un disturbo sporadico, sono stati identificati una serie di fattori di rischio come quelli ambientali e una predisposizione genetica (*Lees et al., 2009*). In una serie di studi è stata infatti evidenziata un'associazione della malattia con: la presenza di un trauma cranico, l'obesità, la mancanza di attività fisica, l'ingestione di acqua di pozzo, l'esposizione ad erbicidi e insetticidi (quali paraquat, organofosfati e rotenone) e tossine ambientali come cianuro, toluene e l'1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina (MPTP; sottoprodotto della sintesi illecita della meperidina) (*Tanner, 2000; Elbaz e Tranchant, 2007; Thacker et al., 2008*). Inoltre, in pazienti con Morbo di Parkinson sono state evidenziate mutazioni a carico di 7 geni (ovvero Parkin, PINK1, DJ-1, ATP13A2,  $\alpha$ -synucleina, LRRK-2 e GBA) identificando la predisposizione genetica come un altro importante fattore di rischio. Il principale interesse è per le mutazioni a carico dei geni codificanti per la proteina  $\alpha$ -sinucleina, di cui si è parlato in precedenza, per la proteina chinasi LRRK-2 e per l'enzima lisosomiale glucocerebrosidasi (GBA) in quanto si pensa siano implicati nel meccanismo biochimico alla base del processo patogenetico (*Lees et al., 2009*).

Anche il trattamento con determinati farmaci è riconosciuto come una possibile causa, infatti l'uso di dopamino antagonisti (come la proclorperazina, metoclopramide e clorpromazina), dei calcio antagonisti e del sodio valproato può causare un parkinsonismo reversibile così come alcuni prodotti erboristici quali la Kava Kava o la Rauwolfia Serpentina (*Sourkes, 1999*). La citotossicità indotta dal glutammato, le disfunzioni mitocondriali, la neuroinfiammazione e l'apoptosi sono ancora da chiarire come possibili cause del Morbo di Parkinson (*Lees et al., 2009*).

Accanto a queste correlazioni dirette, alcuni studi hanno messo in evidenza un'associazione inversa tra lo sviluppo della malattia e il fumo (*Elbaz e Moisan, 2008*). Infatti, sia la nicotina che la caffeina aumentano il rilascio a livello striatale della dopamina e inoltre nei fumatori viene inibita l'attività dell'enzima monoaminoossidasi



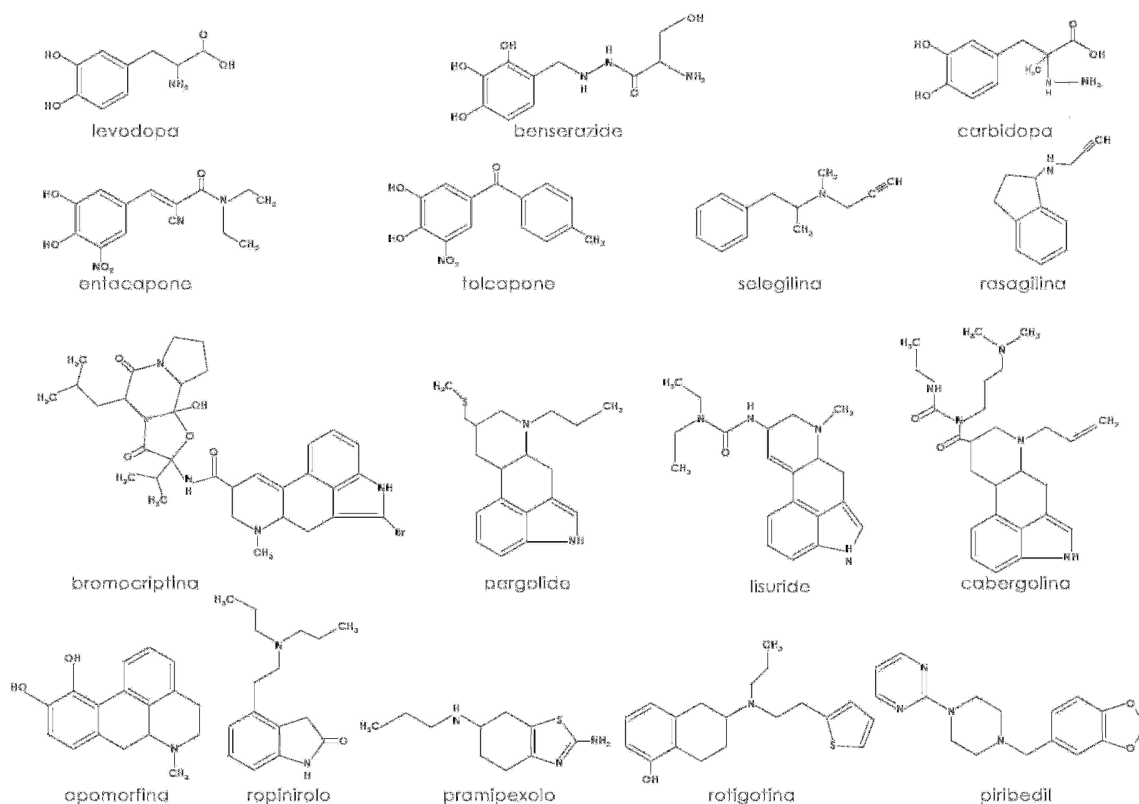
responsabile dello stress ossidativo (*Fowler et al., 1996*). La caffeina è un antagonista del recettore adenosinico  $A_{2A}$  ed è interessante osservare come una serie di composti appartenenti a questa classe hanno mostrato un potenziale come farmaci antiparkinson (*Jankovic, 2008*). Questa potenziale attività è legata al coinvolgimento nel circuito nigrostriatale anche dell'adenosina e della sua azione sui recettori  $A_{2A}$  presenti nella via indiretta che se stimolati inducono una riduzione dell'affinità dei recettori dopaminergici  $D_2$  per la dopamina (*Ongini e Fredholm, 1996*). Conseguentemente a questa interazione recettoriale  $D_2/A_{2A}$ , la somministrazione di un antagonista adenosinico potenzierebbe l'affinità del recettore  $D_2$  per la dopamina, il cui segnale, come è stato visto, è ridotto nel Morbo di Parkinson.

## 2.2 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO E NEUROPROTETTIVO

Considerata l'ipofunzionalità dopaminergica causata dalla degenerazione dei neuroni a livello del circuito nigrostriatale, l'obiettivo del trattamento farmacologico nel Morbo di Parkinson è aumentare il segnale della dopamina. La situazione ottimale sarebbe somministrare direttamente dopamina ma la sua impossibilità di passare la BEE, il suo elevato metabolismo epatico e la manifestazione di effetti indesiderati a livello periferico ne impediscono l'uso mediante somministrazione orale o periferica (*Jankovic, 2002*). In base a queste considerazioni, la terapia per il Morbo di Parkinson prevede di aumentare il segnale dopaminergico mediante la somministrazione dei seguenti farmaci (*Figura 6*):

- la levodopa, bioprecursore in grado di passare la BEE e trasformato in dopamina dall'enzima dopa-decarbossilasi (*Figura 3*), generalmente impiegato in associazione con un inibitore periferico delle dopa-decarbossilasi come carbidopa e benserazide per limitare gli effetti collaterali quali nausea, vomito e tachicardia dovuti alla trasformazione periferica della levodopa in dopamina (*Jankovic, 2002*);
- gli inibitori dell'enzima MAO di tipo B, quali selegilina e rasagilina, e dell'enzima COMT, quali entacapone e tolcapone, al fine di prevenire la degradazione e la disattivazione della dopamina;
- dopamino agonisti distinti in derivati di tipo ergolinico quali la bromocriptina, la pergolide, la lisuride e la cabergolina e quelli di tipo non ergolinico quali il ropinirolo, il pramipexolo, l'apomorfina, la rotigotina e il piribedil.

Figura 6. Farmaci impiegati per il Morbo di Parkinson



L'effetto terapeutico dei farmaci antiparkinson dopaminergici sembra dipendere dalla stimolazione dei recettori  $D_2$ , anche se la stimolazione contemporanea dei recettori  $D_1$  può essere richiesta per il raggiungimento dell'effetto farmacologico ottimale.

Accanto ai farmaci che aumentano il segnale della dopamina possono essere impiegati in terapia farmaci anticolinergici quali l'orfenadrina, la difenidramina e il biperidene. Si pensa infatti che gli anticolinergici, riducendo l'iperattività colinergica, possano correggere lo squilibrio tra la trasmissione dopaminergica e colinergica presente nel Morbo di Parkinson e descritta in precedenza (Sweeney, 1995; Standaert e Young, 1995; Olanow e Koller, 1998).

I trattamenti farmacologici descritti non sono risolutivi in quanto non permettono una guarigione ma curano i sintomi migliorando le prospettive di vita dei pazienti. Accanto ad un trattamento sintomatico, la neuroprotezione e quindi la prevenzione della degenerazione cellulare, alla base della patologia, rappresentano degli importanti target terapeutici (Marsden, 1994). A tal proposito, lo studio DATATOP (*Deprenyl and Tocopherol Antioxidative Therapy for Parkinsonism*) condotto in Nord America ha messo in evidenza come la selegilina, inibitore irreversibile delle MAO di tipo B, possa prevenire i danni causati dal metabolismo della dopamina dovuti allo stress ossidativo

e come sia in grado di prevenire la capacità della MPTP di causare un parkinsonismo sperimentale nei primati. In particolare lo studio è stato condotto in pazienti *de novo* con Parkinson al fine di valutare gli effetti della selegilina e della vitamina E (noto antiossidante). Il principale risultato ottenuto da questo studio è che un trattamento iniziale con la selegilina può ritardare significativamente l'uso della levodopa, risultato non ottenuto invece per la vitamina E sia da sola che in combinazione con la selegilina. Considerato che la selegilina di per sé ha una modesta azione sintomatica, è difficile definire se il ritardo nell'uso della levodopa sia da attribuire all'azione sintomatica della selegilina o al suo effetto neuroprotettivo (*The Parkinson Study Group, 1993*).

In aggiunta, la tossicità sia della levodopa che della dopamina è stata dimostrata ampiamente in vitro in cellule catecolaminergiche che vanno incontro a morte cellulare per necrosi e apoptosi in seguito alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), semichinoni e chinoni, fenomeno che verrà descritto più in dettaglio di seguito. A tal proposito è stato osservato che la vitamina C (acido ascorbico) protegge le cellule *in vitro* contro la tossicità da levodopa prevenendo la formazione o neutralizzando i radicali liberi (*Pardo et al., 1993*). È stato inoltre ipotizzato l'impiego di nanosfere di carbonio subito dopo il trattamento con la levodopa per la loro abilità di passare attraverso le membrane plasmatiche e di rimuovere i radicali liberi inibendo quindi la morte cellulare per stress ossidativo (*Corona-Morales et al., 2003*).

In base a queste evidenze, una terapia iniziale con molecole ad azione antiossidante potrebbe rallentare e ridurre la progressione della malattia (*Marsden, 1994*).

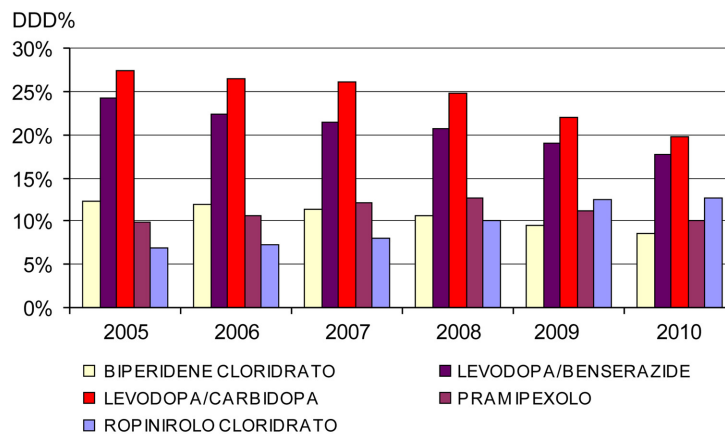
## **2.3 I FARMACI PIU' IMPIEGATI: POTENZIALITA' E LIMITI**

### **2.3.1 Dati di consumo in Italia dei farmaci antiparkinson**

La *Figura 7* riporta i 5 farmaci più impiegati tra gli antiparkinson in Italia. I dati di consumo fanno riferimento al periodo 2005 - 2010 (al 31 ottobre) e sono espressi in DDD. La DDD (acronimo di *Defined Daily Dose*) è un valore convenzionale stabilito internazionalmente per ogni principio attivo e rappresenta la dose media di un farmaco assunta giornalmente da un paziente adulto, con riferimento all'indicazione terapeutica principale del farmaco stesso. In dettaglio, il dato in DDD/1000/abitanti die esprime il volume prescrittivo dei farmaci consentendo di valutare quanti abitanti ogni 1000, in un determinato territorio (Italia) assumono quotidianamente il farmaco nell'arco di uno specifico periodo. In particolare è stato preso in considerazione il valore di DDD/1000/abitanti die per ogni principio attivo espresso in percentuale rispetto alle DDD/1000/die totali per l'intera classe terapeutica di appartenenza (DDD%). I dati sono

stati ottenuti in collaborazione con la Dott.ssa A. Campi e Dott.ssa A. Benini del Dipartimento Farmaceutico Interaziendale, U.O. Assistenza Farmaceutica AUSL di Ferrara, consultando la Banca Dati AIFA (progetto SFERA).

Figura 7. Consumo in Italia dei farmaci antiparkinson espresso in DDD/1000 abitanti die per ogni principio attivo come percentuale sull'intera classe terapeutica (DDD%) per il periodo 2005 - 2010 (al 31 ottobre)



Come si può osservare in *Figura 7*, la levodopa in associazione con un inibitore delle dopa decarbossilasi (carbidopa/benserazide) è ancora il farmaco più assunto tra gli antiparkinson anche se negli ultimi anni ha subito un calo nei consumi. Tra i dopamino agonisti, il ropinirolo ed il pramipexolo sono i farmaci più impiegati con un aumento in particolare del consumo dal 2008 per il ropinirolo. Tra gli anticolinergici il biperidene cloridrato rappresenta il farmaco più impiegato con una riduzione dell'impiego negli ultimi anni.

### 2.3.2 Efficacia terapeutica della levodopa

Dopo più di 40 anni dal suo uso in terapia, come dimostrato dai dati di consumo, la levodopa rimane il farmaco di elezione per il trattamento del Morbo di Parkinson per la sua efficacia nel controllo dei sintomi (*Olanow et al., 2004*). Confrontata con altre terapie dopaminergiche disponibili, il rimpiazzo della dopamina con la levodopa è infatti associato al maggiore miglioramento della funzione motoria come valutato dalla riduzione del punteggio nella scala UMPRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale) (*Poewe et al., 2010*), tale risultato è confermato da una serie di studi clinici che hanno confrontato l'efficacia della levodopa verso i dopamino agonisti quali il pramipexolo (*Holloway et al., 2004*), il ropinirolo (*Rascol et al., 2000*), la cabergolina (*Rinne et al., 1998*) e la pergolide (*Oertel et al., 2005*) in monoterapia.

Inoltre, accanto all'efficacia clinica, la levodopa è uno dei farmaci più tollerati per il trattamento del Morbo di Parkinson, soprattutto nella popolazione anziana (*Nutt e Wooten, 2005*).

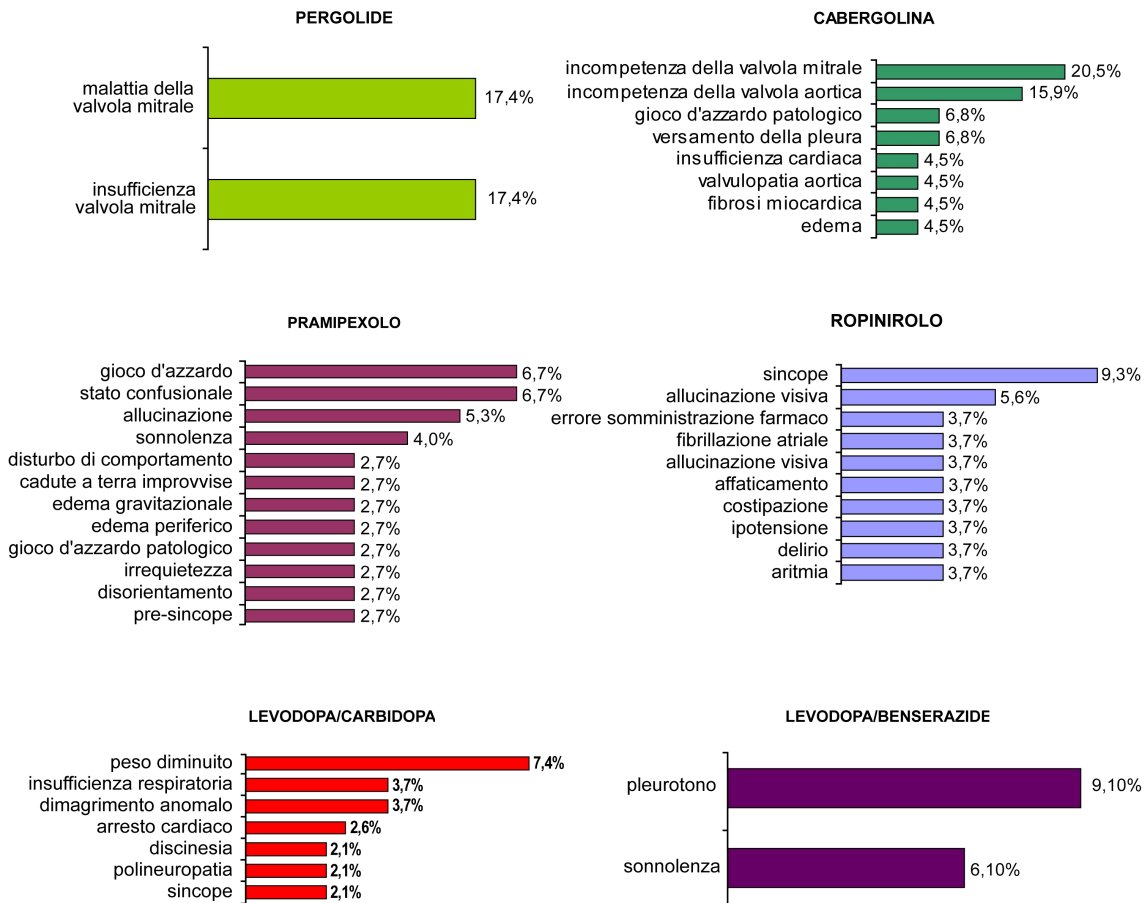
Nonostante la levodopa sia considerata il farmaco di scelta per il trattamento del Morbo di Parkinson per efficacia e tollerabilità, è comunque ben nota e dimostrata l'efficacia sintomatica dei dopamino agonisti, diversi studi infatti mettono in evidenza come l'uso precoce di questi farmaci come terapia iniziale sia associato ad una ridotta incidenza a lungo termine delle complicazioni motorie che si presentano invece con la levodopa (*Rascol et al., 2000; Parkinson Study Group, 2000; Holloway et al., 2004; Bracco et al., 2004 Oertel et al., 2005*). L'esatta ragione secondo la quale la monoterapia con i dopamino agonisti è associata ad un minore rischio di complicazioni motorie, in particolare le discinesie, comuni con il trattamento a lungo termine con la levodopa, non è del tutto chiara ma la principale ipotesi è che i dopamino agonisti presentando dei tempi di emivita più lunghi rispetto alla levodopa, consentono una più continua stimolazione dei recettori dopaminergici cerebrali, condizione necessaria per ridurre il rischio di complicazioni motorie, come verrà spiegato più in dettaglio di seguito (*Olanow et al., 2006; Cenci, 2007*).

Benché le evidenze cliniche abbiano portato a classificare i dopamino agonisti come trattamento di prima linea per la monoterapia iniziale in molte linee guida nazionali ed internazionali (*Horstink et al., 2006; Miyasaki et al 2002*), ci sono serie preoccupazioni riguardo il loro profilo di sicurezza nel lungo termine per il rischio di sviluppare disturbi comportamentali, mancato controllo degli impulsi, allucinazioni, edema periferico, sonnolenza giornaliera e fibrosi in corrispondenza delle valvole cardiache (*Antonini et al., 2009*).

Il riconoscimento infatti del rischio di valvulopatie ha portato le autorità regolatorie a limitare l'uso della cabergolina in molti paesi europei e a ritirare dal commercio la pergolide negli USA. Il meccanismo alla base di queste manifestazioni cardiache sembra essere legato all'agonismo di questi due derivati ergolinici per i recettori della serotonina 5-HT<sub>2B</sub> espressi a livello delle valvole cardiache (*Roth, 2007*).

A sostegno di quanto riportato in letteratura, la *Figura 8* mostra le principali reazioni avverse segnalate in Italia nel periodo 2005 - 2010 (al 31 ottobre) per la levodopa in associazione con carbidopa/benserazide, il ropinirolo, il pramipexolo e i due derivati ergolinici pergolide e cabergolina. I dati sono stati ottenuti in collaborazione con la Dott.ssa A. Campi e Dott.ssa A. Benini del Dipartimento Farmaceutico Interaziendale, U.O. Assistenza Farmaceutica AUSL di Ferrara, consultando la Banca Dati AIFA – Rete Nazionale di Farmacovigilanza.

Figura 8. Principali reazioni avverse segnalate in Italia per i dopamino agonisti pergolide, cabergolina, pramipexolo e ropinirolo e per levodopa in associazione a carbidopa/benserazide nel periodo 2005-2010



Così come indicato in letteratura, le principali reazioni avverse segnalate sono complicazioni a livello delle valvole cardiache per i derivati ergolinici pergolide e cabergolina e disturbi di tipo comportamentale e manifestazioni edematose per il ropinirolo e il pramipexolo, reazioni avverse non segnalate nel caso dell'associazione della levodopa con un inibitore periferico delle dopa-decarbossilasi (Figura 8).

### 2.3.3 Complicazioni legate al trattamento a lungo termine con la levodopa

Nonostante la comprovata efficacia clinica, il successo terapeutico della levodopa può essere condizionato dalla presenza di manifestazioni subdole legate all'impiego del farmaco per periodi relativamente lunghi quali le complicazioni motorie (discinesie tardive), le fluttuazioni nella risposta al trattamento che portano a fenomeni quali il *wearing-off* e *on-off* e un aumento dello stress ossidativo che può peggiorare il decorso neurodegenerativo della malattia.

L'origine delle complicazioni motorie è principalmente correlata alla perdita del meccanismo di autoregolazione a livello della sinapsi dopaminergica. Man mano che il processo neurodegenerativo progredisce, l'attività dopaminergica diviene dipendente dall'apporto esogeno della levodopa pertanto i fattori farmacocinetici che modificano la disponibilità centrale di levodopa-dopamina acquisiscono un'importanza singolare. In particolare, un'alterazione della risposta motoria al trattamento è da correlarsi al tempo di emivita relativamente breve della levodopa e al suo potenziale di indurre una stimolazione pulsatile dei recettori dopaminergici striatali, infatti, come anticipato in precedenza, gli agonisti dopaminergici con una lunga emivita hanno un ridotto rischio di complicazioni motorie in scimmie trattate con la MPTP (*Bédard et al., 1986; Pearce et al., 1998*).

Più in dettaglio, è stato visto che un trattamento intermittente a lungo termine con levodopa (tipico delle formulazioni convenzionali) è associato allo sviluppo di movimenti involontari (quali le discinesie) da attribuire ad un'eccessiva risposta alla dopamina (*Bordet et al., 1997*). Il meccanismo responsabile di questi cambiamenti nella risposta alla levodopa sembra essere legato, come osservato in ratti lesionati con 6-idrossidopamina (6-OHDA; agente in grado di indurre sintomi parkinsoniani in modelli di ratto), ad un'induzione dell'espressione del recettore D<sub>3</sub> che tra i sottotipi recettoriali è quello con la più alta sensibilità alla dopamina. Un aumento dei livelli del recettore D<sub>3</sub> potrebbe quindi essere la causa dell'aumentata risposta alla dopamina (*Bordet et al., 1997*).

Il *wearing-off* è generalmente il fenomeno che compare più precocemente e consiste in un calo della performance motoria dopo un periodo di tempo dal trattamento con levodopa che si risolve dopo la successiva somministrazione del farmaco. Il fenomeno è prevedibile da parte del paziente ed è strettamente legato ai livelli plasmatici della levodopa in quanto correlato ai ritmi di assunzione del farmaco stesso. I *wearing-off*, infatti, possono essere controllati garantendo costanti livelli plasmatici di levodopa mantenuti il più a lungo possibile sopra la soglia (*Stocchi et al., 2005*). Col passare del tempo le fluttuazioni motorie diventano inaspettate e casuali e quindi non più legate ai ritmi di somministrazione, portando all'effetto *on-off*, ovvero alla manifestazione di periodi *off* caratterizzati da intensa acinesia alternati a periodi *on* caratterizzati da una migliorata mobilità ma spesso anche da marcata discinesia (*Marsden, 1994*). Dato che la farmacocinetica del farmaco non cambia durante il corso degli anni e dato che nei primi anni la risposta è costante si ritiene che la comparsa di questo fenomeno sia dovuta alla modificazione della risposta farmacodinamica.

