

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Terzo Progetto di ricerca.
Proprietà chimico-fisiche dei medicinali
e loro sicurezza d'uso**

A cura del Responsabile Scientifico
Elena Ciranni

Laboratorio di Chimica del Farmaco

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

02/42

Istituto Superiore di Sanità

Terzo Progetto di Ricerca. Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso.

A cura del Responsabile Scientifico Elena Ciranni

2002, iii, 102 p. Rapporti ISTISAN 02/42

Il presente rapporto contiene i risultati dei lavori svolti nella terza fase di attuazione del Progetto, nonché i relativi dati conclusivi. Come si evince dalle singole relazioni, l'obiettivo di acquisire conoscenze al fine di migliorare la sicurezza d'uso, collegata con la qualità, di alcuni medicinali attualmente in commercio, è da ritenersi raggiunto. Nuove conoscenze connesse con la chiralità, la fototossicità e le proprietà di stato solido di alcuni principi attivi possono migliorare la sicurezza d'uso di alcune classi di farmaci attualmente in commercio. In questa ottica il progetto ha affrontato specifici problemi nelle tematiche sopramenzionate; sono anche state individuate nuove aree di ricerca derivanti dalle esigenze del Piano Sanitario Nazionale e connesse con l'uso di radiazioni ionizzanti nei processi produttivi di farmaci sterili, e con l'influenza delle caratteristiche di pazienti anziani su parametri farmacocinetici.

Parole chiave: Chiralità, Fototossicità, Farmacocinetica, Proprietà di stato solido

Istituto Superiore di Sanità

Third Research Project. Chemical-physical properties of drugs and their safety.

Edited by the Scientific Co-ordinator Elena Ciranni

2002, iii, 102 p. Rapporti ISTISAN 02/42 (in Italian)

In this report the results of the researches performed in the third phase of the Project and the conclusive data are described. As it appears from the single papers, according to our purpose, useful information for improving the safety of some commercial drugs has been obtained. New researches on chirality, phototoxicity and solid state properties might improve the safety of some common registered drugs; specific problems on such issues were studied through the financial support of this project. In conformity with the Italian National Health