Come già anticipato in precedenza, altro fenomeno da prendere in considerazione nel corso del trattamento con la levodopa è l'aumento dello stress ossidativo, ovvero un aumento della produzione di ROS a livello dei mitocondri indotto dalla dopamina, di cui si evidenzia un aumento significativo a livello striatale dopo la somministrazione della

---

levodopa (Pandey et al., 2009). La dopamina striatale o i suoi metaboliti possono infatti generare ROS mediante diversi meccanismi così come la stimolazione dei recettori D<sub>2</sub> (Charvin et al., 2005). Una dose di 100 µM ma non di 10 µM di dopamina causa un aumento significativo del composto 2,3-acido diidrossibenzoico (DHBA) nei mitocondri. L'aumento del composto 2,3-DHBA quando la concentrazione di dopamina passa da 10 µM a 100 µM suggerisce un limite oltre il quale la dopamina diventa tossica nei mitocondri (Pandey et al., 2009). In dettaglio, la dopamina o il suo metabolita possono causare stress ossidativo portando alla formazione dei ROS in quanto nella trasformazione ad acido 2,4-diidrossifenil acetico (DOPAC) da parte della MAO di tipo B si ha la formazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Spina e Cohen, 1989). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in presenza di metalli di transizione porta alla formazione del radicale ·OH mediante reazione di Fenton (Halliwell, 1992). La dopamina può andare incontro anche ad un'autoossidazione non enzimatica che porta alla formazione di chinoni e radicali superossidi (Berman and Hastings, 1999). Come è stato osservato in uno studio, in seguito a questi fenomeni ossidativi, la dopamina causa un aumento della morte delle cellule corticali e striatali in culture cellulari primarie in presenza di un inibitore della catena di trasporto degli elettroni a livello mitocondriale (McLaughlin et al., 1998).

#### **2.3.4 Nuovi sviluppi formulativi per rimediare alle complicazioni legate al trattamento con la levodopa**

Una serie di studi hanno messo in evidenza come le complicazioni associate al trattamento con la levodopa possano essere limitate identificando un modo per ridurre i picchi e le fluttuazioni plasmatiche del principio attivo garantendo quindi una stimolazione dopaminergica meno pulsatile e più continua nel tempo al fine di ristabilire un processo motorio fisiologico nel circuito striato-pallido-talamo-corticale (Gundert-Remy et al., 1983; Goetz, 1997; Fahn, 2005).

A tal proposito, come alternativa alle formulazioni convenzionali, sistemi a rilascio modificato possono essere degli ottimi candidati in quanto possono garantire un rilascio di principio attivo costante e controllato nel tempo.

In merito, sono già state sviluppate formulazioni a rilascio prolungato per via orale quali Sinemet Cr<sup>®</sup> e Madopar HBS<sup>®</sup> per garantire il rilascio controllato rispettivamente dell'associazione levodopa/carbidopa e levodopa/benserazide. Le due formulazioni sono rappresentate da compresse a base polimerica (copolimero dell'acetato di polivinile con l'acido crotonico per Sinemet CR<sup>®</sup> e idrossipropilmetilcellulosa per Madopar HBS<sup>®</sup>) (Sinemet CR<sup>®</sup> Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto; Madopar HBS<sup>®</sup> Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto). L'efficacia di queste formulazioni *long acting* è stata confrontata con quella della formulazione convenzionale sia in



pazienti stabili che in pazienti con fluttuazioni motorie: nonostante sembrano ridurre la percentuale dei periodi *off* e la dose necessaria per controllare le complicazioni motorie, queste formulazioni orali a rilascio controllato presentano un tempo di comparsa dell'effetto più lungo, richiedono delle dosi più elevate di attacco e non permettono di posticipare o ridurre le complicazioni legate al trattamento a lungo termine con la levodopa (Cedarbaum et al., 1987; 1988; Ahlskog et al., 1988; Dupont et al., 1996; Block et al., 1997; Koller et al., 1999). E' stato visto inoltre che l'uso di infusioni intravenose della levodopa non è idoneo per un trattamento cronico e l'uso di infusioni intrainestinali è attualmente limitato dai costi elevati e dalla necessità di una gastrostomia percutanea.

Di fronte a queste criticità, negli ultimi anni è aumentato l'interesse per lo sviluppo di sistemi in grado di veicolare molecole farmacologicamente attive in prossimità del loro sito d'azione. Tra questi, i liposomi, le nano e microparticelle polimeriche o lipidiche, le micelle e i dendrimeri sembrano essere i più efficaci nell'interagire con i sistemi biologici a livello molecolare con un alto grado di specificità, nel fornire neuroprotezione e nel facilitare il trasporto dei farmaci attraverso la BEE (Di Stefano et al., 2009).

A tal scopo, una serie di profarmaci dimerici della levodopa sono stati incapsulati in liposomi di dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) e colesterolo al fine di valutare la concentrazione della levodopa e della dopamina nello striato dopo somministrazione intraperitoneale in ratti monitorati *in vivo* con microdialisi. Queste formulazioni hanno portato ad un incremento di 2,5 volte rispetto al profarmaco libero dei livelli di dopamina (Di Stefano et al., 2004; Di Stefano et al., 2006; Cannazza et al., 2005). Inoltre sono stati ottenuti dei dendrimeri con profarmaci della levodopa con una migliore solubilità in acqua, una minor sensibilità alla luce rispetto alla levodopa libera e in grado di rilasciare il principio attivo *in vitro* (Tang et al., 2006).

Negli ultimi tempi c'è stato inoltre un progresso nel disegno e nell'applicazione di nanotecnologie per il trattamento sito specifico dei disturbi neurodegenerativi come ad esempio lo sviluppo di un sistema biodegradabile definito *nano-enabled scaffold device* (NESD) da impiantare nel parenchima del lobo frontale al fine di veicolare la dopamina per il trattamento cronico del Morbo di Parkinson. A tal scopo, la dopamina è stata incorporata all'interno di nanoparticelle polimeriche a base di cellulosa aceto oftalato caricate in uno scaffold di alginato cross-linkato. Studi *in vitro* e *in vivo* (ratto) hanno confermato un rilascio controllato della dopamina da parte di questi sistemi (Pillay et al., 2009).

Accanto a queste evidenze, è noto che la somministrazione nasale di molecole farmacologicamente attive favorisca un assorbimento preferenziale di molecole attive al SNC bypassando i limiti della BEE grazie alle connessioni tra il nervo olfattivo e il trigemino. Possibili meccanismi di trasporto potrebbero coinvolgere un trasporto assonale dai neuroni olfattivi dell'epitelio olfattivo al bulbo olfattivo e il trasporto

extracellulare per mezzo di canali perineuronali e spazi pervascolari o canali linfatici direttamente connessi al liquido cerebrospinale (*Anand Kumar et al., 1982; Sakane et al., 1991a; 1991b; Illum, 2000; Thorne et al., 2004*). In base a queste evidenze sono stati sintetizzati una serie di esteri alchilici solubili della levodopa come potenziali profarmaci candidati per la somministrazione nasale. In particolare è stato visto che il profarmaco estere butilico della levodopa somministrato per via nasale nei ratti aumenta la biodisponibilità a livello del SNC rispetto alla stessa sostanza somministrata endovena in dosi equimolari senza rilevare quantità significative nella circolazione periferica (*Kao et al., 2000*).

In base alle considerazioni fatte in precedenza sulla necessità di garantire un controllo del segnale dopaminergico a livello cerebrale, per far fronte agli effetti indesiderati della levodopa, e alle evidenze di una potenziale applicazione dei sistemi a rilascio controllato, nel corso della mia attività di ricerca universitaria mi sono occupata dello sviluppo di sistemi microparticellari lipidici come potenziali sistemi di rilascio controllato della dopamina che verrà descritto in dettaglio nel capitolo successivo.

### **3. STUDIO DI INCAPSULAMENTO DELLA DOPAMINA IN MICROPARTICELLE LIPIDICHE (Dalpiaz et al., 2010)**

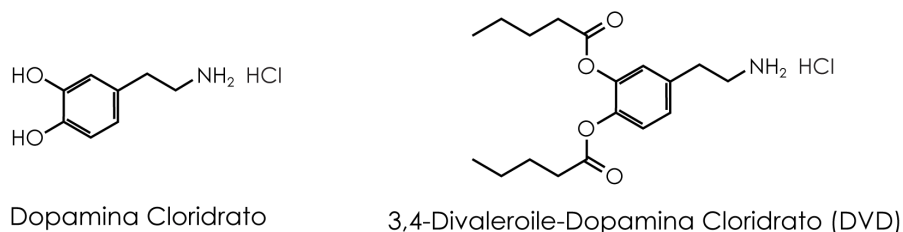
#### **3.1 INTRODUZIONE**

Come già definito in precedenza, la somministrazione orale e periferica della dopamina per il trattamento del Morbo di Parkinson è impedita dal suo esteso metabolismo e per l'incapacità di passare la BEE. Nello sviluppo di nuove formulazioni, migliorare la stabilità della dopamina negli ambienti fisiologici e la veicolazione mirata al cervello rappresentano quindi degli obiettivi importanti. In particolare l'impiego di sistemi microparticellari potrebbe rappresentare una risposta ragionevole alle difficoltà relative alla somministrazione di dopamina. E' stato infatti dimostrato che microparticelle a base di acido polilattico o lipidiche sono in grado di controllare il rilascio e migliorare la stabilità nei fluidi fisiologici di un agente neuroattivo, l'N6-ciclopentiladenosina (CPA) con attività antiischemica nel cervello (Dalpiaz et al., 2001a; 2002; 2008a). Molto recentemente è stato anche dimostrato che polveri microparticellari a base di chitosano o mannitolo sono in grado di indurre l'uptake nel SNC dopo somministrazione nasale (Dalpiaz et al., 2008b).

Questo studio si è focalizzato sulle microparticelle solide lipidiche poichè presentano i vantaggi degli altri sistemi particellari ed evitano qualche loro svantaggio. Esse sono fatte di una matrice solida lipidica a base di un lipide naturale e sono stabilizzate in superficie da un tensioattivo (Jaspart et al., 2005). Di conseguenza, i loro costituenti sono fisiologicamente compatibili e biodegradabili, dimostrando un'eccellente tollerabilità *in vivo* (Jaspart et al., 2005). Ulteriori vantaggi delle microparticelle lipidiche includono l'assenza di solventi organici per la loro preparazione e l'effettiva stabilizzazione dei principi attivi incapsulati (Scalia et al., 2006; Dalpiaz et al., 2008a).

In dettaglio, il presente studio riguarda la preparazione e la caratterizzazione di microparticelle solide lipidiche come sistema di rilascio modificato per la dopamina. La sintesi di un nuovo estere valeroilico della dopamina (3,4-O-divaleroildopamina, DVD; *Figura 9*) è stata necessaria per ottenere il suo incapsulamento nelle microparticelle. E' stato inoltre dimostrato che il derivato estereo DVD è un profarmaco della dopamina in quanto viene idrolizzato nel plasma umano e che la sua stabilità è sensibilmente migliorata dall'incapsulamento nelle microparticelle.

Figura 9. Formula chimica della dopamina e del composto 3,4-O-divaleroildopamina, DVD



## 3.2 PARTE SPERIMENTALE

### 3.2.1 Materiali

La dopamina, la serotonina, l'acido 1-ottansolfonico e l'acido trifluoroacetico (TFA) sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). La tristearina e l'acido stearico sono stati acquistati da Fluka Chemie (Bucks, Svizzera). La fosfatidilcolina idrogenato, da fagioli di soia, è stata fornita da Cargill (Amburgo, Germania). Il sale sodico dell'acido 1-esansolfonato e dell'acido 1-ottansolfonico sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). La 5-amino-7-[3-(4-idrossifenil)propil]-2-(2-furil)pirazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina (PTP) è stata sintetizzata come descritto in una precedente pubblicazione (*Baraldi et al. 1998*). Il metanolo, l'acetonitrile e l'acqua con grado di purezza per analisi HPLC sono state fornite da Merck (Darmstadt, Germania). La colonna per fase inversa (Hypersil BDS C-18 5U cartridge column, 150mmx4.6mm i.d.) e la precolonna (impaccata con materiale Hipersil C-18) sono state ottenute da Alltech Italia Srl BV (Milano, Italia). Tutti gli altri reagenti e solventi erano di grado analitico (Sigma).

### 3.2.2 Chimica

L'andamento delle reazioni e i prodotti intermedi sono stati monitorati mediante cromatografia su strato sottile (TLC) su gel di silice (F254 Merck) e visualizzate con iodio o soluzione acquosa di permanganato di potassio. Gli spettri infrarossi (IR) sono stati misurati con un Perkin-Elmer Spectrum 100. Gli spettri  $^1\text{H-NMR}$  sono stati determinati in soluzioni di cloroformio deuterato con uno spettrometro Bruker AC 200, la posizione dei picchi è stata data in parti per milione ( $\delta$ ) con trimetilsilano come standard interno, i valori di J sono espressi in Hz. L'etere di petrolio fa riferimento alla frazione che bolle tra 40-60°C. Le purificazioni per via cromatografica sono state

effettuate impiegando gel di silice Merck 200-400. Tutti i prodotti riportavano uno spettro IR e <sup>1</sup>H-NMR in accordo con le strutture assegnate. Le soluzioni organiche sono state anidrificate su sodio solfato anidro.

### 3.2.3 Sintesi del profarmaco della dopamina 3,4-O-Divaleroildopamina (DVD)

#### 3.2.3.1 N-terbutilossicarbonildopamina

A una soluzione di dopamina cloridrato (1g, 5.27 mmol) in 2 mL of DMF e 20 mL di diossano, è stata aggiunta trietil ammina (0.73 mL, 5.27 mmol) goccia a goccia e la miscela risultante è stata lasciata in agitazione per 15 minuti. Successivamente, è stato aggiunto il ter-butyl-dicarbonato (1.27 g, 5.79 mmol) e la miscela risultante è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 18 ore. Il solvente è stato evaporato a pressione ridotta e il residuo ripreso con acqua ed estratto con acetato di etile (20 mL x 3). Lo strato organico anidrificato è stato evaporato a pressione ridotta per dare 1.3 g (resa del 100%) di prodotto come semisolido bianco.

<sup>1</sup>H-NMR: 1.43 (s, 9H); 2.64 (t, 2H, J = 6.8); 3.30-3.32 (m, 2H); 4.63 (bs, 1H); 6.03 (bs, 1H); 6.36 (bs, 1H); 6.57 (d, 1H, J = 8); 6.70 (s, 1H); 6.78 (d, 1H, J = 8)  
IR: cm<sup>-1</sup> 1675; 3375; 3486

#### 3.2.3.2 N-terbutilossicarbonil-3,4-O-divaleroildopamina

Ad una soluzione di N-terbutilossicarbonildopamina (1.3 g, 5.27 mmol) in 90 mL di cloroformio è stato aggiunto il valeroil cloruro (3.83 mL, 31.6 mmol), seguito dall'aggiunta goccia a goccia di trietil ammina (7.35 mL, 52.7 mmol) dopo 30 minuti. Dopo altri 30 minuti sotto agitazione, la soluzione è stata lavata con 20 mL H<sub>2</sub>O e con una soluzione acquosa di acido citrico al 10%. Lo strato organico anidrificato è stato evaporato a pressione ridotta. Il residuo è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (Eluenti: acetato di etile/etere di petrolio 20% v/v) per dare 1.12 g (resa del 50.4%) di prodotto come olio giallo.

<sup>1</sup>H-NMR: 0.96 (t, 6H, J = 8); 1.35-1.52 (m, 13H); 2.52 (t, 4H, J = 8); 2.78 (t, 2H, J = 6.8); 3.25-3.47 (m, 2H); 4.61 (bs, 1H); 6.99-7.08 (m, 3H).  
IR: cm<sup>-1</sup> 1712; 1738; 1767

#### 3.2.3.3 3,4-O-divaleroildopamina cloridrato

Una soluzione di N-terbutilossicarbonil-3,4-O-divaleroil dopamina (1.12 g, 2.67 mmol) in una soluzione satura di HCl in etere etilico (5 mL) è stata posta sotto agitazione per

30 minuti. Successivamente, il solvente è stato rimosso a pressione ridotta per dare 0.94 g (resa del 98.6%) di divaleroildopamina cloridrato come olio giallo.

<sup>1</sup>H-NMR: 0.95 (t, 6H, J = 8); 1.41-1.51 (m, 4H); 1.62-1.75 (m, 4H); 2.53 (t, 4H, J = 8); 2.90 (t, 2H, J = 6.8); 3.18-3.25 (m, 2H).

IR: cm<sup>-1</sup> 1759, 2877, 2963.

### 3.2.4 Analisi HPLC della dopamina e del profarmaco DVD

La determinazione quantitativa della dopamina e del profarmaco DVD in tutti i campioni ottenuti dalla procedure sperimentali è stata ottenuta mediante HPLC. L'apparato cromatografico consisteva in un sistema modulare equipaggiato di pompa (Modello LC-10 AD VD) e di un rivelatore UV-visibile a lunghezza d'onda variabile (Modello SMP-10A VP; Shimadzu, Kyoto, Giappone) e di una valvola di iniezione con un loop per il campione di 20 µL (Modello 7725; Rheodyne, IDEX, Torrance, CA, USA). La separazione è stata ottenuta a temperatura ambiente su una colonna a fase inversa (Hypersil BDS C-18 5U) equipaggiata con una precolonna. L'acquisizione dei dati e l'elaborazione è stata ottenuta mediante un personal computer usando il software Class-VP (Shimadzu). Per la dopamina il detector è stato impostato a 280 nm. La fase mobile consisteva di una miscela con rapporto di 30/70 (v/v) di metanolo e 40 mM di tampone fosfato, pH = 3 contenente l'1-ottansolfonato sodico (5 mM). Il flusso era di 0.8 mL/min. La serotonina è stata impiegata come standard interno per i campioni da plasma (vedi di seguito). Il tempo di ritenzione della dopamina e della serotonina erano rispettivamente 7.5 e 11.9 min.

Per il profarmaco DVD il detector è stato impostato a 270 nm. La fase mobile consisteva di una miscela di una soluzione acquosa di TFA al 0.16% e acetonitrile in un rapporto di 60/40 (v/v). Il flusso era di 1 mL/min. PTP è stato impiegato come standard interno per i campioni da plasma (vedi di seguito). I tempi di ritenzione per il profarmaco e PTP erano rispettivamente di 12.0 e 4.1 min.

La precisione cromatografica è stata valutata mediante analisi ripetute (n=6) dello stesso campione. Le curve di calibrazione delle aree dei picchi rispetto alla concentrazione sono state ottenute nel range rispettivamente di 2-200 µM e 10-300 µM per la dopamina e il profarmaco DVD.

### 3.2.5 Preparazione delle microparticelle lipidiche

Le microparticelle lipidiche sono state preparate aggiungendo acqua ad una temperatura di 70–80 °C (25 mL) contenente 0.5% (p/v) di tensioattivo alla fase lipidica sciolta (3.2 g) nella quale la dopamina (0.40 g) o il profarmaco (0.50 g) sono stati dispersi. I campioni sono stati sottoposti ad emulsione (13500 rpm per 2–3 min) mediante un Ultra- Turrax T25 (IKA-Werk, Staufen, Germany) a 70–80 °C. Le emulsioni ottenute sono state rapidamente raffreddate e le particelle ottenute sono state recuperate mediante centrifugazione (6000 rpm per 15 min) e liofilizzazione.

### 3.2.6 Analisi del contenuto delle microparticelle in dopamina e profarmaco DVD

Le microparticelle (circa 5 mg) opportunamente setacciate (100 µm) sono state accuratamente pesate usando una bilancia analitica ad alta precisione (d = 0.01 mg; Sartorius, Model CP 225D, Goettingen, Germany), e disciolte in etanolo sotto sonicazione. I campioni sono stati diluiti a volume (10 mL) e 10 µL delle soluzioni filtrate sono state impiegate per le analisi HPLC. Per la dopamina, i campioni filtrati sono stati diluiti 1:10 in etanolo prima dell'iniezione.

La quantità di composto incapsulato e l'efficienza di incapsulamento sono state calcolate in accordo con le seguenti equazioni:

(1) Quantità di composto incapsulato:

$$(\% \text{ p/p}) = \frac{\text{quantità in mg di composto nelle microparticelle}}{\text{mg di microparticelle caricate con il composto}} \times 100$$

(2) Efficienza di incapsulamento:

$$(\%) = \frac{\text{quantità in mg di composto nelle microparticelle}}{\text{mg iniziali di composto}} \times 100$$

Tutti i valori sono stati ottenuti dalla media di quattro esperimenti indipendenti.

### 3.2.7 Dissoluzione *in vitro* e studi di rilascio dalle microparticelle

Quantità accuratamente pesate di dopamina (circa 0,3 mg pesati con la bilancia analitica Sartorius CP 225D), o di profarmaco DVD (circa 0,7 mg), o di microparticelle setacciate, contenenti una quantità equivalente di sostanza incapsulata, sono state

aggiunte a 15 mL di acqua. I campioni sono stati mantenuti a 37°C e tenuti in agitazione meccanicamente (100 rpm) durante gli esperimenti di dissoluzione o rilascio. Aliquote (150 µL) sono state prelevate a intervalli definiti e 10 µL dei campioni filtrati (0.45 µm) sono stati iniettati nel sistema HPLC. Un eguale volume di acqua è stato aggiunto dopo il prelievo di ciascun campione.

### **3.2.8 Caratterizzazione delle microparticelle**

Le caratteristiche morfologiche delle microparticelle lipidiche sono state esaminate mediante microscopia a scansione elettronica (VP-SEM; Zeiss EVO40XVP, Assing, Milano, Italia) con pressione variabile (ca. 90 Pa). Le dimensioni delle particelle sono state determinate mediante analisi dell'immagine computerizzata (Micrometrics TM camera 122 CU e Software Vision 1.0) di circa 100 particelle su un microscopio ottico a fase inversa (Nikon Diaphot, Tokyo, Giappone).

### **3.2.9 Analisi cinetiche in acqua e tampone fosfato**

La dopamina o il suo profarmaco DVD sono stati incubati a 37°C in acqua (per HPLC) o in tampone fosfato 50 mM (pH 7.4). A 3 mL di acqua o tampone è stata aggiunta la soluzione del farmaco con una concentrazione finale risultante di 200 µM. A intervalli regolari sono stati prelevati 100 µL di campione e aliquote di 10 µL sono state immediatamente iniettate nell'apparato HPLC. Il tempo di emivita nel tampone fosfato della dopamina e del suo profarmaco è stato calcolato dall'andamento esponenziale decrescente delle curve che descrivono la loro concentrazione in funzione del tempo, usando il programma per computer GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA). Lo stesso software è stato impiegato per la regressione lineare degli andamenti semilogaritmici della dopamina e del suo profarmaco in tampone.

Tutti i valori sono stati ottenuti come media di tre esperimenti indipendenti.

### **3.2.10 Analisi cinetiche in plasma umano**

Per gli studi di stabilità dei composti liberi, a 3 mL di plasma umano ottenuto da volontari sani sono state aggiunte soluzioni della dopamina o del profarmaco DVD per avere una concentrazione finale di 200 µM. Gli studi di stabilità del profarmaco



incapsulato sono stati effettuati aggiungendo 3 mg/mL di microparticelle caricate, per avere un concentrazione finale di circa 200  $\mu\text{M}$  per il profarmaco DVD incapsulato. A intervalli regolari, sono stati prelevati 100  $\mu\text{L}$  di campioni e raffreddati in 200  $\mu\text{L}$  o 900  $\mu\text{L}$  di etanolo in ghiaccio per le analisi rispettivamente del composto libero o incapsulato. Cinquanta microlitri di una soluzione di serotonina 100  $\mu\text{M}$  o PTP 4  $\mu\text{M}$  sono stati aggiunti ai campioni come standard interno rispettivamente per le analisi della dopamina e del profarmaco DVD. Dopo 5 min di centrifuga a 9000 x g, aliquote di 250  $\mu\text{L}$  or 950  $\mu\text{L}$ , rispettivamente per i composti liberi o per le forme microincapsulate, sono state ridotte a secco sotto flusso d'azoto. Duecento mL di fase mobile sono stati aggiunti e, dopo centrifugazione, 10  $\mu\text{L}$  sono stati iniettati nel sistema HPLC.

L'accuratezza del metodo è stata determinata mediante esperimenti di recovery, confrontando l'area dei picchi dei composti estratti dai campioni usati per i test (n=6) con quelli ottenuti dall'iniezione di una equivalente concentrazione degli analiti dissolti nella fase mobile.

Tutti i valori ottenuti rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.

### 3.3 RISULTATI

#### 3.3.1 Stabilità della dopamina e studi di microincapsulamento

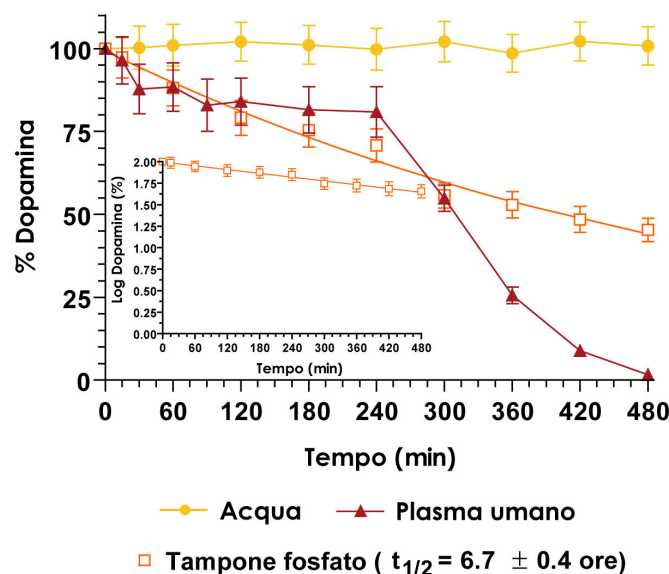
Le microparticelle lipidiche caricate con la dopamina sono state preparate mediante la tecnica dell'*hot emulsion* usando la tristearina come materiale lipidico e la fosfatidilcolina come emulsionante biocompatibile. Prima di sottoporre le microparticelle ottenute agli esperimenti di rilascio, è stata studiata la stabilità della dopamina in differenti mezzi.

In dettaglio, poiché la dopamina non è trattenuta da colonne in fase inversa, per migliorare la sua ritenzione, sono stati usati reagenti idrofobici, come un alchilsolfonato, come additivi nella fase mobile per formare una coppia ionica. Tra gli agenti in grado di formare una coppia ionica (esansulfonato, ottansulfonato), l'ottansulfonato forniva il più alto fattore di capacità per la dopamina, consentendo una sua soddisfacente ritenzione al 30% (v/v) di metanolo nella fase mobile. La precisione cromatografica per la dopamina e serotonina (standard interno) è rappresentata dai valori della deviazione standard relativa (DSR) di 1.44%, 1.68% e 1.41% rispettivamente per 100  $\mu\text{M}$  di dopamina, 2  $\mu\text{M}$  di dopamina e 50  $\mu\text{M}$  di serotonina. Le curve di calibrazione erano lineari per il range 5-200  $\mu\text{M}$ , con un coefficiente di correlazione più alto di 0.998. I

limite di quantificazione (LOQ) era di 5  $\mu\text{M}$  (9.5 ng/iniezione). Il limite di rilevazione (LOD) era di 1.5  $\mu\text{M}$  (2.84 ng/iniezione) con un rapporto segnale/rumore di fondo di 3:1. Il recupero medio  $\pm$  deviazione standard (DS) della dopamina e della serotonina dal plasma umano era rispettivamente di 59.2%  $\pm$  2.9 e 56.1%  $\pm$  2.7. Le concentrazioni della dopamina in plasma sono state quindi riferite al rapporto delle aree dei picchi tra la dopamina e 50  $\mu\text{M}$  serotonina, impiegata come standard interno. La media  $\pm$  DS dei valori del rapporto tra le aree dei picchi ottenuta da estrazioni ripetute (n = 6) da campioni di plasma contenenti 50  $\mu\text{M}$  di dopamina e 50  $\mu\text{M}$  di serotonina era di 0.450  $\pm$  0.007. La precisione del metodo basata sul rapporto delle aree dei picchi era rappresentata da un valore di DSR del 1.6 %. Non è stata osservata alcuna interferenza da parte dei componenti del plasma.

La dopamina era stabile durante le 8 ore di incubazione a 37°C (Figura 10), mentre nel tampone fosfato si decompondeva seguendo un'apparente cinetica di primo ordine (evidenziato dalla linearità della curva semilogartimica nel riquadro,  $r = 0.992$ ,  $P < 0.0001$ ) con un tempo di emivita di  $6.7 \pm 0.4$  ore (Figura 10). Infine, la dopamina incubata in plasma umano si degradava completamente nell'arco delle 8 ore, seguendo un andamento bifasico (Figura 10). In particolare, è stata registrata una degradazione lenta per circa 4 ore seguita da una degradazione completa nelle altre 4 ore.

Figura 10. Profilo di degradazione della dopamina in acqua, tampone fosfato 50 mM pH 7.4 e plasma umano. Il riquadro riporta l'andamento semilogartimico del profilo della dopamina in tampone fosfato. I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti



Di conseguenza, il mezzo di rilascio è stato scelto considerando l'elevata stabilità della dopamina in acqua e la degradazione in tampone fosfato e plasma umano, come

riportato in *Figura 10*. Nonostante le microparticelle ottenute avessero caratteristiche morfologiche soddisfacenti, studi di rilascio in acqua mostravano un profilo (non mostrato) che era sovrapponibile con la curva di dissoluzione della dopamina libera, mostrando un mancato controllo nel rilascio da parte delle microparticelle (>99% rilasciato dopo 1 min). Questi risultati indicano che la dopamina, di natura polare e idrofilica, si ripartisce nella fase acquosa esterna dell'emulsione e/o diffonde al di fuori della matrice lipidica durante la formazione delle microparticelle e rimane assorbita sulla loro superficie esterna, probabilmente per mezzo di deboli interazioni tra i gruppi funzionali polari dell'emulsionante sullo strato più esterno della particella. Recentemente, l'impiego dell'acido stearico come eccipiente lipidico per la preparazione delle microparticelle ha permesso di incapsulare e controllare il rilascio di un farmaco poco idrofilico (N6-ciclopentiladenosina, CPA) per mezzo di interazioni acido base tra il farmaco e la matrice lipidica (*Dalpiaz et al., 2008a*). Questo approccio però non ha portato ad un successo per la dopamina (dati non mostrati).

### 3.3.2 Preparazione del profarmaco DVD e studi di idrolisi

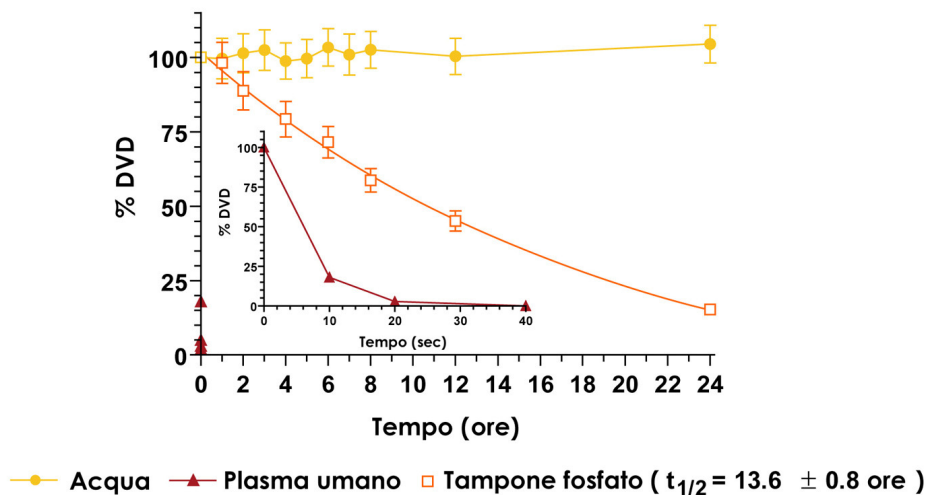
Al fine di migliorare il suo caricamento nelle microparticelle, è stata messa a punto la sintesi di un derivato lipofilo della dopamina, il 3,4-O-divaleroildopamina (DVD). La scelta del comune acido grasso C5 è stata supportata dalla sua capacità di conferire proprietà idrofobiche a molecole idrofiliche dopo esterificazione dei loro gruppi idrossilici. Inoltre, il residuo estereo ottenuto potrebbe essere facilmente idrolizzato nei compartimenti fisiologici.

Il profarmaco DVD è stato ottenuto seguendo un processo in tre passaggi a partire dalla dopamina cloridrato commerciale che è stata protetta come derivato N-t-butilossicarbonile, funzionalizzata nei gruppi ossidrilici come esteri valeroilici e infine deprotetta ad ammino gruppo seguendo delle procedure standard (*Borgman et al., 1973; Casagrande et al., 1986*).

Al fine di verificare se il derivato estereo DVD liberasse dopamina nei compartimenti fisiologici (ovvero se può essere un suo profarmaco) è stata analizzata la stabilità in plasma umano mediante un nuovo metodo HPLC. I saggi di validazione indicavano una precisione cromatografica per il profarmaco DVD e il suo standard interno PTP rappresentata dai valori di DSR di 1.48%, 1.86% e di 2.32% per rispettivamente 100 µM DVD, 10 µM DVD e 10 µM di standard interno. Le curve di calibrazione erano lineari per il range 10-300 µM, con un coefficiente di correlazione più grande di 0.998. Il LOQ era di 10 µM (35.7 ng/iniezione). Il LOD era di 2.3 µM (8.2 ng/iniezione) con un rapporto segnale/rumore di fondo di 3:1. La media dei recovery ± DS di DVD e dello standard interno da plasma umano era rispettivamente di 54.8 ± 2.7% e 77.4 ± 3.2%.

Le concentrazioni di DVD in plasma erano quindi riferite al rapporto tra le aree dei picchi del composto DVD e 2  $\mu\text{M}$  di PTP. La media  $\pm$  DS del rapporto dei valori delle aree dei picchi ottenuti da estrazioni ripetute ( $n = 6$ ) da un campione di plasma contenenti 200  $\mu\text{M}$  DVD and 2  $\mu\text{M}$  PTP era di  $1.030 \pm 0.024$ . La precisione del metodo basata sul rapporto delle aree dei picchi era rappresentata da un valore di DSR di 2.3%. Le analisi degli estratti da plasma non hanno evidenziato interferenze da parte di altri componenti.

Figura 11. Profilo di degradazione del profarmaco DVD in acqua, tampone fosfato 50 mM pH 7.4 e plasma umano. Il riquadro riporta uno zoom con una scala estesa del profilo del profarmaco DVD in plasma umano (tempo espresso in secondi). I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti

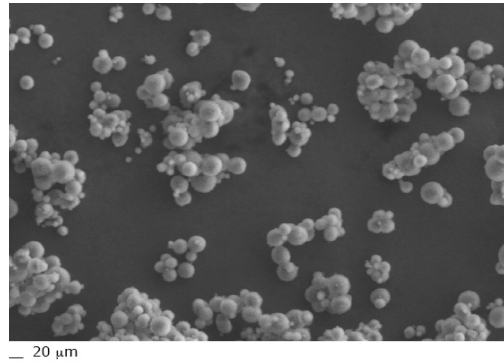


Come evidenziato in *Figura 11*, il derivato estereo DVD si degradava completamente in plasma entro 40 sec. Questo stesso campione è stato analizzato per valutare anche il contenuto in dopamina nel tempo, i risultati di queste analisi indicavano che nel plasma umano il composto DVD è completamente idrolizzato in dopamina la cui relativa degradazione appare sovrapponibile al profilo bifasico riportato in *Figura 10*.

### 3.3.3 Incapsulamento del profarmaco DVD nelle microparticelle lipidiche

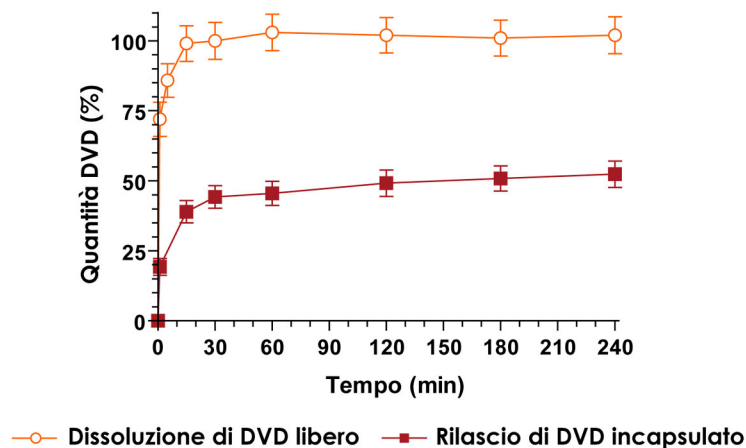
Le microparticelle lipidiche contenenti il profarmaco DVD sono state ottenute utilizzando tristearina come materiale lipidico e la fosfatidilcolina come emulsionante. La quantità di DVD incapsulato è risultata essere  $2.67 \pm 0.13\%$  (p/p) che corrisponde ad una efficienza di incapsulamento di  $23.6 \pm 1.2\%$ . Le analisi VP-SEM delle microparticelle lipidiche caricate con il DVD hanno evidenziato una forma sferica e una superficie liscia (*Figura 12*). La dimensione delle particelle era tra 5.2 e 26.2  $\mu\text{m}$  (diametro medio  $14.2 \pm 4.8 \mu\text{m}$ ).

Figura 12. Micrografia VP-SEM delle microparticelle contenenti il profarmaco DVD



Al fine di esaminare le caratteristiche di un rilascio modificato delle microparticelle lipidiche caricate con il profarmaco DVD, sono stati condotti studi di stabilità in acqua e in tampone fosfato. Come evidenziato in *Figura 11*, il profarmaco DVD non viene degradato in acqua nelle 24 ore di incubazione a 37°C mentre viene degradato in tampone fosfato seguendo una cinetica apparente di primo ordine (la curva semilogaritmica era lineare,  $r = 0.996$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 8$ ) con un tempo di emivita di  $13.6 \pm 0.8$  ore. Di conseguenza, l'acqua è stata scelta come mezzo di rilascio. Il rilascio del composto DVD in acqua è riportato in *Figura 13*, dove è riportato anche il suo profilo di dissoluzione in forma libera.

Figura 13. Profilo di dissoluzione e profilo di rilascio del profarmaco DVD dalle microparticelle in acqua a 37°C. I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti



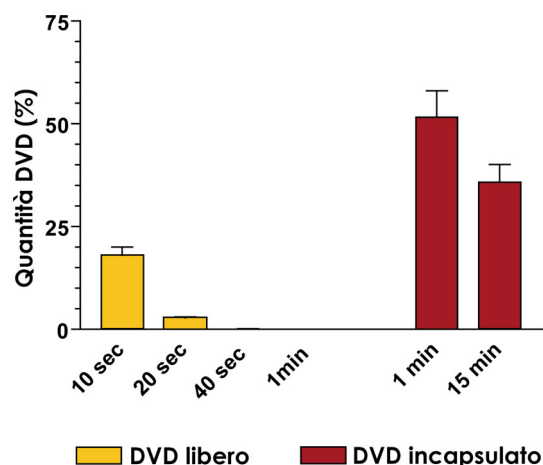
Si può osservare come entro 15 minuti il composto DVD libero si dissolva completamente. Dall'altra parte, il suo rilascio dalle microparticelle era caratterizzato da un burst effect iniziale di circa il 20% della quantità totale incapsulata e un successivo

rilascio lento e continuo. Questo indica un intrappolamento del profarmaco nelle microparticelle lipidiche. Durante il periodo monitorato (4 ore), il 49% del composto DVD incapsulato non è stato rilasciato come confermato dalla determinazione del suo contenuto nelle particelle dopo gli esperimenti di rilascio.

### 3.3.4 Studi di stabilità del profarmaco DVD incapsulato

Molto interessante è aver visto anche che le microparticelle lipidiche erano in grado di stabilizzare il profarmaco DVD nella sua forma solida. Infatti il composto conservato a 4°C in forma libera si è degradato completamente nell'arco di 6 mesi, mentre non è stata osservata alcuna degradazione nelle stesse condizioni di conservazione quando incapsulato. Infine, è stata valutata la capacità delle microparticelle lipidiche caricate con il composto DVD di stabilizzare questo profarmaco nel plasma umano. Come riportato in *Figura 14*, l'idrolisi del composto DVD libero è stata estremamente veloce, essendo completa in 40 secondi. La stessa quantità di DVD incapsulata nelle microparticelle lipidiche si degrada con un grado notevolmente ridotto. Infatti, dopo 1 min di incubazione delle microparticelle la quantità di DVD non degradato era del 51.6%  $\pm$  6.4 e dopo 15 min del 35.8%  $\pm$  4.3 (*Figura 14*).

*Figura 14. Degradazione in plasma umano del composto DVD libero o incapsulato nelle microparticelle. I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti*



Questi risultati indicano che le microparticelle lipidiche hanno un pronunciato effetto protettivo sul profarmaco DVD, anche se leggermente più basso di quanto aspettato dalle analisi del profilo di rilascio in acqua del DVD incapsulato. Queste differenze possono essere attribuite alla biodegradazione della matrice lipidica nel plasma.

### 3.4 DISCUSSIONE

Il presente studio descrive in dettaglio i profili di degradazione della dopamina in differenti mezzi quali l'acqua, il tampone fosfato e il plasma umano. I risultati ottenuti (*Figura 10*) confermano i scarsi dati disponibili in letteratura che riportano che la dopamina si degrada completamente in plasma umano quando analizzata il giorno dopo la sua incubazione a 37°C, in assenza di antiossidanti (*Boomsma et al. 1993*). Inoltre, è noto che le altre catecolamine sono relativamente stabili in plasma umano e in sangue intero a temperatura ambiente per almeno 3 ore (*Weir et al., 1986; Rumley 1988*). La differente stabilità della dopamina come soluto in acqua suggerisce che la sua degradazione, probabilmente ossidativa (*Boomsma et al., 1993*) può essere influenzata dal pH e/o dalla forza ionica.

Al fine di migliorare l'efficacia terapeutica della dopamina, viene riportato per la prima volta il suo incapsulamento in microparticelle lipidiche per potenziali nuovi somministrazioni del neurotrasmettitore. A tal scopo, abbiamo sintetizzato un derivato divaleroilico della dopamina (DVD) per conferire proprietà idrofobiche necessarie per il suo incapsulamento efficiente nelle microparticelle lipidiche. È stato infatti dimostrato in precedenza che il profarmaco valeroilico del CPA aumenta il suo Log P da 1.21 a 2.79. Lo stesso profarmaco valeroilico è stato anche proposto con lo scopo di migliorare l'incorporazione nei liposomi di farmaci idrofili come ara-C e gentamicina (*Immordino et al., 2004; Castelli et al., 2007*).

Le analisi di stabilità del composto DVD in plasma umano hanno dimostrato che è un profarmaco della dopamina ed è stato per questo motivo impiegato per gli studi di incapsulamento. Il suo incapsulamento nelle microparticelle lipidiche a base di tristearina ha permesso di ottenere un rilascio modificato (*Figura 13*) ed una riduzione marcata della sua degradazione in plasma umano (*Figura 14*). Date le dimensioni dell'ordine dei micron delle particelle e la loro biocompatibilità ottimale per le mucose, le microparticelle caricate con il profarmaco DVD potrebbero costituire un carrier utile per ampliare le vie di somministrazione della dopamina. A tal proposito, dati di letteratura suggeriscono la via nasale come un mezzo promettente per l'uptake della dopamina nel SNC. Infatti è noto che la dopamina, mediante una somministrazione nasale, è trasportata nel bulbo olfattivo nel fluido cerebrospinale (*Dahlin, 2000; 2001*). In più, sono stati indentificati di recente trasportatori della dopamina (DAT e OCT) espressi sulla mucosa nasale che svolgono un ruolo nell'assorbimento e nella distribuzione della dopamina somministrata per via nasale (*Chemuturi et al., 2006; Chemuturi e Donovan 2007*). È interessante osservare come l'attività di trasporto a livello della mucosa non appare ridotta dal metabolismo mucosale della dopamina (*Chemuturi e Donovan 2006*).

### 3.5 CONCLUSIONI

Lo sviluppo di nuove formulazioni farmaceutiche per la somministrazione della dopamina appare di grande importanza considerando quanto descritto in precedenza, ovvero che la somministrazione orale di levodopa rappresenta la terapia più efficace per il Morbo di Parkinson che però induce gravi effetti indesiderati in seguito al trattamento a lungo termine quali discinesie, fenomeni di *wearing-off*, *on-off* e stress ossidativo attribuibili ad un trasporto discontinuo e intermittente della levodopa a livello del SNC (*Poewe et al., 2010*). In base a queste considerazioni, di fatto nuove formulazioni in grado di evitare l'impiego della levodopa e controllare il rilascio di dopamina nel SNC, potrebbero essere di grande utilità nel ridurre gli effetti indesiderati a lungo termine causati dalla somministrazione orale della levodopa. Potrebbe essere interessante valutare se le microparticelle lipidiche caricate con il profarmaco DVD possano esplicare il trasporto diretto del composto DVD o della dopamina dal naso al cervello attraverso la regione olfattiva, dove le microparticelle potrebbero aderire mediante interazioni elettrostatiche della fosfatidilcolina sulla superficie esterna della particella con la carica negativa delle superfici mucosali, come dimostrato per polimeri naturali carichi positivamente e le microparticelle di chitosano (*Leher et al., 1992; Dalpiaz et al., 2008b*). Questi fenomeni di adesione potrebbero consentire di mantenere il profarmaco DVD a livello del sito di assorbimento nella cavità nasale (*Charlton et al., 2007*). L'efficiente idrolisi osservata in plasma umano potrebbe indicare l'abilità del profarmaco nel rilasciare la dopamina sia nella mucosa nasale sia nel cervello, dove è stata evidenziata la presenza di esterasi (*Pavan et al., 2008*).

Gli studi di stabilità della dopamina e del suo profarmaco DVD sono stati condotti in modo analogo a quelli eseguiti, nel corso dell'attività di ricerca universitaria, per un coniugato dell'aspirina con la vitamina C (AA-Asp) il cui studio e rationale verranno descritti in dettaglio in un capitolo a parte.



## **4. STUDI DI STABILITA' DI UN CONIUGATO DELL'ASPIRINA CON LA VITAMINA C (Dalpiaz et al., 2009)**

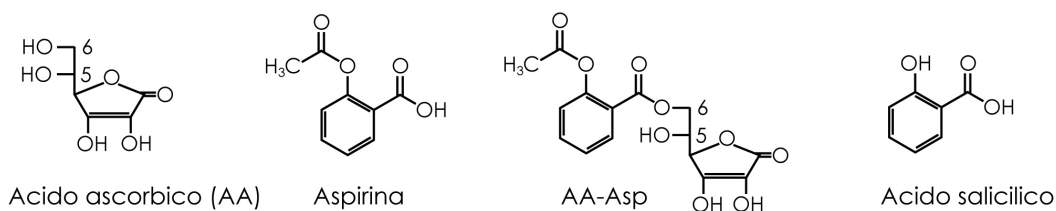
### **4.1 INTRODUZIONE**

Accanto alla nota azione antinfiammatoria, analgesica e antipiretica, sono state riconosciute per l'aspirina una serie di azioni a livello cerebrale quali: ridurre l'ischemia cerebrale (*Joseph et al., 1992; Castillo et al., 2003*), un effetto neuroprotettivo (*Berger et al., 2004; Whitehaed et al., 2007*), prevenire gli stress ossidativi (*Kontos, 2001; Kim et al., 2002; Kuhn et al., 1995; De La Cruz et al., 2004*), inibire il rilascio di glutammato i cui livelli elevati inducono morte cellulare (*De Cristobal et al., 2001; 2002a; 2002b; Castillo et al., 2003*) e come potenziale farmaco per l'Alzheimer e il Morbo di Parkinson per la sua azione antinfiammatoria e di prevenzione degli stress ossidativi (*O'Banion e Finch, 1996, Hull et al., 2000; Maharaj et al., 2004*).

Purtroppo l'uso prolungato dell'aspirina induce irritazioni a livello gastrico e sanguinamenti, portando in qualche caso ad emorragia e morte (*Kurata e Abbey, 1990; Velasquez et al., 2005*). E' stato suggerito che gli effetti collaterali possono essere minimizzati mascherando il gruppo carbossilico dell'aspirina mediante la formazione di un profarmaco (*Velasquez et al., 2005; Nielsen e Bundergaard, 1989; Gilmer et al., 2002; 2007*). Infatti l'esterificazione dell'aspirina produce esteri con una ridotta attività ulcerogena (*Whitehouse e Rainsford, 1980; Velasquez et al., 2005*).

Prendendo in considerazione questi aspetti, è stato sintetizzato un profarmaco dell'aspirina mediante esterificazione del suo gruppo carbossilico con la vitamina C (acido ascorbico, AA) (*Figura 15*). Questa strategia segue un nuovo approccio proposto considerando i coniugati farmaco-acido ascorbico dei potenziali mezzi per il trasporto del farmaco nel cervello (*Manfredini et al., 2002; 2004; Dalpiaz et al., 2005a*) o in alternativa per un rilascio prolungato del farmaco nei fluidi fisiologici (*Dalpiaz et al., 2004; 2005b*).

Figura 15. Formula chimica dell'acido ascorbico, dell'aspirina, del coniugato AA-Asp e dell'acido salicilico



In particolare, considerando gli esteri dell'aspirina come potenziali strumenti per evitare gli effetti collaterali, è stata analizzata la capacità del profarmaco AA-Asp di rilasciare il farmaco e il suo principale metabolita, l'acido salicilico, nel plasma umano e nel sangue intero.

## 4.2 PARTE SPERIMENTALE

### 4.2.1 Materiali

L'ascorbato (AA), l'aspirina e l'acido benzoico sono stati ottenuti da Sigms (St. Louis, Missouri, USA). I solventi per HPLC sono stati forniti da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia). Tutti gli altri reagenti e solventi sono stati ottenuti da fonti standard.

### 4.2.2 Analisi HPLC

La determinazione quantitativa dell'aspirina e del suo coniugato AA-Asp in tutti i campioni ottenuti dalla procedure sperimentali è stata eseguita mediante HPLC. L'apparato cromatografico consisteva in un sistema modulare Agilent equipaggiato di pompa (Modello 1100) e di un rivelatore "diode array" (Agilent, Waldbronn, Germania) e di una valvola di iniezione con un loop per il campione di 50  $\mu$ L (Model 9125; Rheodyne, Cotati, CA, USA). La separazione è stata ottenuta a temperatura ambiente su una colonna a fase inversa (Hypersil BDS C-18 5U, colonna cartridge, 150 mm x 4.6 mm i.d., Alltech Italia Srl BV, Milano, Italia) equipaggiata con una pre colonna impaccata con materiale Hipersil C-18 (Alltech). L'acquisizione dei dati e l'elaborazione è stata ottenuta mediante un personal computer usando il software Chem Station (Agilent). Il detector è stato impostato a 230 nm. La fase mobile consisteva di una miscela con rapporto di 26/74 (v/v) di acetonitrile e TFA al 0.2%. Il flusso era di 0.8

mL/min e i tempi di ritenzione erano 5.3 min per il coniugato AA-Asp 6.1 min per l'aspirina, 7.0 min per l'acido benzoico (standard interno) e 9.4 min per l'acido salicilico.

#### **4.2.3 Studi di stabilità in tampone, plasma umano e sangue intero**

L'aspirina o il suo coniugato AA-Asp sono stati incubati a 37°C in tampone fosfato 10 mM (pH 7.4), plasma umano o sangue intero ottenuti da volontari sani. A 3 mL di tampone, plasma o sangue intero è stata aggiunta la soluzione dei composti con una concentrazione finale risultante di 10 µM per l'aspirina e 100 µM per il suo coniugato. A intervalli regolari sono stati prelevati 100 µL di campione. Per il tampone fosfato aliquote di 40 µL sono state immediatamente iniettate nell'apparato HPLC. I campioni da plasma o da sangue intero sono stati raffreddati rispettivamente in 200 µL di etanolo ghiacciato o 500 µL di acqua ghiacciata. Cinquanta microlitri di una soluzione di acido benzoico 10 µM o 100 µM è stata aggiunta ai campioni come standard interno. Dopo 5 min di centrifuga a 9000 x g, aliquote di 250 µL di campione da plasma sono state ridotte a secco sotto flusso d'azoto. Duecento mL di fase mobile sono stati aggiunti e, dopo centrifugazione, 40 µL sono stati iniettati nel sistema HPLC. Cinquanta µL di una soluzione di acido sulfosalicilico al 10% sono stati aggiunti ai campioni provenienti da sangue che sono stati estratti due volte con 1 mL di acetato di etile saturato d'acqua. Dopo 5 min di centrifuga a 9000 x g, aliquote di 250 µL di campione da plasma sono state ridotte a secco sotto flusso d'azoto. Duecento mL di fase mobile sono stati aggiunti e, dopo centrifugazione, 40 µL sono stati iniettati nel sistema HPLC.

L'emivita dell'aspirina e del suo coniugato AA-Asp è stata calcolata dall'andamento esponenziale decrescente della curva riferita al rapporto dell'area dei picchi tra il composto e lo standard interno, espresso come percentuale rispetto al tempo di incubazione. I valori sono stati confermati dalla regressione lineare delle corrispondenti curve semilogaritmiche. Tutti i calcoli sono stati ottenuti usando il programma per computer GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA, USA).

Tutti i valori ottenuti rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti.

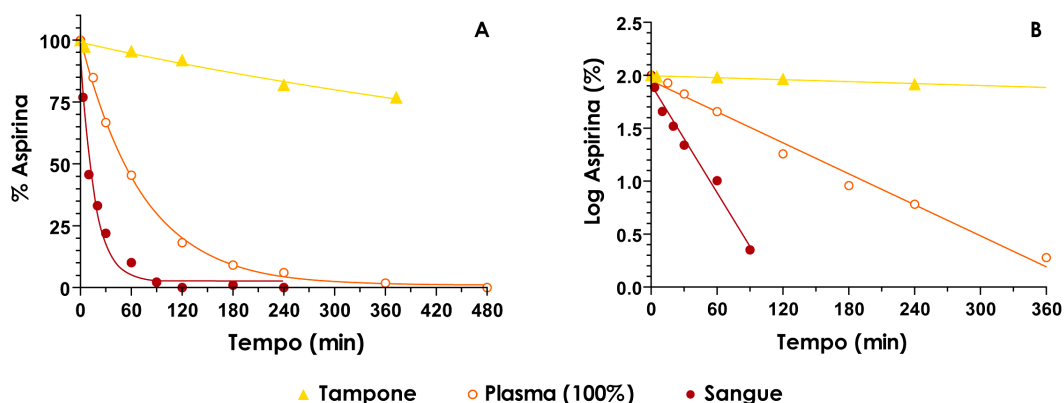
### **4.3 RISULTATI E DISCUSSIONE**

La stabilità dell'aspirina e del suo coniugato AA-Asp è stata valutata in tampone fosfato, plasma umano e sangue intero con lo scopo di valutare il loro meccanismo di degradazione nei fluidi fisiologici e, in particolare, se il coniugato AA-Asp possa essere

considerato un profarmaco dell'aspirina o dell'acido salicilico. Di conseguenza è stata quantificata in plasma e sangue intero la comparsa dell'acido salicilico come un metabolita dell'aspirina e la comparsa dell'acido salicilico e dell'aspirina come metaboliti del coniugato AA-Asp. A riguardo in letteratura è riportato che l'esterificazione del gruppo carbossilico dell'aspirina rende il suo estere O-acetilico altamente suscettibile all'idrolisi mediata dal plasma (Nielsen et al., 1989). Questo fenomeno è dovuto all'enzima butirrilcolinesterasi, un esterasi molto abbondante nel plasma umano che non è in grado di indurre l'idrolisi di substrati carichi negativamente, ma è estremamente efficiente su fenilacetati neutri (Masson et al., 1998). Al fine di rilasciare aspirina nei fluidi fisiologici, è necessario idrolizzare il gruppo coniugato più velocemente rispetto all'estere etilico. Questo si è verificato in plasma con qualche estere glicolamidico dell'aspirina (Nielsen et al., 1989), isosorbide diaspirinato (Gilmer et al., 2002) e un derivato nitroaspirinico (Gilmer et al., 2007). In questo studio le procedure sperimentali sono state quindi condotte con lo scopo di studiare questi processi di idrolisi legati all'aspirina e al suo coniugato AA-Asp nel plasma e nel sangue intero.

La Figura 16A riporta le cinetiche di degradazione dell'aspirina in tampone fosfato, plasma umano e sangue intero. Tutti i processi di degradazione mostrano una cinetica di primo ordine, confermata dalla regressione lineare delle curve semilogaritmiche riportate in Figura 16B ( $r \geq 0.991$ ;  $P < 0.001$ ).

Figura 16. Cinetiche di degradazione a 37°C dell'aspirina in tampone fosfato (pH 7.4), plasma umano e sangue intero umano. [A] Le curve mostrano la percentuale della quantità totale di farmaco rispetto al tempo, ottenuta dal rapporto delle aree dei picchi tra il composto e il suo standard interno. [B] La linearità delle curve semilogaritmiche indica che la degradazione dell'aspirina segue una cinetica di primo ordine. Sono mostrate la linearità e le curve semilogaritmiche di una determinazione rappresentativa



Si può osservare in Tabella I che la percentuale di degradazione aumenta cambiando il mezzo di incubazione dal tampone fosfato ( $t_{1/2} = 16 \pm 1$  h) al plasma umano ( $t_{1/2} = 50 \pm 4$  min) e al sangue intero umano ( $t_{1/2} = 11 \pm 2$  min). Il valore di emivita trovato nel

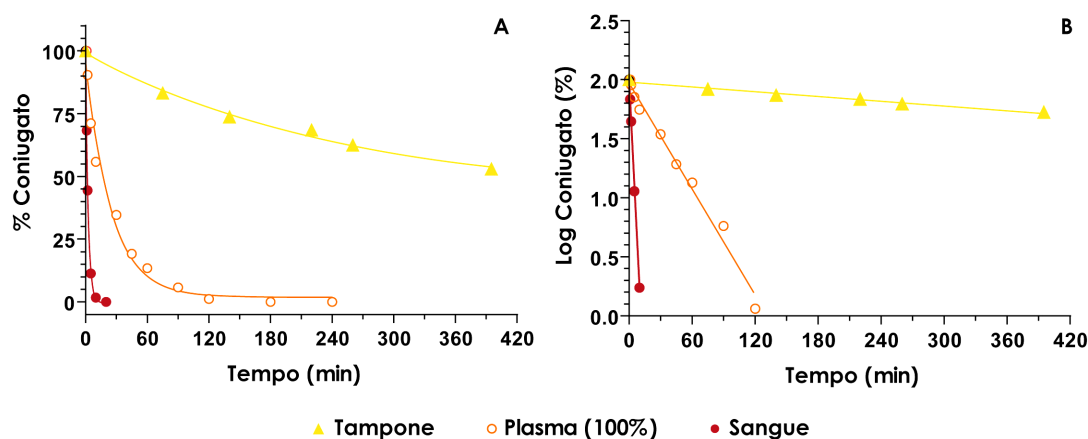
sangue umano non differisce da quello ottenuto in sangue di ratto (Bakar e Niazi, 1983).

Tabella I. Valori del tempo di emivita dell'aspirina e del coniugato AA-Asp ottenuti dalla loro incubazione a 37°C in differenti mezzi. Il plasma 10% è stato ottenuto dalla diluizione del plasma umano in tampone fosfato. L'acido salicilico è stato ottenuto in sangue intero umano come metabolita dell'aspirina. Il suo tempo di emivita è stato calcolato dalla regressione lineare della curva semilogaritmica riferita alla sua degradazione. I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti

Condizioni di incubazione	Tempo di emivita (T1/2)
<b>Aspirina</b>	
Tampone fosfato	16 $\pm$ 1 h
Plasma umano (100%)	50 $\pm$ 4 min
Sangue intero umano	11 $\pm$ 2 min
<b>AA-Asp</b>	
Tampone fosfato	7.4 $\pm$ 0.5 h
Plasma umano (100%)	18 $\pm$ 1 min
Sangue intero umano	1.6 $\pm$ 0.2 min
<b>Acido salicilico (ottenuto dalla degradazione dell'aspirina)</b>	
Sangue intero umano	7.7 $\pm$ 0.7 h

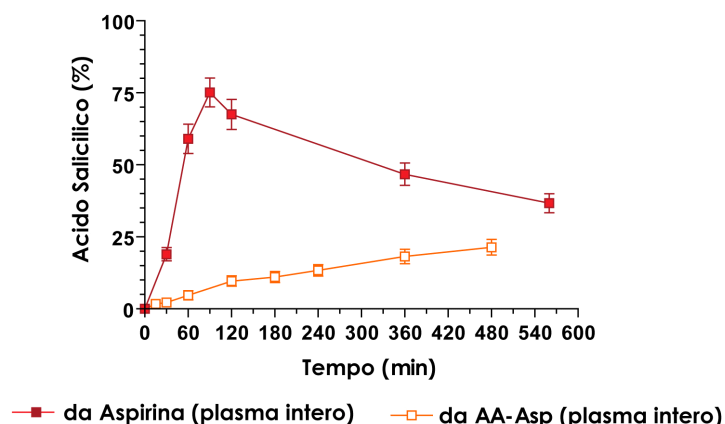
La Figura 17A riporta le cinetiche di degradazione del coniugato AA-Asp in tampone fosfato, plasma umano e sangue intero. Tutti i processi di degradazione mostrano una cinetica di primo ordine, confermata dalla regressione lineare delle curve semilogaritmiche riportate in Figura 17B ( $r \geq 0.991$ ;  $P < 0.001$ ). Si può osservare (Tabella I) che la percentuale di degradazione aumenta cambiando il mezzo di incubazione dal tampone fosfato ( $t_{1/2} = 7.4 \pm 0.5$  h) al plasma umano diluito al 10% ( $t_{1/2} = 18 \pm 1$  min) e al plasma umano al 100% ( $t_{1/2} = 1.6 \pm 0.2$  min). In particolare, in questo mezzo di incubazione il grado di degradazione del coniugato è circa 30 volte più alto di quello dell'aspirina, probabilmente dovuto alla presenza della butirrilcolinesterasi (Masson *et al*, 1998).

Figura 17. Cinetiche di degradazione a 37°C del coniugato AA-Asp in tampone fosfato (pH 7.4), plasma umano o diluito 1:10 in tampone fosfato (plasma 10%). [A] Le curve mostrano la percentuale della quantità totale di farmaco rispetto al tempo, ottenuta dal rapporto delle aree dei picchi tra il composto e il suo standard interno. [B] La linearità delle curve semilogaritmiche indica che la degradazione del coniugato AA-Asp segue una cinetica di primo ordine. Sono mostrate la linearità e le curve semilogaritmiche di una determinazione rappresentativa



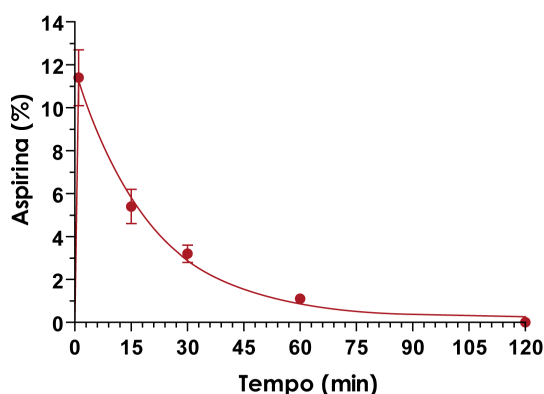
La Figura 18 riporta l'ammontare dell'acido salicilico rilevato nel sangue intero umano come metabolita ottenuto dall'incubazione a 37°C dell'aspirina o del coniugato AA-Asp. I valori sono riportati come percentuali ottenute dai profarmaci di origine. Si può osservare che l'acido salicilico era il principale metabolita dell'aspirina: infatti, dopo 90 min si ottiene un picco corrispondente al 75% della quantità totale di aspirina incubata. Come riportato in Figura 16A, 90 minuti era il tempo necessario per ottenere la completa degradazione (più del 95%) dell'aspirina incubata. Dopo questo tempo, la quantità di acido salicilico decresce seguendo una cinetica di primo ordine con un tempo di emivita di  $7.7 \pm 0.7$  h (Tabella I).

Figura 18. Acido salicilico ottenuto come metabolita dell'aspirina o del coniugato AA-Asp durante la loro incubazione in sangue intero a 37°C. I valori corrispondono alla percentuale ottenuta dal composto di partenza. I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti



I dati riportati in *Figura 18* indicano anche che l'acido salicilico appare come un metabolita del coniugato AA-Asp incubato in sangue intero, anche se sono state ottenute delle quantità relativamente piccole (circa il 25% dopo 8 ore di incubazione) rispetto al metabolismo dell'aspirina. Come evidenziato in *Figura 19*, l'aspirina è uno dei prodotti metabolici ottenuti dalla degradazione del coniugato AA-Asp in sangue intero: infatti, dopo 2 min di incubazione del coniugato, circa l'11% è stato metabolizzato in aspirina le quali quantità decrescono seguendo una cinetica di primo ordine con un tempo di emivita equivalente a quello ottenuto per incubazione diretta del farmaco in sangue umano (*Tabella 1*). Non è stata invece prodotta aspirina dall'incubazione del coniugato AA-Asp in plasma umano.

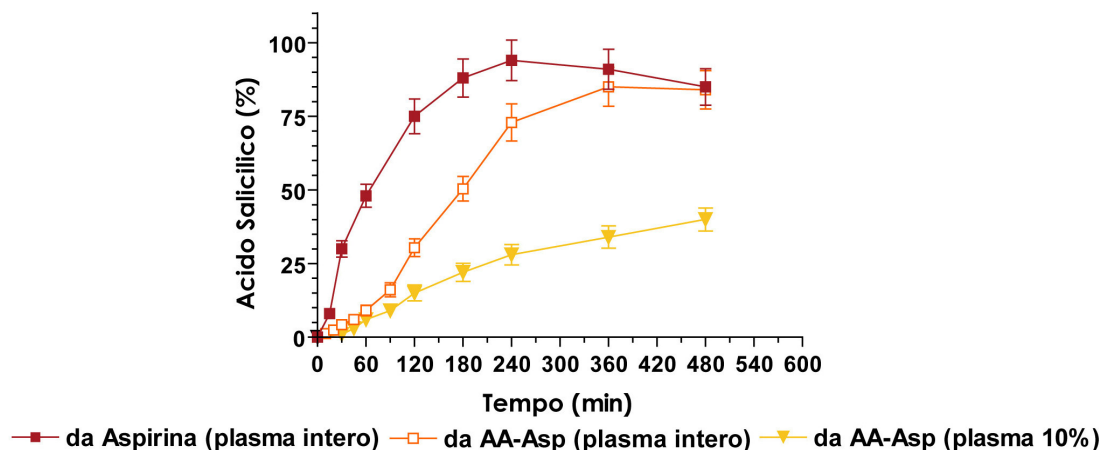
*Figura 19. Aspirina ottenuta come metabolita del coniugato AA-Asp durante la sua incubazione in sangue intero a 37°C. I valori corrispondono alle percentuali formate dal composto di partenza. Dopo una rapida comparsa, l'aspirina veniva degradata secondo una cinetica di primo ordine. I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti*



Il coniugato AA-Asp può essere quindi considerato un profarmaco dell'aspirina quando è incubato in sangue intero ma non quando è incubato in plasma umano. Infatti, il principale metabolita ottenuto dall'incubazione in plasma sia del coniugato AA-Asp che dell'aspirina era l'acido salicilico, come riportato in *Figura 20*. Anche nel caso del plasma diluito, il principale metabolita era l'acido salicilico che è stato ottenuto più lentamente rispetto al plasma intero.

Questi dati evidenziano come la via metabolica del coniugato AA-Asp possa cambiare notevolmente in base al mezzo fisiologico preso in considerazione per le analisi.

Figura 20. Acido salicilico ottenuto come metabolita dell'aspirina o del coniugato AA-Asp durante la sua incubazione in plasma a 37°C. I valori corrispondono alla percentuale ottenuta dal composto di partenza. I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di tre esperimenti indipendenti



#### 4.4 CONCLUSIONI

In base ai risultati di questo studio, il coniugato AA-Asp si comporta da profarmaco dell'aspirina quando incubato in sangue intero ma non quando incubato in plasma dove il suo principale metabolita risulta essere l'acido salicilico. In base a queste evidenze, la presenza del composto AA-Asp nel torrente sanguigno potrebbe consentire una veicolazione dell'aspirina e della vitamina C con un conseguente effetto neuroprotettivo sinergico. Questo coniugato potrebbe essere proposto quindi per l'incapsulamento in sistemi nanoparticellari che sono stati scoperti di recente essere in grado di migliorare l'assorbimento orale e la bioattività di farmaci degradabili nel tratto gastrointestinale (Sarmiento *et al.*, 2007; Bravo-Osuna *et al.*, 2008). Inoltre, studi di somministrazione transdermica potrebbero essere eseguiti con questo profarmaco, considerando che questo approccio è già stato scoperto essere efficace per gli effetti antitrombotici dell'aspirina (Ammar *et al.*, 2006).



## **5. LA SCHIZOFRENIA**

### **5.1 EZIOPATOGENESI**

Un'alterazione della funzionalità del sistema dopaminergico si è dimostrata avere un ruolo fondamentale anche nell'espressione di disturbi psichiatrici come l'abuso di droghe e la schizofrenia (*Koob e Le Moal, 1997; Berridge e Robinson, 1998; Laruelle e Abi-Dargham, 1999; Carlsson et al., 2000; Abi-Dargham, 2004*).

La schizofrenia è attualmente riconosciuta come una malattia multidimensionale caratterizzata dalla possibile manifestazione combinata di sintomi positivi, sintomi negativi, sintomi cognitivi, aggressività/ostilità e sintomi depressivo/ansiosi (*Stahl, 2000*).

L'ipotesi di una disregolazione della dopamina è la spiegazione più plausibile per i sintomi positivi della schizofrenia. In pazienti schizofrenici è stato infatti evidenziato un aumento della trasmissione dopaminergica a livello mesolimbico e una correlazione diretta tra questo aumento e la comparsa dei sintomi positivi quali deliri, allucinazioni, distorsioni o esagerazioni nel linguaggio o nella comunicazione, eloquio e comportamento disorganizzato, comportamento catatonico e agitazione (*Stahl, 2000*). Questo quadro sintomatologico è caratteristico anche della mania, fase del disturbo bipolare che si alterna in modo ciclico nel corso della patologia ad una fase opposta depressiva.

In dettaglio, è stato visto che l'iperattività dopaminergica è associata ad un aumento nei pazienti schizofrenici dei livelli della dopamina rilasciata dalle terminazioni nervose e ad un aumento del numero dei recettori D<sub>2</sub>, come evidenziato dalle analisi tomografiche ad emissione di positroni (PET) (*Laruelle et al., 1996; Abi-Dargham et al., 2000*).

Mentre il circuito mesolimbico è coinvolto nella manifestazione dei sintomi positivi, quello mesocorticale medierebbe alcuni sintomi cognitivi (come ridotta attenzione e capacità di processare le informazioni) e i sintomi negativi (quali atteggiamento passivo, anedonia, ritiro emotivo e sociale e alogia) della schizofrenia (*Stahl, 2000*). L'integrità infatti dei circuiti della corteccia prefrontale è una condizione necessaria al corretto funzionamento della memoria e pertanto sembra che una loro anomalia possa essere all'origine dei deficit cognitivi nei pazienti schizofrenici (*Goldman-Rakic e Selemon, 1997*); inoltre l'ipofunzionalità della corteccia frontale indurrebbe un'iperattività subcorticale soprattutto delle vie dopaminergiche mesolimbiche, in

quanto normalmente la corteccia inibisce le funzioni subcorticali. Ne consegue, quindi, un'iperattività mesolimbica che porta alla manifestazione dei sintomi positivi (*Pani, 2009a*).

Oltre alla dopamina si pensa che siano coinvolti altri neurotrasmettitori nella patogenesi della schizofrenia, infatti anche un deficit del glutammato a livello corticale sembrerebbe essere responsabile di una serie di sintomi cognitivi e negativi (*Carlsson et al., 2000*).

Uno studio preclinico ha dimostrato come un'attivazione dell'ippocampo aumenti l'efflusso di dopamina in regioni come il nucleo accumbens (*Lodge e Grace, 2010*). L'ippocampo rappresenta infatti un sito di convergenza attraverso il quale distinti fattori di rischio come stress, infezioni prenatali, fattori genetici e uso di sostanze stimolanti, possano regolare la funzione del sistema limbico; una sua alterata attività può di fatto aumentare la trasmissione dopaminergica portando alle manifestazioni psicotiche (*Lodge e Grace, 2010*).

Inoltre, una serie di lesioni in particolari aree cerebrali sono state proposte come modelli per la schizofrenia come quelle neonatali a livello dell'ippocampo, quelle a livello della corteccia entorinale e anche lesioni colinergiche in corrispondenza della corteccia cerebrale (*Seeman, 2008*).

E' interessante notare come delezioni di geni non correlati al sistema dopaminergico possano portare ad una "supersensibilità" comportamentale alla dopamina in modelli animali rilevando un aumento dei recettori  $D_2$  nello stato attivo (*Seeman, 2008*). Questi geni includono quelli per il recettore  $GABA_{B1}$ , la proteina chinasi  $A_{RII\beta}$ , la proteina PSD95, la proteina GPRK6, il recettore trace amine-1 e RGS9-2. Considerando l'ipotesi anche di un possibile deficit del glutammato per la schizofrenia, è di particolare interesse la delezione del gene PSD95 che codifica una proteina che consente l'ancoraggio del recettore per il glutammato NMDA alla membrana cellulare favorendo la formazione di un dimero con i recettori  $D_1$  e  $D_2$ . Un suo deficit sembra proprio causare una "supersensibilità" alla dopamina e un aumento dei recettori  $D_2$  (*Seeman, 2008*). Studi sul ratto hanno inoltre evidenziato che anche l'ipossia alla nascita durante un parto cesareo, l'isolamento sociale, l'esposizione a sostanze da abuso e l'uso di dosi elevate di corticosterone possono portare ad una supersensibilità comportamentale alla dopamina (*Seeman, 2008*).

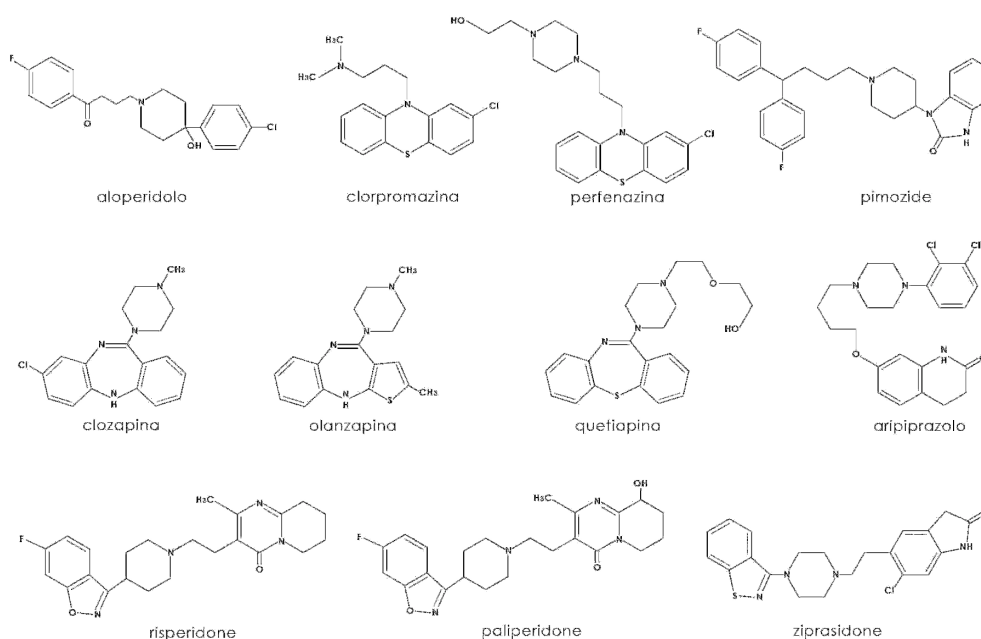
## 5.2 TRATTAMENTO FARMACOLOGICO

Considerato che alla base della schizofrenia, in particolare dei sintomi positivi, ci sia un aumento del segnale dopaminergico, i farmaci più impiegati per il trattamento di questa patologia sono rappresentati dagli antipsicotici il cui target principale comune è il recettore  $D_2$ ; si ritiene infatti che le principali proprietà terapeutiche degli antipsicotici siano mediate dal blocco dei recettori  $D_2$  della via dopaminergica mesolimbica. Tutti i farmaci presentano una diversa potenza nei confronti di questo recettore, la potenza dipende dalla costante di dissociazione che è correlata alla porzione rilasciata di farmaco dal recettore  $D_2$  (Seeman, 2000). Dosi terapeutiche di un antipsicotico generalmente occupano dal 60 all'80% dei recettori  $D_2$  *in vivo* (Seeman, 2010).

Tra gli antipsicotici è possibile distinguere (Figura 21) :

- gli antipsicotici tipici o di prima generazione quali l'aloiperidolo, la clorpromazina, la pimozide e la perfenazina caratterizzati da un elevato antagonismo per i recettori  $D_2$ ;
- gli antipsicotici atipici o di seconda generazione quali il risperidone, la clozapina, la quetiapina, l'olanzapina, il paliperidone, lo ziprasidone e l'aripiprazolo caratterizzati da un profilo multirecettoriale non selettivo per i recettori  $D_2$ .

Figura 21. Principali antipsicotici tipici e atipici

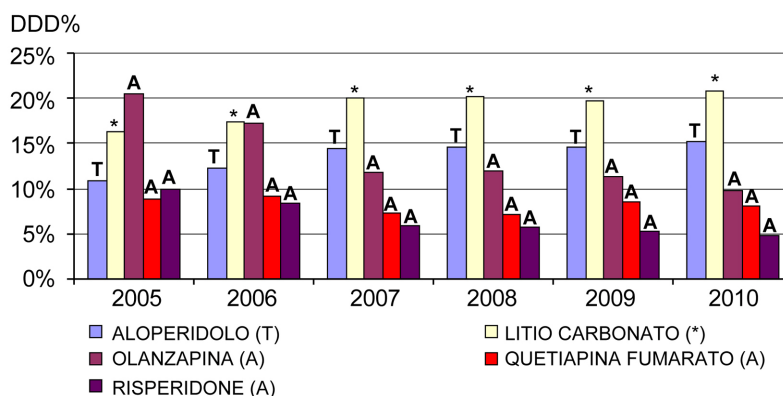


## 5.3 I FARMACI PIU' IMPIEGATI: POTENZIALITA' E LIMITI

### 5.3.1 Dati di consumo in Italia dei farmaci antipsicotici

La *Figura 22* riporta i 5 farmaci più impiegati tra gli antipsicotici in Italia. I dati di consumo fanno riferimento al periodo 2005 - 2010 (al 31 ottobre) e sono espressi in DDD/1000 abitanti die come percentuale sull'intera classe terapeutica (DDD%), in analogia a quanto definito per i farmaci antiparkinson. I dati sono stati ottenuti in collaborazione con la Dott.ssa A. Campi e Dott.ssa A. Benini del Dipartimento Farmaceutico Interaziendale, U.O. Assistenza Farmaceutica AUSL di Ferrara, consultando la Banca Dati AIFA (progetto SFERA).

*Figura 22. Consumo in Italia dei farmaci antipsicotici espresso in DDD/1000 abitanti die per ogni principio attivo come percentuale sull'intera classe terapeutica (DDD%) per il periodo 2005 - 2010 (al 31 ottobre)*



Si può osservare in *Figura 22* che tra i 5 farmaci antipsicotici più consumati 3 sono atipici (l'olanzapina, il risperidone e la quetiapina), solo uno è un tipico (l'aloperidolo). Il litio è presente all'interno della classe terapeutica degli antipsicotici (ATC N05) ma non è indicato nel trattamento della schizofrenia, il suo consumo fa quindi riferimento alle indicazioni per le quali è approvato ovvero fasi maniacali, depressive e di mantenimento nel disturbo bipolare.

### 5.3.2 Complicazioni legate al trattamento con gli antipsicotici

Gli antipsicotici non hanno un'azione antagonista specifica sui recettori D<sub>2</sub> della via mesolimbica ma interferiscono anche con le vie dopaminergiche a livello nigrostriatale

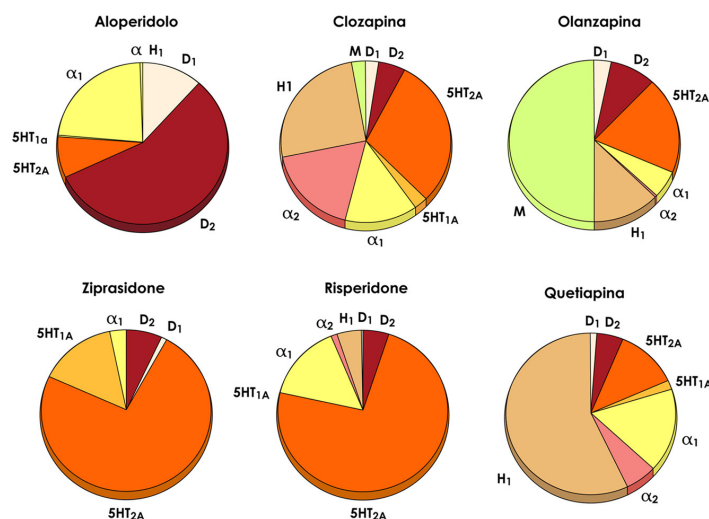
e mesocorticale. Il blocco contemporaneo della via dopaminergica mesocorticale potrebbe indurre o peggiorare i sintomi cognitivi e negativi della schizofrenia, tale situazione è descritta come "sindrome maligna indotta da neurolettici" i cui possibili effetti collaterali possono essere infatti l'ottundimento cognitivo, il ritiro sociale, l'anedonia, l'abulia, il rallentamento psicomotorio e anche l'ipertermia (Geddes *et al.*, 2000). A livello della via nigrostriatale si verificano invece effetti collaterali extrapiramidali da attribuire ad un'occupazione dei recettori  $D_2$  superiore all'80% (Pani, 2007). Queste manifestazioni possono essere ricondotte ad un'abnorme sensibilizzazione o ad un aumento compensatorio dei recettori in risposta all'antagonismo funzionale indotto dai farmaci antipsicotici (Pani, 2009a).

Gli antipsicotici classici di prima generazione risultano efficaci nel controllo dei sintomi positivi ma presentano importanti effetti collaterali che ne limitano il loro impiego.

Esiste una relazione diretta tra l'efficacia antipsicotica e l'affinità per i recettori  $D_2$ . Studi PET nell'uomo hanno infatti evidenziato che l'aloiperidolo è l'antipsicotico con la maggiore capacità di occupazione recettoriale e che in generale i neurolettici classici hanno livelli di occupazione più alti e una velocità di dissociazione più bassa rispetto agli atipici (Strange, 2001). Ne consegue una maggiore incisività clinica e rapidità d'azione ma anche la più elevata incidenza di effetti extrapiramidali e il concomitante peggioramento dei sintomi negativi (Pani, 2009a).

L'uso corrente del termine "antipsicotico atipico" venne usato per la prima volta per la clozapina che rispetto ai neurolettici classici risultava atipica in quanto alle dosi terapeuticamente efficaci per i sintomi positivi non induceva la catalessia tipica negli animali o effetti extrapiramidali nei pazienti (Hippius, 1989).

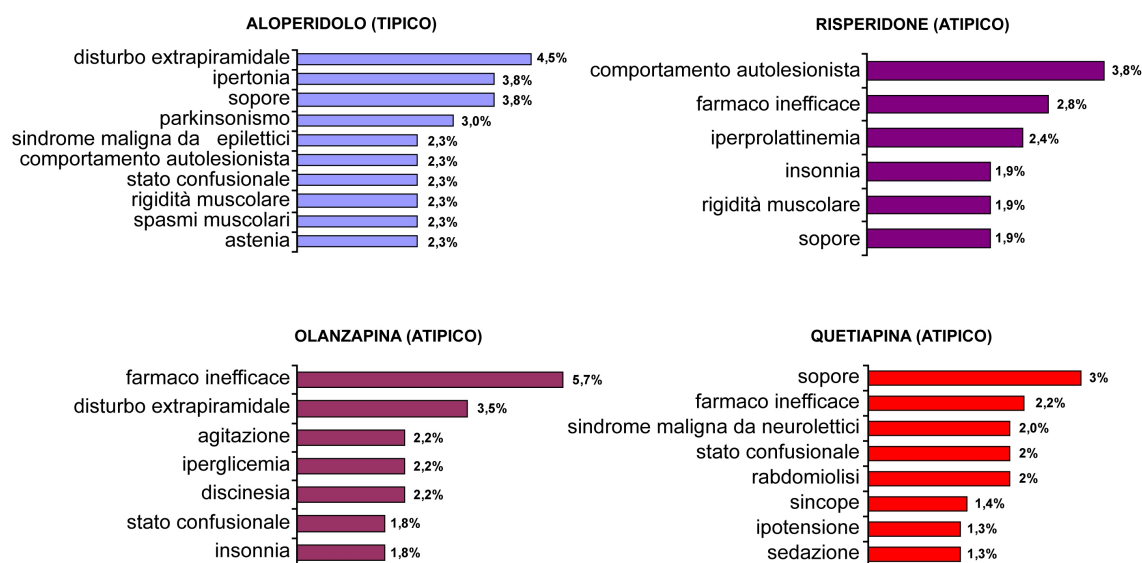
Figura 23. Profili recettoriali degli antipsicotici atipici.  $D_1$ ,  $D_2$  = dopamina;  $5HT_{1A}$ ,  $5HT_{2A}$  = serotonina;  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  = noradrenalina; M = acetilcolina;  $H_1$  = istamina



Le differenze tra tipici e atipici sono da correlare alla diversa affinità per i recettori  $D_2$  e non (*Figura 23*), in particolare l'antagonismo  $5HT_{2A}$  sembra avere un ruolo importante per l'atipicità contribuendo all'azione terapeutica mediante miglioramento dell'umore e dei processi cognitivi (*Goldstein, 2000*). Noto infatti che i neuroni serotonergici del nucleo del raphe dorsale innervano i neuroni dopaminergici della sostanza nera e della VTA (*Dray et al., 1976; Van der Kooy e Hattoria, 1980; Herve et al., 1987*), l'inibizione dell'attività serotonergica determina un potenziamento della trasmissione dopaminergica, questo spiegherebbe i ridotti effetti collaterali extrapiramidali degli antipsicotici atipici e la loro efficacia sui sintomi negativi in quanto l'antagonismo serotonergico consentirebbe di modulare l'intensità degli effetti collaterali legati al blocco delle funzioni dopaminergiche a livello corticale e nigrostriatale (*Pani, 2009a*).

A sostegno di quanto riportato in letteratura sul profilo di tollerabilità degli antipsicotici tipici e atipici, la *Figura 24* mostra le principali reazioni avverse segnalate in Italia nel periodo 2005 - 2010 (fino al 31 ottobre) per i farmaci antipsicotici più utilizzati ovvero, per l'antipsicotico tipico aloperidolo e per gli antipsicotici atipici risperidone, olanzapina e quetiapina. I dati sono stati ottenuti in collaborazione con la Dott.ssa A. Campi e Dott.ssa A. Benini del Dipartimento Farmaceutico Interaziendale, U.O. Assistenza Farmaceutica AUSL di Ferrara, consultando la Banca Dati AIFA – Rete Nazionale di Farmacovigilanza.

*Figura 24. Principali reazioni avverse segnalate in Italia per l'antipsicotico tipico aloperidolo e per gli antipsicotici atipici risperidone, olanzapina e quetiapina nel periodo 2005 - 2010 (al 31 ottobre)*



Come si può osservare dalla *Figura 24*, l'aloperidolo presenta un maggior numero di effetti extrapiramidali rispetto al risperidone, l'olanzapina e la quetiapina.

---

### 5.3.3 Nuovi sviluppi formulativi per rimediare alle complicazioni legate al trattamento con gli antipsicotici

Rispetto agli antipsicotici tipici, quelli atipici sono generalmente ben tollerati, tuttavia le complesse modalità posologiche, la variabilità delle risposte nell'attività cerebrale e il tempo necessario alla comparsa dell'effetto terapeutico (fino a 4 settimane) possono compromettere la risposta individuale al trattamento tanto da richiedere aggiustamenti della dose di farmaci oppure uno switch ad altre molecole (*Pani, 2009b*).

Tutte queste situazioni possono complicare l'adesione del paziente alla terapia. In tutti i pazienti, in particolare quelli affetti da schizofrenia, la mancata assunzione del farmaco produce un progressivo e sostanziale peggioramento dei sintomi, un aumento della frequenza delle ospedalizzazioni, un esito peggiore e un aumento dei costi sanitari per la salute mentale (*Gray, 2002*). Una modalità di assunzione più semplice, come ad esempio una sola compressa al giorno, garantisce una migliore aderenza al trattamento che qualunque sia la patologia è inversamente proporzionale alla frequenza delle somministrazioni (*Claxson et al., 2001*).

Inoltre, recentemente al concetto tradizionale di affinità recettoriale nella valutazione dell'efficacia e della tollerabilità di un antipsicotico, si sono aggiunti anche quello di tempo di dissociazione e quello di disponibilità del farmaco sul recettore nel corso del tempo. L'esperienza con farmaci a lento rilascio, che determinano una minore fluttuazione dei livelli plasmatici del principio attivo e dei suoi metaboliti e un'occupazione recettoriale più stabile, ha evidenziato la possibilità di migliorare gli esiti clinici del trattamento (*Pani, 2007*).

Casi esemplari sono il Risperidal Iniettabile<sup>®</sup> e Zypadhera<sup>®</sup>, formulazioni iniettabili a lento rilascio rispettivamente del risperidone e dell'olanzapina. Nel caso del risperidone la formulazione è una sospensione iniettabile per uso intramuscolare da somministrare ogni due settimane previa sospensione della polvere contenente il polimero 7525 DL JN1 poli-(d,1-Lattide-co-Glicolide) responsabile del rilascio prolungato (Risperdal Iniettabile<sup>®</sup> Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto). Per l'olanzapina in forma iniettabile, invece, il principio attivo è stato esterificato per ottenere il derivato pamoato. L'estere è dissolto in un olio vegetale che forma un depot quando iniettato per via intramuscolare, essendo poco solubile in acqua diffonde lentamente nel sangue dove viene poi rapidamente idrolizzato per liberare il principio attivo. Con questa formulazione iniettabile si ottiene un lento e continuo rilascio dell'olanzapina per più di quattro settimane (*Lindermayer, 2010*). Nel caso specifico del risperidone, il trattamento a rilascio prolungato grazie ad un profilo farmacocinetico caratterizzato da fluttuazioni minime è stato associato ad una minore frequenza di effetti collaterali e non richiede l'assunzione giornaliera (*Ereshesky e Mascarenas, 2003*).

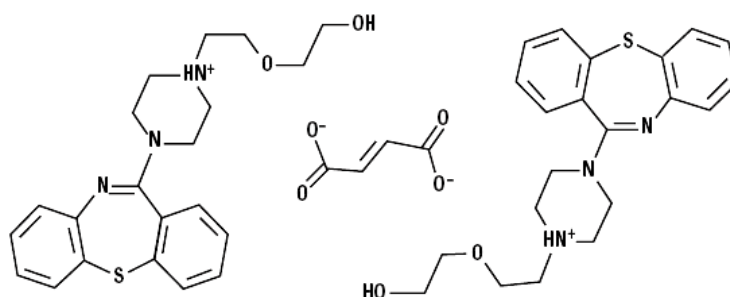
Anche il paliperidone (derivato del metabolismo del risperidone, *Figura 21*) è formulato mediante un sistema a rilascio modificato, ovvero un sistema osmotico progressivo (tecnologia OROS) che si presenta sottoforma di compressa per uso orale. In dettaglio, il paliperidone è contenuto a concentrazioni differenti in due compartimenti, mentre un terzo compartimento, costituito da componenti osmoticamente attivi che assorbono acqua dall'ambiente circostante, aumenta la pressione dell'interno della compressa in modo da rilasciare il principio attivo attraverso due fori di precisione situati all'estremità superiore. L'involucro esterno della compressa è costituito da una membrana semipermeabile non scindibile e non assorbibile. Anche in questo caso, mediante un rilascio controllato, è possibile minimizzare le fluttuazioni plasmatiche riducendo l'incidenza degli effetti extrapiramidali (*Spina e Cavallaro, 2007*).

### 5.3.4 Potenziali vantaggi di una formulazione a rilascio modificato: il caso specifico della quetiapina

#### 5.3.4.1 Limiti nell'uso della quetiapina come antipsicotico

Tra gli antipsicotici atipici, anche la quetiapina è disponibile in commercio in due formulazioni: compresse rivestite con film a rilascio immediato (RI) (nei dosaggi di 25 mg, 100 mg, 200 mg e 300 mg) e compresse a rilascio prolungato (RP) (nei dosaggi di 50 mg, 200 mg, 300 mg e 400 mg) come sale fumarato (*Figura 25*).

*Figura 25. Formula chimica della quetiapina fumarato*



Nella *Tabella II* è possibile evidenziare le differenze in eccipienti tra le due formulazioni RI e RP (*Seroquel<sup>®</sup> compresse rivestite con film, Riassunto delle caratteristiche del prodotto; Seroquel<sup>®</sup> compresse a rilascio prolungato, Riassunto delle caratteristiche del prodotto*).



La formulazione RP è rappresentata da un sistema a matrice a base di idrossipropilmetilcellulosa (HPMC). L'HPMC a contatto con i liquidi gastrointestinali si rigonfia e forma una strato gelatinoso intorno alla compressa. L'idratazione del polimero e la viscosità del sistema determinano la velocità di rilascio del farmaco. Ne consegue un rallentamento nel rilascio del farmaco nel tratto gastrointestinale e conseguentemente nell'assorbimento rispetto alla formulazione RI (*Pani e Strada 2009a*).

Tabella II. Eccipienti delle compresse a rilascio immediato e prolungato di quetiapina

COMPRESSE A RILASCIO IMMEDIATO	COMPRESSE A RILASCIO PROLUNGATO
<b>Nucleo</b>	<b>Nucleo</b>
- Povidone	- Idrossipropilmetilcellulosa (100 e 4000 cP)
- Calcio Fosfato dibasico diidrato	- Sodio citrato
- Cellulosa microcristallina	- Cellulosa microcristallina
- Lattosio monoidrato	- Lattosio monoidrato
- Carbossimetilamido sodico	- Magnesio stearato
- Magnesio stearato	
<b>Rivestimento</b>	<b>Rivestimento</b>
- Idrossipropilmetilcellulosa	- Idrossipropilmetilcellulosa
- Macrogol	- Macrogol
- Titanio diossido	- Titaniodiossido
- Ossido di ferro giallo/rosso	- Ossido di ferro giallo/rosso

Diversamente dagli antipsicotici citati in precedenza le cui formulazioni a rilascio prolungato consentono di ridurre gli effetti extrapiramidali, la quetiapina, derivato dibenzotiazepinico, rappresenta un caso particolare. Osservando il suo profilo recettoriale (*Figura 23*), la quetiapina mostra infatti una prevalente affinità per i recettori  $H_1$  e  $\alpha_1$  rispetto ai recettori  $D_2$ . Ne conseguono la necessità di impiegare alti dosaggi per ottenere l'effetto antipsicotico e la manifestazione di sedazione, ipotensione ortostatica, sincope e vertigini come principali effetti collaterali, rispetto a quelli extrapiramidali, che limitano l'impiego degli alti dosaggi richiesti già dai primi giorni di trattamento (*Seroquel® compresse rivestite con film, Riassunto delle caratteristiche del prodotto*).

In base a queste considerazioni è necessario quindi effettuare, con la formulazione RI, una titolazione lenta (50 mg il primo giorno, 100 mg il secondo giorno, 200 mg il terzo giorno e 300 mg il quarto giorno) al fine di limitare la manifestazione degli effetti indesiderati. La necessità di una titolazione lenta se da un lato riduce gli effetti collaterali dall'altro porta ad un rischio di inefficacia del farmaco nei primi giorni di

trattamento, considerando che la dose terapeutica efficace è di 600 mg/die (Kahn et al., 2007; Pani e Strada 2009a).

Come già evidenziabile nella Figura 24, proprio l'inefficacia del farmaco insieme a sincope, sedazione e ipotensione sono stati segnalati in Italia tra le principali reazioni avverse per la quetiapina nel periodo 2005 - 2010 (al 31 ottobre) (Figura 26).

Figura 26. Incidenza degli eventi avversi quali sedazione, ipotensione, sincope e farmaco inefficace segnalati per la quetiapina in Italia nel periodo 2005 – 2010 (al 31 ottobre)



In base a queste evidenze, è stata progettata una nuova formulazione a rilascio prolungato della quetiapina al fine di offrire dei vantaggi terapeutici rispetto alla formulazione RI, ovvero: ritardare il rilascio del principio attivo e ridurre le fluttuazioni, in particolare i picchi, delle concentrazioni plasmatiche in modo da consentire un'occupazione più graduale e più stabile nel tempo dei recettori  $H_1$  e  $\alpha_1$  e limitare quindi gli effetti collaterali; assicurare la stessa esposizione totale/die di quetiapina con la medesima dose totale; migliorare la compliance del paziente grazie alla monosomministrazione giornaliera (Pani e Strada, 2009a).

#### 5.3.4.2 Attività antidepressiva del metabolita della quetiapina N-desalchilquetiapina (norquetiapina)

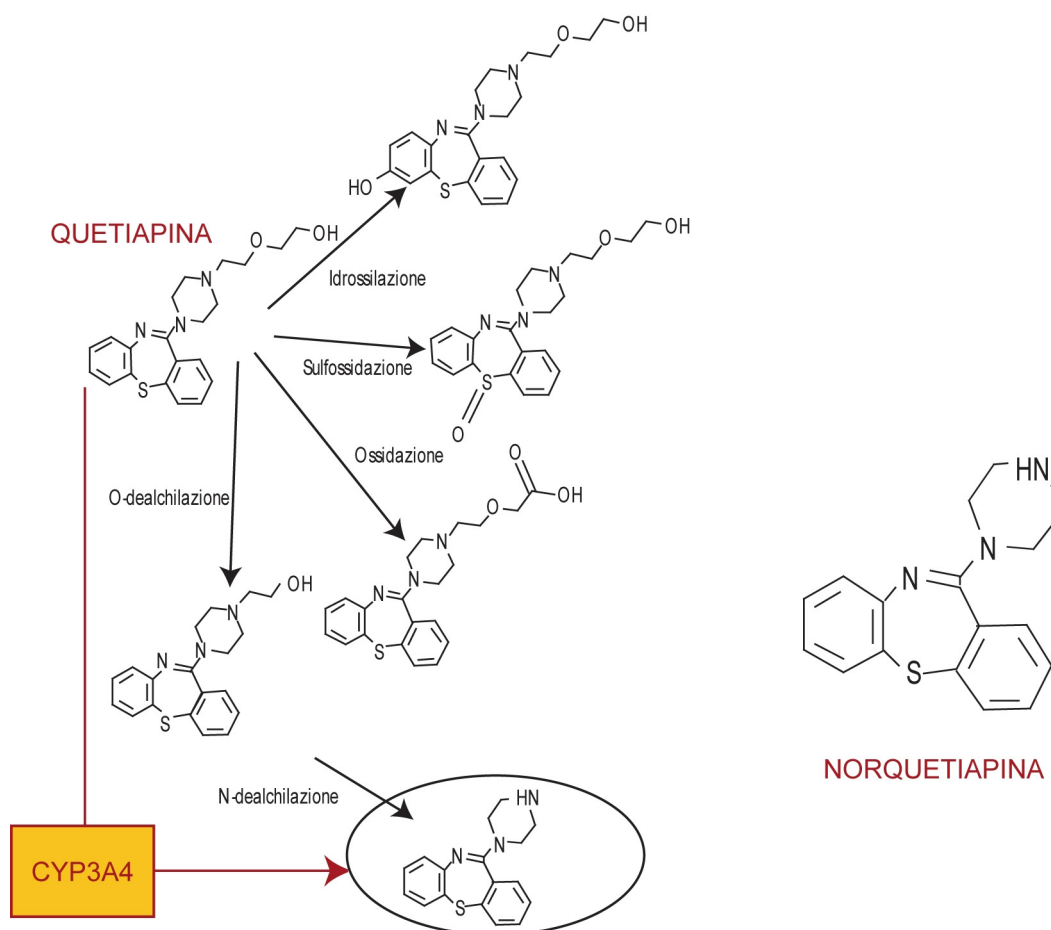
La quetiapina si distingue dagli altri antipsicotici in quanto, oltre all'azione antipsicotica, ha dimostrato un'attività antidepressiva, è infatti l'unico antipsicotico ad essere indicato in monoterapia non solo per il trattamento della schizofrenia e della mania ma anche della depressione bipolare (Pani e Strada, 2009b). La depressione bipolare rappresenta una fase del disturbo bipolare, malattia con andamento ciclico caratterizzata dall'alternarsi improvviso e incontrollato dell'umore da stato maniacale a depressivo e la cui attuale terapia prevede l'impiego di una combinazione di farmaci in grado di stabilizzare l'umore (quali il litio e anticonvulsivanti come la lamotrigina e il

valproato), farmaci antipsicotici per lo stato maniacale e antidepressivi per lo stato depressivo.

La spiegazione della peculiare azione antidepressiva della quetiapina è da ricercare nel suo metabolismo. La quetiapina è infatti, tra gli antipsicotici, un caso paradigmatico di farmaco metabolizzato a livello epatico.

Come per il risperidone (dal cui metabolismo si ottiene il composto attivo paliperidone) e diversamente da altri antipsicotici, il metabolismo a livello epatico della quetiapina porta alla formazione di una serie di metaboliti (oltre 20) tra i quali un composto attivo ovvero la N-desalchilquetiapina o norquetiapina per azione specifica del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) (Figura 27).

Figura 27. Metabolismo della quetiapina a livello epatico. Per azione specifica del citocromo P450 3A4 (CYP3A4) si ottiene il metabolita attivo N-desalchilquetiapina o norquetiapina

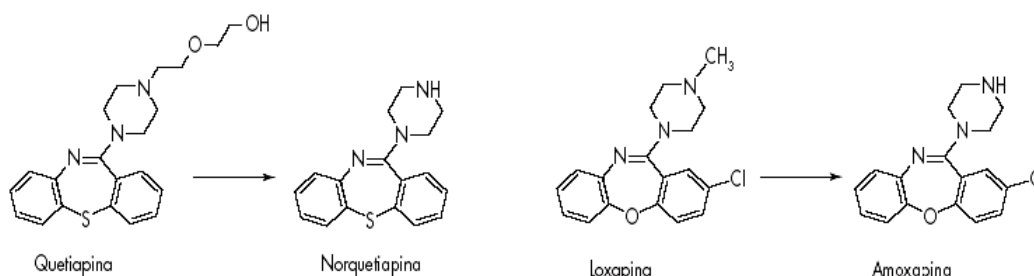


Tuttavia, diversamente dal caso del risperidone, il cui metabolita paliperidone presenta un profilo di attività clinica sovrapponibile a quello del precursore, la quetiapina, farmaco antipsicotico ed antimaniacale, dà luogo ad un metabolita con prevalenti attività antidepressive. Infatti, è stato visto che la norquetiapina aumenta i livelli extracellulari della noradrenalina grazie alla sua azione inibitoria sullo specifico trasportatore di membrana (norepinephrine transporter, NET), deputato al re-uptake della noradrenalina a livello dello spazio intersinaptico (Jensen et al., 2008).

L'affinità della norquetiapina per il NET è paragonabile a quella degli antidepressivi con azione noradrenergica e suggerisce che la molecola agisca in modo simile agli antidepressivi inibitori specifici del re-uptake della noradrenalina (norepinephrine reuptake inhibitor, NRI) (Pani e Strada 2009b). Questa osservazione è confermata da studi condotti su modelli animali per i quali sia la quetiapina che la norquetiapina esercitano un effetto ansiolitico sui modelli d'ansia dei roditori (*punished responding task*) ma solo la norquetiapina svolge un'azione antidepressiva sui modelli sperimentali di depressione (*forced swimming test*) (Hudzik et al., 2008). Inoltre 5 studi clinici condotti in pazienti con disturbo bipolare hanno confermato l'efficacia antidepressiva della quetiapina rispetto al placebo e confrontata con i farmaci di scelta per il trattamento della depressione bipolare, ovvero il litio e la paroxetina (Calabrese et al., 2005; Thase et al., 2006; McElroy et al., 2010; Young et al., 2010; Suppes et al., 2010).

Un'analogia situazione è identificabile nel caso della loxapina, farmaco con struttura chimica simile alla quetiapina (Figura 28), commercializzata negli Stati Uniti. La loxapina, anch'essa metabolizzata dal CYP3A4, produce un metabolita attivo, l'amoxapina, commercializzato nello stesso paese come antidepressivo (Pani e Strada 2009b).

Figura 28. Formula di struttura della quetiapina e della loxapina e dei rispettivi metaboliti attivi, norquetiapina ed amoxapina



Oltre a essere influenzato dalle differenze interindividuali, etniche e dalla co-somministrazione di farmaci (interazioni), il profilo metabolico della quetiapina e il conseguente effetto antipsicotico/antidepressivo può essere condizionato dalle due

differenti formulazioni di quetiapina RI e RP. Il differente profilo farmacocinetico delle due formulazioni può, infatti, essere messo in relazione ad una diversa capacità del CYP3A4 di metabolizzare la quetiapina e, di conseguenza, di produrre la norquetiapina.

In particolare, un picco di concentrazione pronunciato riferibile alla formulazione RI comporterebbe una rapida e massiva occupazione del CYP3A4 da parte di quetiapina. Ciò potrebbe ridurre la capacità del citocromo di metabolizzare la quetiapina e produrre quindi la norquetiapina. Questo fenomeno potrebbe essere evitato con la formulazione RP che, mediante un meccanismo a lento rilascio del principio attivo, garantirebbe delle variazioni di concentrazione plasmatica di quetiapina tali da favorire un'occupazione più graduale e più stabile del CYP3A4 evitando ipotetici fenomeni di saturazione o autonibizione. Un'occupazione più graduale e più stabile, si può tradurre in una maggiore efficienza del CYP3A4 nella metabolizzazione della quetiapina in norquetiapina; considerata l'azione inibitoria della norquetiapina sull'attività del NET, si potrebbe supporre un potenziamento dell'effetto antidepressivo con formulazione RP rispetto alla formulazione RI.

## **6. STUDI DI CONFRONTO DEL PROFILO FARMACOCINETICO TRA LE DUE FORMULAZIONI A RILASCIO IMMEDIATO E PROLUNGATO DELLA QUETIAPINA (Pani e Strada, 2009; Pira et al., 2010)**

### **6.1 INTRODUZIONE**

Come descritto in precedenza, la somministrazione orale della quetiapina per il trattamento della schizofrenia mediante compresse a rilascio immediato è associata alla manifestazione di eventi avversi quali sedazione, vertigini, ipotensione e sincope da attribuire all'elevata affinità del principio attivo per i recettori  $H_1$  e  $\alpha_1$ . Al fine di limitare queste manifestazioni è necessario impiegare nei primi giorni di terapia dei dosaggi più bassi di quelli richiesti con il rischio di inefficacia del trattamento nel controllo dei sintomi psicotici nelle fasi acute. Una formulazione a rilascio prolungato della quetiapina è stata progettata per controllare il rilascio e di conseguenza ridurre le fluttuazioni plasmatiche del principio attivo, in particolare i picchi, in modo da favorire un'occupazione meno rapida e più stabile nel tempo dei recettori  $H_1$  e  $\alpha_1$ . Un rilascio controllato può inoltre influenzare l'attività del citocromo CYP3A4 nel trasformare la quetiapina nel metabolita norquetiapina di cui è nota un'attività antidepressiva.

Una serie di studi clinici sono stati condotti al fine di confrontare il profilo farmacocinetico tra le due formulazioni di quetiapina ed evidenziarne le differenze più significative.

La mia attività si è focalizzata sulla messa a punto di un metodo analitico per la determinazione quantitativa della quetiapina e del suo metabolita in campioni biologici e sulla valutazione dei parametri farmacocinetici rilevati nel corso degli studi condotti per le due formulazioni.

Obiettivo di un primo studio è stato il confronto della farmacocinetica dopo singola somministrazione di quetiapina a rilascio immediato (RI) alla dose di 300 mg e quetiapina a rilascio prolungato (RP) alla dose di 300 mg in pazienti con disturbi psicotici, mentre in un secondo studio è stata valutata la farmacocinetica allo stato stazionario (*steady-state*) dopo somministrazione di quetiapina RP in una singola dose di 300 mg e quetiapina RI in due dosi di 150 mg a distanza di 12 ore l'una dall'altra sempre in pazienti con disturbi psicotici.

Per la valutazione specifica del profilo metabolico, è stato analizzato uno studio il cui obiettivo era il confronto della farmacocinetica delle formulazioni di quetiapina RP 50 mg e RP 400 mg (1 compressa in un'unica assunzione) e della formulazione RI 200

mg x 2 (2 compresse in un'unica assunzione) in pazienti con schizofrenia, disturbi schizoaffettivi e disturbo bipolare

Le variabili farmacocinetiche valutate per la quetiapina e i suoi metaboliti nel corso degli studi sono state :

- $C_{max}$ , massima concentrazione plasmatica;
- $T_{max}$ , tempo corrispondente alla  $C_{max}$ ;
- $AUC_{(0-24h)}$ , area sottesa alla curva della concentrazione plasmatica da 0 a 24 ore;
- $T_{1/2}$ , tempo di dimezzamento della quantità di farmaco nell'organismo.

## 6.2 PARTE SPERIMENTALE

### 6.2.1 Analisi LC/MS/MS della quetiapina e del suo metabolita norquetiapina

Il metodo analitico LC/MS/MS per la determinazione della quetiapina e della norquetiapina è stato messo a punto in collaborazione con il centro di ricerca Pharmaness Neuroscienze di Pula (CA) nel corso dell'esperienza formativa presso l'azienda AstraZeneca S.p.A.

#### 6.2.1.1 Materiali

La quetiapina e la norquetiapina sono state ottenute per gentile concessione da AstraZeneca (Lund, Svezia). La clozapina è stata ottenuta da Tocris Bioscience. L'ammonio acetato con grado di purezza per analisi HPLC e l'acido formico 98-100% ACS Reag. Ph. Eur sono stati acquistati rispettivamente da Fluka Chemie (Bucks, Svizzera) e da Reagent Riedel de Haen. L'acetonitrile Chromasolv con grado di purezza per HPLC è stato fornito da Sigma Aldrich. L'acqua MilliQ<sup>®</sup> impiegata è stata ottenuta dall'apparato Millipore MilliQ Gradient A10.

#### 6.2.1.2 Condizioni strumentali

L'apparato cromatografico consisteva in un sistema modulare (Waters Alliance 2695) composto da autocampionatore, forno e pompa a quattro vie. La separazione è stata ottenuta a temperatura di 40°C su una colonna a fase inversa (X-bridge C18 3.5 µm 2.1x100mm, Waters). Le analisi sono state condotte in gradiente con una miscela di acetonitrile (fase A) e tampone ammonio acetato 10 mM pH 3.5 (fase B) (*Tabella IIIA*).

Tabella IIIA. Composizione del gradiente per il metodo HPLC

TEMPO(min)	A%	B%
0.0	50	50
1.0	50	50
6.5	0	100
6.6	50	50

Si è proceduto con un'iniezione automatica di 5 µL di campione pescato dai vials presenti nell'autocampionatore a +15°C. Il flusso era di 0.3 mL/min e il tempo di ritenzione era  $1.24 \pm 0.2$  min sia per la quetiapina e il suo metabolita norquetiapina che per la clozapina impiegata come standard interno.

Lo spettrometro di massa consisteva in un Micromass Quattro Micro API Waters, i parametri impostati per l'analisi, lavorando con ionizzazione positiva, sono riportati nella *Tabella IIIB*.

Tabella IIIB. Parametri impostati per lo spettrometro di massa

VOLTAGGIO	
Capillare	3.00Kv
Cono	38 v
Extractor	3 v
Lente RF	0.5 v
TEMPERATURA	
Sorgente	120 °C
Desolvatazione	350° C
FLUSSO DEL GAS (Azoto)	
Desolvatazione	800 L/h
Cono	50 L/h



Le prove di infusione sono state condotte infondendo soluzioni standard per ciascun composto in analisi con concentrazione pari a 1 µg/mL in acetonitrile-metanolo 50/50 v/v. L'infusione è stata condotta con un flusso di fase mobile pari a 0.1 mL/min e composta da acetonitrile (fase A) e tampone ammonio acetato 10 mM pH 3.5 (fase B) in rapporto 50:50. Le soluzioni standard utilizzate sono state iniettate con una siringa Hamilton 250 µL; il flusso dalla siringa è stato regolato a 5 µL/min per la scansione dello ione padre relativo a tutte le molecole studiate e a 10 µL/min per tutti gli ioni figlio. Le transizioni che sono state monitorate erano 384.1 > 253.1 m/z per la quetiapina, 296.1 > 253.0 m/z e 327.1 > 270.1 m/z rispettivamente per la norquetiapina e la clozapina utilizzata come standard interno. L'energia di collisione settata, durante le prove di infusione e per l'analisi, era 40, 24 e 25 rispettivamente per la quetiapina, la norquetiapina e la clozapina.

L'acquisizione dei dati e l'elaborazione è stata ottenuta mediante un personal computer usando il software MassLynx V4.1.

#### **6.2.1.3 Preparazione delle soluzioni standard**

Soluzioni stock di quetiapina, norquetiapina e clozapina (1 mg/mL) sono state preparate separatamente in acetonitrile-metanolo 50/50 v/v e conservate ad una temperatura di +4 °C. Le soluzioni standard per le prove di infusione (1 µg/mL) e quelle per la messa a punto della corsa cromatografia e del metodo HPLC (1, 20, 50 ng/mL) sono state preparate in seguito ad appropriate diluizioni delle soluzioni stock in acetonitrile-metanolo 50/50 v/v.

#### **6.2.2 Studi di farmacocinetica**

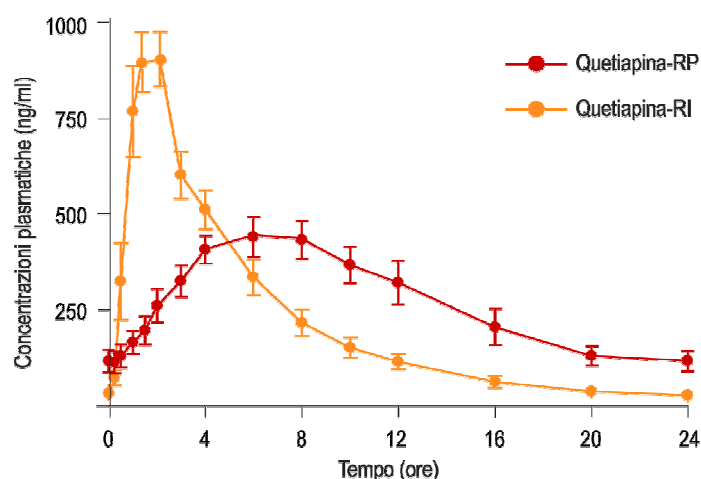
I dati relativi agli studi di farmacocinetica sono stati ottenuti dall'analisi dei campioni prelevati dai pazienti arruolati seguendo delle procedure standard. In particolare, dopo somministrazione orale delle formulazioni a opportuni dosaggi, si è proceduto con un prelievo a intervalli regolari di sangue centrifugato per ottenere il plasma mantenuto a -20 °C. Di seguito si è proceduto con un'estrazione in fase liquida da plasma mediante aggiunta di clozapina come standard interno, alcalinizzazione, aggiunta di acetato di etile, centrifuga e prelievo di aliquote ridotte a secco. Per riprendere i residui è stata aggiunta la fase mobile e, dopo centrifugazione, si è proceduto con l'analisi mediante iniezione del campione ottenuto nel sistema LC/MS/MS.

## 6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 6.3.1 Confronto del profilo plasmatico della quetiapina tra le due formulazioni

Il confronto dei profili plasmatici della quetiapina è stato valutato somministrando in pazienti con disturbi psicotici la stessa dose di principio attivo (300 mg) per le due formulazioni RP e RI. Dall'analisi degli andamenti delle concentrazioni plasmatiche riportati in *Figura 29*, è stato calcolato il tempo di emivita di quetiapina ( $T_{1/2}$ ) che risulta essere approssimativamente di 6-7 ore per entrambe le formulazioni RP e RI.

*Figura 29. Andamento delle concentrazioni plasmatiche dopo singola somministrazione di quetiapina RI 300 mg e quetiapina RP 300 mg. I dati sono riportati come la media  $\pm$  deviazione DS di più esperimenti*

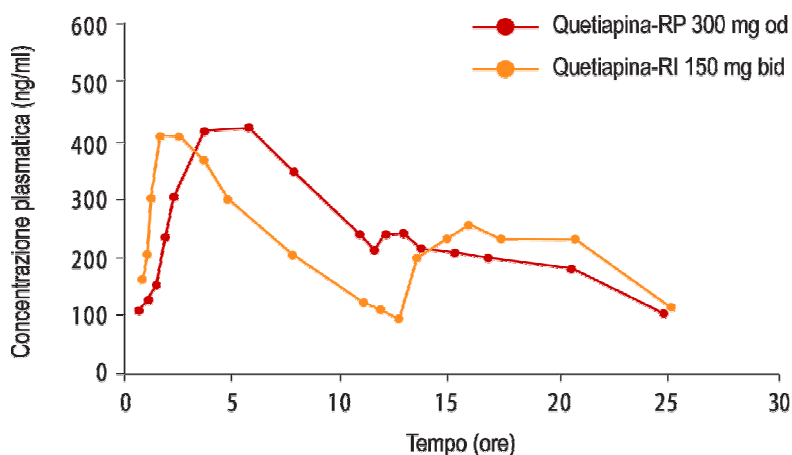


Le differenze farmacocinetiche più significative riguardano il picco di concentrazione plasmatica raggiunto dopo circa 1 ora e 30 minuti e corrispondente a  $944,0 \pm 28,1$  ng/mL con la formulazione RI rispetto al picco rilevato dopo 6 ore e corrispondente a  $470,7 \pm 33,1$  ng/mL per la formulazione RP (*Figura 29*). Dai risultati ottenuti quindi le due formulazioni non sono bioequivalenti in quanto presentano un valore di  $C_{max}$  e  $T_{max}$  differenti, in particolare con la formulazione RP il picco di concentrazione plasmatica di quetiapina viene ridotto e ritardato nel tempo.

La *Figura 30* rappresenta invece lo stato di equilibrio raggiunto in seguito a somministrazione ripetuta delle due formulazioni. Gli andamenti delle concentrazioni plasmatiche ottenuti risultano sovrapponibili in termini di biodisponibilità, come indicato dai valori di AUC: 5882 ng x h/mL per la formulazione RI e 6147 ng x h/mL per la formulazione RP. Allo *steady-state* le due formulazioni presentano quindi la stessa

AUC garantendo, di conseguenza, la stessa esposizione totale/die di quetiapina nei pazienti analizzati nel corso dello studio.

Figura 30. Curve cinetiche allo steady-state dopo somministrazione di quetiapina RP 300 mg in singola dose e quetiapina RI in due dosi di 150 mg a distanza di 12 ore l'una dall'altra. I dati fanno riferimento ad una determinazione rappresentativa



Considerato il profilo di legame recettoriale della quetiapina, l'impatto del rilascio prolungato, consentendo di ridurre le fluttuazioni plasmatiche, si esplica principalmente sulla modalità di legame, meno rapida e più stabile, ai recettori  $H_1$  e  $\alpha_1$  per i quali il principio attivo mostra la maggiore affinità. Il graduale impatto su questi recettori si può tradurre con una riduzione del rischio di ipotensione ortostatica, sedazione e anche tachicardia che tradizionalmente giustificano la lenta titolazione prevista con la formulazione RI, come riportato in studi di confronto tra le due formulazioni eseguiti in pazienti schizofrenici per un periodo di 6 settimane (Pani, 2008). Con la formulazione RP, invece, l'aumento delle dosi risulta più rapido nella fase di titolazione permettendo di somministrare una dose terapeuticamente efficace di 600 mg già dal secondo giorno per arrivare a 800mg in terza giornata (Kahn et al., 2007).

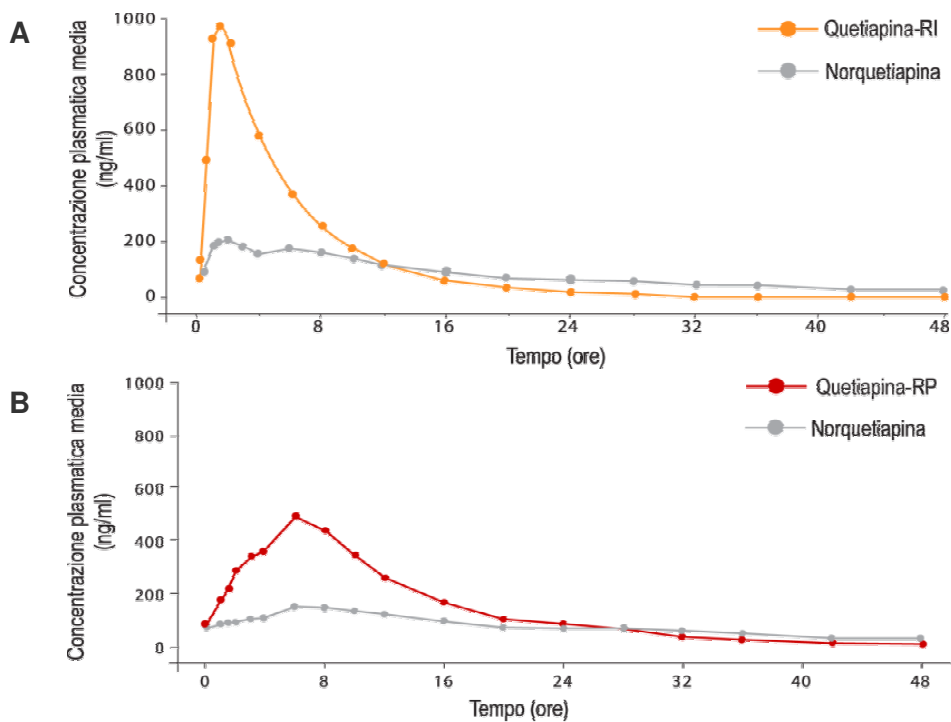
In uno studio di occupazione recettoriale condotto tramite PET è stato visto che con 300 mg di quetiapina somministrata mediante la formulazione RI, al quarto giorno, al momento del picco plasmatico sono occupati il  $37,35 \pm 2,4\%$  dei recettori  $D_2$  mentre con 800 mg di quetiapina somministrata mediante la formulazione RP, già dal terzo giorno di titolazione, al momento del picco sono occupati il  $56,1 \pm 6,7\%$  dei recettori  $D_2$  (Mamo et al., 2008). Con la formulazione RP quindi, mediante una titolazione più rapida, è possibile ottenere un livello di occupazione maggiore e più rapido, rispetto alla formulazione RI, dei recettori  $D_2$ , riconosciuti come il target principale nel trattamento dei sintomi psicotici (Seeman, 2000).

### 6.3.2 Confronto del profilo metabolico della quetiapina tra le due formulazioni

Come visto in precedenza, le due formulazioni di quetiapina presentano un profilo farmacocinetico con differenze significative relative soprattutto al picco di concentrazione plasmatica massima ( $C_{max}$ ), nell'intensità e nel tempo di comparsa ( $T_{max}$ ).

Prendendo in esame i risultati degli studi volti a evidenziare le differenze nella produzione del metabolita norquetiapina, se si considera la  $C_{max}$  della quetiapina e della norquetiapina raggiungibile allo *steady-state* per le due formulazioni RI e RP allo stesso dosaggio di 400 mg, è possibile ottenere una stima della quantità in percentuale della norquetiapina prodotta dal CYP3A4 valutando il rapporto delle  $C_{max}$  tra norquetiapina e quetiapina. Nella *Figura 31* è possibile osservare come la  $C_{max}$  di quetiapina diminuisca significativamente con la somministrazione di quetiapina RP 400 mg rispetto alla formulazione RI allo stesso dosaggio (200 mg x 2) ( $p < 0,001$ ), mentre la  $C_{max}$  di norquetiapina non varia significativamente.

Figura 31. Profili delle concentrazioni plasmatiche medie della quetiapina e della norquetiapina in seguito alla somministrazione di quetiapina RI 200 mg x 2 [A] e quetiapina RP 400 mg [B]



Inoltre, a partire dai dati farmacocinetici riportati nella *Tabella IV*, valutando il rapporto delle  $C_{max}$  tra la norquetiapina e la quetiapina è possibile osservare che con la formulazione RP della quetiapina la quantità percentuale della norquetiapina prodotta corrisponde al 30,69% mentre per la formulazione RI si ottiene una quantità inferiore corrispondente al 19,92%.

*Tabella IV. Confronto tra i valori di  $C_{max}$  della norquetiapina e della quetiapina e dei relativi rapporti in seguito alla somministrazione di quetiapina RI 200 mg x 2 e quetiapina RP 400 mg. I dati sono riportati come la media  $\pm$  DS di più esperimenti*

	$C_{max}$ (ng/mL) $\pm$ DS		Rapporto Norquetiapina/Quetiapina in corrispondenza della $C_{max}$
	QUETIAPINA	NORQUETIAPINA	
Quetiapina RI 400 mg	1270 $\pm$ 673	253 $\pm$ 84	19,92%
Quetiapina RP 400 mg	518 $\pm$ 275	159 $\pm$ 40	30,69%

Tale differenza nella quantità di norquetiapina prodotta per le due formulazioni è stata ulteriormente confermata da uno studio su volontari sani: somministrando 300 mg/die di quetiapina, per entrambe le formulazioni, la quantità percentuale di norquetiapina rilevata, dopo 5 giorni di somministrazione, è stata del 21,92% per la formulazione RI (ottenuto dal rapporto  $C_{max}$  norquetiapina/quetiapina 153,47/689,19 ng/mL) e del 28,21% per la formulazione RP (ottenuto dal rapporto  $C_{max}$  norquetiapina/quetiapina 107,69/381,70 ng/mL) (*Datto et al., 2009*).

Con la formulazione RP, quindi, il rapporto norquetiapina/quetiapina risulta essere più elevato di quello ottenuto con la formulazione RI, a dimostrazione del fatto che una variazione lenta e graduale delle concentrazioni plasmatiche della quetiapina, come quella garantita dalla formulazione RP, si riflette in una maggiore efficienza metabolica del CYP3A4. Le cause di questo fenomeno saranno oggetto di ulteriori studi più approfonditi.

In aggiunta, come di può osservare dalla *Tabella V*, se si considerano i diversi dosaggi disponibili della formulazione RP, si ottiene una quantità percentuale di norquetiapina rispetto alla quantità di quetiapina in corrispondenza della  $C_{max}$  del 53% per la dose di 50 mg RP, che arriva al 33,3 % per il dosaggio di 300 mg RP e si attesta intorno al 31% con la dose di 400 mg RP. Ciò suggerisce che per la formulazione RP ad un incremento della dose, e quindi della concentrazione plasmatica della quetiapina, corrisponda una riduzione dell'efficienza del citocromo in termini di rapporto norquetiapina/quetiapina, anche se bisogna considerare che la quantità disponibile di norquetiapina in termini assoluti aumenta fino al 482% (in quanto la concentrazione

plasmatica della norquetiapina in corrispondenza del  $C_{max}$  passa da 33 ng/mL alla dose di 50 mg a 159 ng/mL alla dose di 400mg corrispondente al + 482% di 33 ng/mL).

Tabella V. Confronto tra i valori relativi e assoluti della norquetiapina in corrispondenza di  $C_{max}$  in seguito alla somministrazione di quetiapina RP alle dosi di 50, 300 e 400 mg. I dati sono riportati come media  $\pm$  DS di piú esperimenti

	$C_{max}$ (ng/mL) $\pm$ DS		Rapporto Norquetiapina/Quetiapina in corrispondenza della $C_{max}$
	QUETIAPINA	NORQUETIAPIN A	
Quetiapina RP 400 mg	518 $\pm$ 275	159 $\pm$ 40	30,69%
Quetiapina RP 300 mg	243 $\pm$ 15	81 $\pm$ 25	33,30%
Quetiapina RP 50 mg	62 $\pm$ 24	33 $\pm$ 26	53,00%

Quindi se da un lato i valori relativi della norquetiapina diminuiscono all'aumentare della dose di quetiapina somministrata, dall'altro l'incremento del dosaggio di quetiapina RP porta comunque ad un aumento in termini assoluti della concentrazione plasmatica della norquetiapina prodotta in corrispondenza della  $C_{max}$  dal CYP3A4. Accanto a queste considerazioni di carattere farmacocinetico, gli studi di efficacia clinica condotti hanno dimostrato che è necessario l'impiego di opportuni dosaggi (300mg) al fine di raggiungere concentrazioni plasmatiche di quetiapina all'interno della finestra terapeutica che determina l'effetto antidepressivo (*Calabrese et al., 2005; Thase et al., 2006; McElroy et al., 2008; Young et al., 2008; Suppes et al., 2010*).

## 6.4 CONCLUSIONI

In base ai risultati degli studi di farmacocinetica, la formulazione RP della quetiapina consente di effettuare una modalità di titolazione più rapida rispetto alla formulazione RI offrendo un potenziale vantaggio nella gestione dei sintomi produttivi caratteristici della schizofrenia e della mania, in particolare nelle fasi acute. Infatti, oltre al vantaggio della monosomministrazione giornaliera, grazie al meccanismo del lento rilascio, con la formulazione RP è possibile somministrare dosi terapeuticamente efficaci di farmaco (fino a 800 mg già dalla terza giornata di titolazione) senza comprometterne notevolmente il profilo di tollerabilità, condizionato dalle fluttuazioni plasmatiche della quetiapina presenti con la formulazione RI. Inoltre, la titolazione rapida possibile con la formulazione RP consente di ottenere in minor tempo un'occupazione maggiore dei recettori  $D_2$ . Considerato il ruolo centrale di questi recettori nello sviluppo dei sintomi

positivi della schizofrenia, si può supporre una maggiore incisività d'azione della formulazione RP nel controllo dei sintomi psicotici nelle fasi acute.

In aggiunta, la formulazione RP sembrerebbe migliorare, rispetto alla formulazione RI, l'efficienza di metabolizzazione della quetiapina da parte del CYP3A4 massimizzando la produzione relativa della norquetiapina, come evidenziato dall'analisi del rapporto norquetiapina/quetiapina in corrispondenza della *C<sub>max</sub>*, che aumenta in modo proporzionale al diminuire della dose e quindi della concentrazione plasmatica della quetiapina. La formulazione RP favorendo quindi una maggiore efficienza del CYP3A4 potrebbe garantire, rispetto alla formulazione RI, un'ottimizzazione dell'efficacia antidepressiva del principio attivo che si esplica attraverso la potente azione inibitoria sul NET (e quindi sul re-up take della noradrenalina) del suo metabolita norquetiapina.

---

## 7. BIBLIOGRAFIA

Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, Gil R, Kegeles LS, Weiss R, Cooper TB, Mann JJ, Van Heertum RL, Gorman JM, Laruelle M. 2000. *Increased baseline occupancy of D<sub>2</sub> receptors by dopamine in schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci USA; 97:8104-9.

Abi-Dargham A. 2004. *Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence*. Int J Neuropsychopharmacol; 7:S1-5.

Ahlskog JE, Muentner MD, McMains PG. 1988. *Controlled-release Sinemet (CR-4): a double-blind crossover study in patients with fluctuating Parkinson's disease*. Mayo Clin Proc; 63: 867-6.

Ammar HO, Ghorab M, El-Nahas SA, Kamel R. 2006. *Design of a transdermal delivery system for aspirin as an antithrombotic drug*. Int J Pharm; 327: 81-88.

Anand Kumar TA, David GF, Sankaranarayanan A, Puri V, Sundram KR. 1982. *Pharmacokinetics of progesterone after its administration to ovariectomized rhesus monkeys by injection, infusion or nasal spraying*. Proc Natl Acad Sci; 79: 4185-9.

Antonini A, Tolosa E, Mizuno Y, Yamamoto M, Poewe WH. 2009. *A reassessment of risk and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease*. Lancet Neurol; 8:929-37.

Bakar SK, Niazi S. 1983. *Stability of aspirin in different media*. J Pharm Sci; 72:1024-6.

Baraldi PG, Cacciari B, Spalluto G, Bergonzoni M, Dionisotti S, Ongini E, Varani K, Borea PA. 1998. *Design, synthesis, and biological evaluation of a second generation of pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine as potent and selective A<sub>2A</sub> adenosine receptor antagonists*. J Med Chem; 41:2126-33.

Bédard PJ, Di Paolo T, Falardeau P, Boucher R. 1986. *Chronic treatment with L-dopa, but not bromocriptine induces dyskinesia in MPTP-parkinsonian monkeys: correlation with [<sup>3</sup>H]spiperone binding*. Brain Res; 379:294-9.

Berger C, Xia F, Schabitz WR, Schwab S, Grau A. 2004. *High-dose aspirin is neuroprotective in a rat focal ischemia model*. Brain Res; 998:237-42.



---

Berman SB, Hastings TG. 1999. *Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease*. J. Neurochem; 73:1127-37.

Berridge KC, Robinson TE. 1998. *What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?* Brain Research; 28:309-69.

Block G, Liss C, Reines S, Irr J, Nibbelink D. 1997. *Comparison of immediate-release and controlled release carbidopa/levodopa in Parkinson's disease: a multicenter 5-year study. The CR First Study Group*. Eur Neurol; 37:23-7.

Boomsma F, Alberts G, van Eijk L J, Man in t Veld A, Schalekamp MA. *Optimal collection and storage conditions for catecholamine measurements in human plasma and urine*. Clin Chem 1993; 39:2503-8.

Bordet R, Ridray S, Carboni S, Diaz J, Sokoloff P. 1997. *Induction of Dopamine D<sub>3</sub> receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa*. Proc Natl Acad Sci USA; 94:3363-7.

Borgman RJ, McPhillips JJ, Stitzel RE, Goodman I J. 1973. *Synthesis and pharmacology of centrally acting dopamine derivatives and analogs in relation to Parkinson's disease*. J Med Chem; 16:630-3.

Bracco F, Battaglia A, Chouza C, Dupont E, Gershanik O, Marti Masso JF, Montastruc JL; PKDS009 Study Group. 2004. *The long-acting dopamine receptor agonist cabergoline in early Parkinson's disease: final results of a 5-year, double-blind, levodopa-controlled study*. CNS Drugs; 18:733-46.

Bravo-Osuna I, Vauthier C, Chacun H, Ponchel G. 2008. *Specific permeability modulation of intestinal paracellular pathway by chitosan-poly(isobutylcyanoacrylate)core-shell nanoparticles*. Eur J Pharm. Biopharm; 69:436-44.

Calabrese JR, Keck PE Jr, Macfadden W, Minkwitz M, Ketter TA, Weisler RH, Cutler AJ, McCoy R, Wilson E, Mullen J. 2005. *A randomized, double-blind, placebo controlled trial of quetiapine in the treatment of bipolar I or II depression*. Am J Psychiatry; 162:1351-60.

Cannazza G, Di Stefano A, Mosciatti B, Braghiroli D, Baraldi M, Pinnen F, Sozio P, Benatti C, Parenti C. 2005. *Detection of L-dopa, dopamine and its metabolites in rat striatum dialysates following peripheral administration of L-Dopa prodrugs by mean HPLC-EC*. J Pharm Biomed Anal; 36:1079-84.

- 
- Carlsson A, Waters N, Waters S, Carlsson ML. 2000. *Network interactions in schizophrenia-therapeutic implications*. Brain Research; 31:342-9.
- Casagrande C, Santangelo F, Saini C, Doggi F, Gerli F, Cerri O. 1986. *Synthesis and chemical properties of ibopamine and of related esters of N-substituted dopamines – synthesis of ibopamine metabolites*. Arzneim Forsch / Drug Res; 36:291-303.
- Castelli F, Sarpietro MG, Rocco F, Ceruti M, Cattel L. 2007. *Interaction of lipophilic gemcitabine prodrugs with biomembrane models studied by Langmuir-Blodgett technique*. J Coll Interf Sci; 313:363-8.
- Castillo J, Leira R, Moro AA, Lizosain I, Serena J, Davalos A. 2003. *Neuroprotective effects of aspirin in patients with acute cerebral infarction*. Neurosci Lett; 339:248-50.
- Cedarbaum JM, Breck L, Kutt H, McDowell FH. 1987. *Controlled release levodopa/carbidopa II. Sinemet CR4 treatment of response fluctuations in Parkinson's disease*. Neurology; 37:1607-12.
- Cedarbaum JM, Hoey M, Kutt H, McDowell FH. 1988. *Controlled-release levodopa/carbidopa III. Sinemet CR5 treatment response fluctuations in Parkinson's disease*. Clin Neuropharmacol; 11:168-73.
- Genci MA. 2007. *Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia*. Trends Neurosci; 30:236-43.
- Charlton ST, Davis SS, Illum L. 2007. *Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: in vitro characterisation studies*. J Contr Rel; 118:225-34.
- Charvin D, Vanhoutte P, Pagès C, Borrelli E, Caboche J. 2005. *Unraveling a role for dopamine in Huntington's disease: the dual role of reactive oxygen species and D<sub>2</sub> receptors stimulation*. Proc Natl Acad Sci USA; 102:12218-23.
- Chemuturi NV, Haraldsson JE, Prisinzano T, Donovan M. 2006. *Role of dopamine transporter (DAT) in dopamine transport across the nasal mucosa*. Life Sci; 79:1391-8.
- Chemuturi M, Donovan MD. 2006. *Metabolism of dopamine by nasal mucosa*. J Pharm Sci; 95:2507-15.
- Chemuturi N, Donovan MD. 2007. *Role of organic cation transporters in dopamine uptake across olfactory and nasal respiratory tissues*. Mol Pharmacol; 4:936-42.
-

- 
- Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK, Zhou QY, Van Tol HH. 1991. *Molecular biology of the dopamine receptors*. Eur J Pharmacol; 207:277-86.
- Claxton AJ, Cramer J, Pierce C. 2001. *A systematic review of the associations between dose regimens and medication compliance*. Clin Ther; 23:1296-10.
- Corona-Morales AA, Castell A, Escobar A, Drucker-Colin R, Zhang L. 2003. *Fullerene C<sub>60</sub> and Ascorbic Acid Protect Cultured Chromaffin cells Against Levodopa Toxicity*. Journal Neurosci Res; 71:121-6.
- Dahlin M, Bergman U, Jansson B, Bjork E, Brittebo E. 2000. *Transfer of dopamine in the olfactory pathway following nasal administration in mice*. Pharm Res; 17:737-42.
- Dahlin M, Jansson B, Bjork E. 2001. *Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats*. Eur J Pharm Sci; 14:75-80.
- Dalpiazz A, Scatturin A, Pavan B, Biondi C, Vandelli MA, Forni F. 2001a. *Poly (D,L-Lactic) acid microspheres for the sustained release of adenosine derivatives with antiischemic properties*. J Contr Rel; 73:303-13.
- Dalpiazz A, Scatturin A, Menegatti E, Bortolotti F, Pavan B, Biondi C, Durini E, Manfredini S. 2001b. *Synthesis and study of 5'-ester prodrugs of N6-cyclopentyladenosine, a selective A<sub>1</sub> receptor agonist*. Pharm Res; 18:531-6.
- Dalpiazz A, Scatturin A, Pavan B, Biondi C, Vandelli MA, Forni F. 2002. *Poly (lactic acid) microspheres for the sustained release of antiischemic agents*. Int J Pharm; 242:115-20.
- Dalpiazz A, Pavan B, Scaglianti M, Vitali F, Bortolotti F, Biondi C, Scatturin A, Tanganelli S, Ferraro L, Prasad P, Manfredini S. 2004. *Transporter-mediated effects of diclofenamic acid and its ascorbyl pro-drug in the in vivo neurotropic activity of ascorbyl nipecotic acid conjugate*. J Pharm Sci; 93:78-85.
- Dalpiazz A, Pavan B, Scaglianti M, Vitali F, Bortolotti F, Biondi C, Scatturin A, Manfredini S. 2005a. *Vitamin C and 6-amino-vitamin C conjugates of diclofenac: synthesis and evaluation*. Int J Pharm; 291:171-81.
- Dalpiazz A, Pavan B, Vertuani S, Vitali F, Scaglianti M, Bortolotti F, Biondi C, Scatturin A, Tanganelli S, Ferraro L, Marzola G, Prasad P, Manfredini S. 2005b. *Ascorbic and 6-Br-ascorbic acid conjugates as a tool to increase the therapeutic effects of potentially central active drugs*. Eur J Pharm; 24:259-69.
-

- 
- Dalpiaz A, Mezzena M, Scatturin A, Scalia S. 2008a. *Solid lipid microparticles for the stability enhancement of the polar drug N6-cyclopentyladenosine*. Int J Pharm; 355:81-6.
- Dalpiaz A, Gavini E, Colombo G, Russo P, Bortolotti F, Ferraro L, Tanganelli S, Scatturin A, Menegatti E, Giunchedi P. 2008b. *Brain uptake of an antiischemic agent by nasal administration of microparticles*. J Pharm Sci (US); 97:4889-4903.
- Dalpiaz A, Pavan B, Strada M, Biondi C, Vertuani S, Ciliberti N, Manfredini S. 2009. *Conjugation of aspirin with vitamin C: uptake and stability studies*. J Drug Del Sci Tech; 19:43-50.
- Dalpiaz A, Cacciari B, Mezzena M, Strada M, Scalia S. 2010. *Solid lipid microparticles for the stability enhancement of a dopamine prodrug*. J Pharm Sci; 99(11):4730-37.
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. 1999. *The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease*. Brain; 122:1437-48.
- Datto C, Berggren L, Patel JB, Eriksson H. 2009. *Self-reported sedation profile of immediate-release quetiapine fumarate compared with extended-release quetiapine fumarate during dose initiation: a randomized, double-blind, crossover study in healthy adult subjects*. Clin Ther; 31: 492-502.
- De Cristobal J, Moro MA, Davalos A, Castillo J, Leza JC, Camarero J, Colado MI, Lorenzo P, Lizasoain I. 2001. *Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats*. J Neurochem; 79:456-9.
- De Cristobal J, Cardena , Lizasoain I, Leza JC, Fernandez Tomé P, Lorenzo P, Moro MA. 2002a. *Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation*. Stroke; 33:261-7.
- De Cristobal J, Madrigal JL, Lizasoain I, Lorenzo P, Leza JC, Moro MA. 2002b. *Aspirin inhibits stress-induced increase in plasma glutamate, brain oxidative damage and ATP fall in rats*. Neuroreport; 13:217-21.
- De La Cruz JP, Guerrero A, Gonzalez-Correa JA, Arrebola MM, Sanchez de la Cuesta F. 2004. *Antioxidant effect of acetylsalicylic and salicylic acid in rat brain slices subjected to hypoxia*. J Neurosci Res; 75:280-90.
- DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. 2003. *The price of innovation: new estimates of drug development costs*. Journal of Health Economics; 22:151-85.
-

- 
- Di Stefano A, Carafa M, Sozio P, Pinnen F, Braghiroli D, Orlando G, Cannazza G, Ricciutelli M, Marianecchi C, Santucci E. 2004. *Evaluation of rat striatal L-Dopa and DA concentration after intraperitoneal administration of L-Dopa prodrugs in liposomal formulations*. J Control Release; 99:293-300.
- Di Stefano A, Sozio P, Iannitelli A, Cerasa LS. 2006. *New drug delivery strategies for improved Parkinson's disease therapy*. J drug Target; 14:652-61.
- Di Stefano A, Sozio P, Iannitelli A, Marianecchi C, Santucci E, Carafa M. 2009. *Maleic- and fumaric-diamides of (O,O-diacetyl)-L-Dopa-methylester as anti-Parkinson prodrugs in liposomal formulation*. Expert Opin Drug Deliv; 6:389-404.
- Doppler W. 1994. *Regulation of gene expression by prolactin*. Rev Physiol Biochem Pharmacol; 124:93-130.
- Dray A, Gonye TJ, Oakley NR, Tanner T. 1976. *Evidence for the existence of a raphe projection to the sostanza nera in rat*. Brain Res; 113:45-57.
- Dupont E, Andersen A, Boas J, Boisen E, Borgmann R, Helgetveit AC, Kjaer MO, Kristensen TN, Mikkelsen B, Pakkenberg H, Presthus J, Stien R, Worm-Petersen J, Buch D. 1996. *Sustained-release Madopar HBS compared with standard Madopar in the long-term treatment of de novo parkinsonian patients*. Acta Neurol Scand; 93:14-20.
- Elbaz A, Tranchant C. 2007. *Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease*. J Neurol Sci; 262:37-44.
- Elbaz A, Moisan F. 2008. *Update in the epidemiology of Parkinson's disease*. Curr Opin Neurol; 21:454-60.
- Ereshefsky L, Mascarenas CA. 2003. *Comparison of the effects of different routes of antipsychotic administration on pharmacokinetics and pharmacodynamics*. J Clin Psychiatry; 64:18-23.
- European Commission, Directorate general III. Luxembourg, 1997. *Pharmaceutical legislation: medicinal products for human and veterinary use: good manufacturing practices*.
- European Commission, Enterprise Directorate-general. Brussels, 2005. *Notice to applicants, Volume 2A, Procedure for marketing authorisation, Chapter 1, Marketing Authorisation*
-

- 
- Fahn S. Parkinson Study Group. 2005. *Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's Disease?* J Neurol; 25:37-42.
- Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, Shea C, Alexoff D, MacGregor RR, Schlyer DJ, Zezulcova I, Wolf Ap. 1996. *Brain monoamine oxidase A inhibition in cigarette smokers.* Proc Natl Acad Sci USA; 93:14065-9.
- Geddes J, Freemantle N, Harrison P, Bebbington P. 2000. *Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia: Systematic overview and meta-regression analysis.* BMJ; 321:1371-6.
- Gerfen CR. 1992. *The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia.* Annu Rev Neurosci; 15:285-320.
- Gilmer JF, Moriarty LM, Lally MN, Clancy JM. 2002. *Isosorbide-based aspirin prodrugs II. Hydrolysis kinetics of isosorbide diaspirinate.* Eur J Pharm Sci; 16:297-304.
- Gilmer JF, Moriarty L, Clancy JM. 2007. *Evaluation of nitrate-substituted pseudocholeline esters of aspirin as potential nitro-aspirins.* Biorg Med Chem Lett; 17:3217-20.
- Goetz CG. 1997. *New strategies with dopaminergic drugs: modified formulation of levodopa and novel agonists.* Exo neurol; 144:17-20.
- Goldstein JM. 2000. *The new generation of antipsychotic drugs: how atypical are they?* Int J Neuropsychopharmacol; 3:339-49.
- Goldman-Rakic PS, Selemon LD. *Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia.* Schizophr Bull 1997; 23:437-58.
- Golembiowska K, Dziubina A, Kowalska M, Kaminska K. 2008. *Paradoxical effects of adenosine receptor ligands on hydroxyl radical generation by L-Dopa in the rat striatum.* Pharmacol Rep; 60:319-30.
- Gray R, Wykes T, Gournay K. 2002. *From compliance to concordance: a review of the literature on interventions to enhance compliance with antipsychotic medication.* J Psychiatr Ment Health Nurs; 9:277-84.
- Greffard S, Verny M, Bonnet AM, Seilhean D, Hauw JJ, Duyckaerts C. 2010. *A stable proportion of Lewy body bearing neurons in the substantia nigra suggests a model in which the Lewy body causes neuronal death.* Neurobiol Aging; 31:99-103.
- Gundert-Remy U, Hildebrandt R, Stiehl A, Weber E, Zürcher G, Da Prada M. 1983. *Intestinal absorption of levodopa in man.* Eur J clin Pharmacol; 25:69-72.
-

---

Halliwell B. 1992. *Reactive oxygen species and the central nervous system*. J Neurochem; 59:1609-23.

Herve D, Pickel VM, Joh TH, Beaudet A. 1987. *Serotonin axon terminals in the ventral tegmental area of the rat. Fine structure and synaptic input to dopaminergic neurons*. Brain Res; 1:71-83.

Hippius H. 1989. *The history of clozapine*. Psychopharmacol (Berl); 99:S3-S5.

Holloway RG, Shoulson I, Fahn S, Kieburtz K, Lang A, Marek K, McDermott M, Seibyl J, Weiner W, Musch B, Kamp C, Welsh M, Shinaman A, Pahwa R, Barclay L, Hubble J, LeWitt P, Miyasaki J, Suchowersky O, Stacy M, Russell DS, Ford B, Hammerstad J, Riley D, Standaert D, Wooten F, Factor S, Jankovic J, Atassi F, Kurlan R, Panisset M, Rajput A, Rodnitzky R, Shults C, Petsinger G, Waters C, Pfeiffer R, Biglan K, Borchert L, Montgomery A, Sutherland L, Weeks C, DeAngelis M, Sime E, Wood S, Pantella C, Harrigan M, Fussell B, Dillon S, Alexander-Brown B, Rainey P, Tennis M, Rost-Ruffner E, Brown D, Evans S, Berry D, Hall J, Shirley T, Dobson J, Fontaine D, Pfeiffer B, Brocht A, Bennett S, Daigneault S, Hodgeman K, O'Connell C, Ross T, Richard K, Watts A; Parkinson Study Group. 2004. *Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A 4-year randomized controlled trial*. Arch Neurol; 61:1044-1053.

Horstink M, Tolosa E, Bonuccelli U, Deuschl G, Friedman A, Kanovsky P, Larsen JP, Lees A, Oertel W, Poewe W, Rascol O, Sampaio C; European Federation of Neurological Societies; Movement Disorder Society-European Section. 2006. *Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease*. Eur J Neurol; 13:1170-85.

Hudzik TJ, Zeller Z, Zhou J, Brockel B, Sutton E, Maciag CM, Grimm SW, Davis PC, Widzowski D. 2008. *Further characterization of norquetiapine and quetiapine in rodent models of antidepressant and anxiolytic action: importance of route of administration*. 21st European College of Neuropsychopharmacology Congress, 30 agosto-3 settembre, Barcellona, Spagna.

Hull M, Lieb K, Fiebich BL. 2000. *Antiinflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease?* Expert Opin Invest Drugs; 9:671-83.

Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VM, Clark CM, Glosser G, Stern MB, Gollomp SM, Arnold SE. 2000. *Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease*. Neurology; 54:1916-21.

---

Immordino ML, Brusa P, Rocco F, Arpicco S, Ceruti M, Cattel L. 2004. *Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs*. J Contr Rel; 100:331-46.

Illum I. 2000. *Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system*. Eur J Pharm Sci; 11:1-18.

Jackson DM, Westlind-Danielsson A. 1994. *Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects*. Pharmacol Ther; 64:291-370.

Jankovic JJ. 2002. *Therapeutic strategies in Parkinson's disease*. In: Jankovic JJ, Tolosa E, Editors. *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, pp 116-151.

Jankovic J. 2008. *Are adenosine antagonists, such as istradefylline, caffeine, and chocolate, useful in the treatment of Parkinson's disease?* Ann Neurol; 63:267-69.

Jaspart S, Piel G, Delattre L, Evrard B. 2005. *Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterization, drug release and applications*. Expert Opin Drug Deliv; 2:75-87.

Jensen NH, Rodriguiz RM, Caron MG, Wetsel WC, Rothman RB, Roth BL. 2008. *N-desalkylquetiapine, a potent norepinephrine reuptake inhibitor and partial 5-HT<sub>1A</sub> agonist, as putative mediator of quetiapine's antidepressant activity*. Neuropsychopharmacology; 33:2303-12.

Joseph R, Han E, Tsering C, Grunfield S, Welch KM. 1992. *Platelet activity and stroke severity*. J Neurol Sci; 108:1-6.

Kahn RS, Schulz SC, Palazov VD, Reyes EB, Brecher M, Svensson O, Andersson HM, Meulien D; Study 132 Investigators. *Efficacy and tolerability of once-daily extended release quetiapine fumarate in acute schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study*. J Clin Psychiatry 2007; 68:832-42.

Kao HD, Traboulsi A, Itoh S, Dittert L, Hussain A. 2000. *Enhancement of the systemic and CNS specific delivery of L-dopa by the nasal administration of its water soluble prodrugs*. Pharm Res; 17:978-84.

Kim SJ, Kim YK, Takagi G, Huang CH, Geng YJ, Vatner SF. 2002. *Enhanced iNOS function in myocytes one day after brief ischemic episode*. Am J Physiol Heart Circ Physiol; 282:423-8.



- 
- Koller WC, Hutton JT, Tolosa E, Capilldeo R. 1999. *Immediate-release and controlled-release carbidopa/levodopa in PD: a 5-year randomized multicenter study*. Neurology; 53:1012-19.
- Kontos HA. 2001. *Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture*. Stroke; 32:2712-16.
- Koob GF, Bloom FE. 1988. *Cellular and molecular mechanisms of drug dependence*. Science; 242:715-23.
- Koob GF. 1992. *Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways*. Trends Pharmacol Sci; 13:177-84.
- Koob GF, Le Moal M. 1997. *Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation*. Science; 278:52-8.
- Kuhn W, Müller T, Büttner T, Gerlach M. 1995. *Aspirin as free radical scavenger: consequences for therapy of cerebrovascular ischemia*. Stroke; 26:1959-60.
- Kurata JH, Abbey DE. 1990. *The effect of chronic aspirin use on duodenal and gastric ulcer hospitalisation*. J Clin Gastroenterol; 12:260-6.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dick CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingando C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB. 1996. *Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects*. Proc Natl Acad Sci USA; 93:9235-40.
- Laruelle M, Abi-Dargham A. 1999. *Dopamine as the wind of psychotic fire: new evidence from brain imaging studies*. Journal Psychopharmacol; 13:358-71.
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T. 2009. *Parkinson's disease*. Lancet 13; 373:2055-66.
- Leher CM, Bouwstra JA, Schacht EH, Junginger H. 1992. *In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers*. Int J Pharm; 78:43-8.
- Le Moal M, Simon H. 1991. *Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles*. Physiol Rev; 71:155-234.
- Lindermayer JP. 2010. *Long-acting injectable antipsychotics: focus on olanzapine pamoate*. Neuropsychiatr Dis Treat; 6:261-7.
-

---

Lindström LH, Gefvert O, Hagberg G, Lundberg T, Bergström M, Hartvig P, Långström B. 1999. *Increased dopamine synthesis rate in medial prefrontal cortex and striatum in schizophrenia indicated by L-(beta-11C) DOPA and PET*. *Biol Psychiatry*; 46(5):681-8.

Lodge DJ, Grace AA. 2010. *Developmental pathology, dopamine, stress and schizophrenia*. *Int J Dev Neurosci*; doi:10.1016/j.ijdevneu.2010.08.002.

Madopar HBS®. *Riassunto delle caratteristiche del prodotto*.

Maharaj DS, Saravanan KS, Maharaj H, Mohanakumar KP, Daya S. 2004. *Acetaminophen and aspirin inhibit superoxide anion generation and lipid peroxidation, and protect against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats*. *Neurochem Int*; 44:335-60.

Mamo DC, Uchida H, Vitcu I, Barsoum P, Gendrom A, Goldstein J, Kapur S. 2008. *Quetiapine extended-release versus immediate release formulation: a positron emission tomography study*. *J Clin Psychiatry*; 69:81-6.

Manfredini S, Pavan B, Vertuani S, Scaglianti M, Compagnone D, Biondi C, Scatturin A, Tanganelli S, Ferraro L, Prasad P, Dalpiaz A. 2002. *Design, synthesis and activity of ascorbic acid prodrugs of nipecotic, kynurenic and diclophenamic acids, liable to increase neurotropic activity*. *J Med Chem*; 45:559–62.

Manfredini S, Vertuani S, Pavan B, Vitali F, Scaglianti M, Bortolotti F, Biondi C, Scatturin A, Prasad P, Dalpiaz A. 2004. *Design, synthesis and in vitro evaluation on HRPE cells of ascorbic and 6-bromoascorbic acid conjugates with neuroactive molecules*. *Biorg Med Chem*; 12:5453-63.

Marsden CD. 1994. *Parkinson's disease*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 57:672-81.

Masson P, Froment MT, Fortier PL, Visicchio JE, Bartels CF, Lockridge O. 1998. *Butyrylcholinesterase-catalysed hydrolysis of aspirin, a negatively charged ester, and aspirin-related neutral esters*. *Biochim Biophys Acta*; 1387:41-52.

McElroy SL, Weisler RH, Chang W, Olausson B, Paulsson B, Brecher M, Agambaram V, Merideth C, Nordenhem A, Young AH; EMBOLDEN II (Trial D1447C00134) Investigators. 2010. *A double-blind, placebo-controlled study with acute and continuation phase of quetiapine in adults with bipolar depression (EMBOLDEN II)*. *J Clin Psychiatry*; 71(2):163-74.

McLaughlin BA, Nelson D, Erecińska M, Chesselet MF. 1998. *Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by a mitochondrial inhibitor*. *J Neurochem*; 70:2406-15.

---

Miyasaki JM, Martin W, Suchowersky O, Weiner WJ, Lang AE. 2002. *Practice parameter: initiation of treatment for Parkinson's disease: an evidence-based review. Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.* Neurology; 58:11-7.

Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M, O'Dowd BF. 1994. *Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D<sub>1</sub> receptor.* Eur J Pharmacol; 267:7-19.

Nielsen NM, Bundgaard H. 1989. *Evaluation of glycolamide esters and various other esters of aspirin as true aspirin prodrugs.* J Med Chem; 32:727-34.

Nutt JG, Wooten GF. 2005. Clinical practice. *Diagnosis and initial management of Parkinson's disease.* N Engl J Med; 353:1021-7.

O'Banion MK, Finch CE. 1996. *Inflammatory mechanism and anti-inflammatory therapy in Alzheimer disease.* Neurobiol Aging; 17:669-71.

Oertel WH, Wolters E, Sampaio C, Gimenez-Roldan S, Bergamasco B, Dujardin M, Grosset DG, Arnold G, Leenders KL, Hundemer HP, Lledó A, Wood A, Frewer P, Schwarz J. 2005. *Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study.* Mov Disord; 21:343-53.

Olanow CW, Koller WC. 1998. *An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease.* Neurology; 50(3):S1-S57.

Olanow CW, Tatton WG. 1999. *Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease.* Annual Review Neuroscience; 22:123-44.

Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y, Albanese A, Bonuccelli U, Damier P, De Yebenes J, Gershanik O, Guttman M, Grandas F, Hallett M, Hornykiewicz O, Jenner P, Katzenschlager R, Langston WJ, LeWitt P, Melamed E, Mena MA, Michel PP, Mytilineou C, Obeso JA, Poewe W, Quinn N, Raisman-Vozari R, Rajput AH, Rascol O, Sampaio C, Stocchi F. 2004. *Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: Current controversies.* Mov Disord; 19:997.

Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F. 2006. *Drug insight: continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease.* Nat Clin Pract Neurol; 2:382-92.

Ongini E, Fredholm BB. Pharmacology of adenosine A<sub>2A</sub> receptors. Trends in Pharmacological Sciences 1996; 17:364-372.

- 
- Osterberg L, Blaschke T. 2005. *Adherence to medication*. N Engl J Med; 353:487-97.
- Pandey M, Borah A, Varghese M, Barman PK, Mohanakumar KP, Usha R. 2009. *Striatal dopamine level contributes to hydroxyl radical generation and subsequent neurodegeneration in the striatum in 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease in rats*. Neurochem Int; 55:431-37.
- Pani L, Pira L, Marchese G. 2007. *Antipsychotic efficacy: relationship to optimal D<sub>2</sub> receptor occupancy*. Eur psychiatry; 22:267-75.
- Pani L. 2008. *Quetiapina a rilascio prolungato (RP): profilo farmacologico e vantaggi terapeutici*. Therapy Perspectives, Wolters Kluwer Health; 5.
- Pani L. 2009a. *La Rivoluzione di Paul Janssen - Cinquant'anni di Terapia della Schizofrenia: dall'aloiperidolo al paliperidone*. Elsevier, Milano.
- Pani L. 2009b. *The need for individualised antipsychotic drug therapy in patients with schizophrenia*. Eur Rev Med Pharmacol Sci; 13:1-7.
- Pani L, Strada M. 2009a. *Quetiapina a rilascio prolungato (RP): profilo farmacologico e vantaggi terapeutici - Nuova edizione*. Therapy Perspectives, Wolters Kluwer Health; 15.
- Pani L, Strada M. 2009b. *Quetiapina a rilascio prolungato (RP): meccanismo d'azione e razionale terapeutico nella depressione bipolare*. Therapy Perspectives, Wolters Kluwer Health; 19.
- Pardo B, Mena MA, Casajeros MJ, Paino CL, De Tebenes JG. 1993. *Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants*. Brain Res; 682:133-43.
- Parkinson Study Group. 2000. *Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A randomised controlled trial*. JAMA; 284:1931-38.
- Pavan B, Dalpiaz A, Ciliberti N, Biondi C, Manfredini S, Vertuani S. 2008. *Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach*. Molecules; 13:1035-65.
- Pearce RK, Banerji T, Jenner P, Marsden CD. 1998. *De novo administration of ropinirole and bromocriptine induces less dyskinesia than L-dopa in the MPTP treated marmoset*. Mov Disord; 13:234-41.
-

---

Picetti R, Saiardi A, Abdel Samad T, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E. 1997. *Dopamine D<sub>2</sub> receptors in signal transduction and behavior*. Crit Rev Neurobiol; 11:121-42.

Pillay S, Pillay V, Choonara YE, Naidoo D, Khan RA, du Toit LC, Ndesendo VMK, Modi G, Danckwerts MP, Iyuke SE. 2009. *Design, biometric simulation and optimization of a nano-enabled scaffold device for enhanced delivery of dopamine to the brain*. Int J of Pharm; 382:277-90.

Pira L, Strada M, Dalpiaz A, Pani L. 2010. *Ruolo del citocromo P450 nell'effetto antidepressivo della quetiapina*. Therapy Perspectives, Wolters Kluwer Health; 13.

Pisani A, Bonsi P, Centonze D, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P. 2003. *Targeting striatal cholinergic interneurons in Parkinson's disease: Focus on metabotropic glutamate receptors*. Neuropharmacology; 45:45-56.

Poewe W, Antonini A, Zijlmans JCM, Burkhard PR, Vingerhoets F. 2010. *Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong*. Clin Interv Aging; 5:229-38.

Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE. 2000. *A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group*. N Engl J Med; 342:1484-91.

Rinne UK, Bracco F, Chouza C, Dupont E, Gershanik O, Marti Masso JF, Montastruc JL, Marsden CD. 1998. *Early treatment of Parkinson's disease with cabergoline delays the onset of motor complications. Results of a double-blind levodopa controlled trial. The PKDS009 Study Group*. Drugs; 55:23-30.

Risperdal Iniettabile®. *Riassunto delle caratteristiche del prodotto*.

Roth BL. 2007. *Drugs and valvular heart disease*. N Engl J Med; 356:6-9.

Rumley AG. 1988. *The in vitro stability of catecholamines in whole blood*. Ann Clin Biochem; 25:585-6.

Sakane T, Akizuki M, Yoshida M, Yamashita S, Nadai T, Hashida M, Sezaki H. 1991a. *Transport of cephalixin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity*. J Pharm Pharmacol; 43:449-51.

Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Nadai T, Hashida M, Sezaki H. 1991b. *The transport of drugs to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity: the relation to the lipophilicity of the drug*. Chem Pharm Bull; 39:2456-8.

---

Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Sampaio P, Neufeld R, Ferriera D. 2007. *Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery*. Pharm Res; 24:2198-206.

Scalia S, Tursilli R, Sala N, Iannuccelli V. 2006. *Encapsulation in lipospheres of the complex between butyl methoxydibenzoylmethane and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin*. Int J Pharm; 320:79-85.

Seeman P, Kapur S. 2000. *Schizophrenia: more dopamine, more D<sub>2</sub> receptors*. Proc Natl Acad Sci USA; 97:7673-5.

Seeman P. 2008. *All Psychotic Roads Lead to Increased Dopamine D<sub>2</sub> High receptors: A Perspective*. Clinical Schizophrenia & Related Psychoses; January, pp 351-3.

Seeman P. 2010. *Dopamine D<sub>2</sub> Receptors as treatment Targets in Schizophrenia*. Clinical Schizophrenia & Related Psychoses; April, pp 56-73.

Seroquel<sup>®</sup> compresse a rilascio prolungato. *Riassunto delle caratteristiche del prodotto*.

Seroquel<sup>®</sup> compresse rivestite con film. *Riassunto delle caratteristiche del prodotto*.

Sinemet CR<sup>®</sup>. *Riassunto delle caratteristiche del prodotto*.

Sourkes TL. 1999. *"Rational hope" in the early treatment of Parkinson's disease*. Can J Physiol Pharmacol; 77:375-82.

Spina E, Cavallaro R. 2007. *The pharmacology and safety of paliperidone extended release in the treatment of schizophrenia*. Expert Opinion Drug Saf; 6:651-62.

Spina MB, Cohen G. 1989. *Exposure of striatal synaptosomes to L-Dopa increases levels of oxidized glutathione*. J Pharmacol Exp Ther; 247:502-7.

Stahl SM. 2000. *La Psicofarmacologia degli antipsicotici*. London: Martin Dunitz, pp 15-22

Standaert DG, Young AB. 1995. *Treatment of central nervous system degenerative disorders*. In Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th edn, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW and Goodman Gilman A (Eds), McGraw-Hill, New York, pp. 503-19.

Stocchi F, Vacca L, Ruggieri S, Olanow W. 2005. *Intermittent vs continuous levodopa administration in patients with advanced Parkinson disease: a clinical and pharmacokinetic study*. Arch Neurol; 62:905-10.

- 
- Strange P. 2001. *Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects*. Pharmacol Rev; 53:119-33.
- Suppes T, Datto C, Minkwitz M, Nordenhem A, Walker C, Darko D. 2010. *Effectiveness of the new extended release formulation of quetiapine as monotherapy for the treatment of acute bipolar depression*. J Affect Disord; 121:106-15.
- Sweeney, PJ. 1995. *Parkinson's disease: Managing symptoms and preserving function*. Geriatrics; 50:24-31.
- Tang S, Martinez LJ, Sharma A, Chai M. 2006. *Synthesis and characterization of water-soluble and photostable L-Dopa dendrimers*. Org Lett; 8:4421-4.
- Tanner CM, Aston DA. 2000. *Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes*. Curr Opin Neurol; 13:427-30.
- Thacker EL, Chen H, Patel AV, McCullough ML, Calle EE, Thun MJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. 2008. *Recreational physical activity and risk of Parkinson's disease*. Mov Disord; 23:69-74.
- Thase ME, Macfadden W, Weisler RH, Chang W, Paulsson B, Khan A, Calabrese JR; BOLDER II Study Group. 2006. *Efficacy of quetiapine monotherapy in bipolar I and II depression. A double-blind, placebo-controlled study (the BOLDER II study)*. J Clin Psychopharmacol; 26:600-9.
- The Lancet. 2010. *Where will new drugs come from?* www.thelancet.com; Vol 377 January 8, p 97.
- The Parkinson Study Group. 1993. *Effect of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease*. N Engl J Med; 328:176-83.
- Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH 2nd. 2004. *Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration*. Neuroscience; 127:481-96.
- US Congressional Budget Office. 2006. *Research and Development in the Pharmaceutical Industry*. US Government Printing Office, Washington, DC, October.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. 2000. *Structure and function of dopamine receptors*. Neurosci Biobehav Rev; 24(1):125-32.
-

---

Van der Kooy D, Hattori D. 1980. *Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: A fluorescent retrograde double labeling study in the rat*. Brain Res; 186:1-7.

Velasquez C, Rao PN, Knaus EE. 2005. *Novel nonsteroidal anti-inflammatory drugs possessing a nitric oxide donor diazen-1-ium-1,2-diolate moiety: design, synthesis, biological evaluation, and nitric oxide release studies*. J Med Chem; 48:4061-7.

Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. 2007. *The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates*. Neuropathology; 27:494–506.

Wehrlé P. 2007. *Statistical process control and optimization strategy to improve the quality of pharmaceutical dosage forms and pharmaceutical process*. Doctorate School in Pharmaceutical Sciences Meeting, Ferrara.

Weir TB, Smith CCT, Round JM, Betteridge DJ. *Stability of catecholamines in whole blood, plasma and platelets*. Clin Chem 1986; 32:882-3.

Whitehaed SN, Bayona NA, Cheng G, Allen GV, Hachinski VC, Cecchetto DF. 2007. *Effects of triflusal and aspirin in a rat model of cerebral ischemia*. Stroke; 38:381-7.

Whitehouse MW, Rainsford KD. 1980. *Esterification of acidic anti-inflammatory drugs suppresses their gastrotoxicity without adversely affecting their anti-inflammatory activity in rats*. J Pharm Pharmacol; 32:795-6.

[www.farmaindustria.it/pubblico/201002.pdf](http://www.farmaindustria.it/pubblico/201002.pdf)

Young AH, McElroy SL, Bauer M, Philips N, Chang W, Olausson B, Paulsson B, Brecher M; EMBOLDEN I (Trial 001) Investigators. 2010. *A double-blind, placebo-controlled study with acute and continuation phase of quetiapine in adults with bipolar depression (EMBOLDEN I)*. J Clin Psychiatry; 71:150-62.



## **8. PUBBLICAZIONI RELATIVE AL TRIENNIO DI DOTTORATO**

### **8.1 PUBBLICAZIONI SU RIVISTE NAZIONALI ED INTERNAZIONALI**

Dalpiazz A, Pavan B, **Strada M**, Biondi C, Vertuani S, Ciliberti N, Manfredini S. 2009. *Conjugation of aspirin with vitamin C: uptake and stability studies*. J Drug Del Sci Tech; 19:43-50.

Pani L, **Strada M**. 2009. *Quetiapina a rilascio prolungato (RP): profilo farmacologico e vantaggi terapeutici-Nuova Edizione*. Therapy Perspectives; 15.

Pani L, **Strada M**. 2009. *Quetiapina a rilascio prolungato (RP): meccanismo d'azione e razionale terapeutico nella depressione bipolare*. Therapy Perspectives; 19.

Dalpiazz A, Cacciari B, Mezzena M, **Strada M**, Scalia S. 2010. *Solid lipid microparticles for the stability enhancement of a dopamine prodrug*. J Pharm Sci; 99:4730-7.

Pira L, **Strada M**, Dalpiazz A, Pani L. 2010. *Ruolo del citocromo P450 nell'effetto antidepressivo della quetiapina*. Therapy Perspectives; 13.

### **8.2 COMUNICAZIONI A CONGRESSI E SCUOLE**

**Strada M**, Dalpiazz A. *Studi di incapsulamento della dopamina e di un suo profarmaco in microparticelle solide di origine lipidica*. VIII Scuola Avanzata per Dottorandi di Ricerca del settore Farmaceutico Tecnologico Applicativo. Università della Calabria, Arcavacata di Rende, 22-27 settembre 2008.

Dalpiazz A, Cacciari B, Mezzena M, **Strada M**, Scalia S. *Solid lipid microparticles for the stability enhancement of a dopamine prodrug*. XXI Simposio ADRITELF, Cagliari, 10-13 Settembre 2009.

**Strada M**, Dalpiazz A. *Solid lipid microparticles for the stability enhancement of a dopamine prodrug*. European School of Medical Chemistry – XXX Advanced Course of Medical Chemistry and “E. Duranti” National Seminar for PhD Students. Urbino, 4-9 Luglio 2010.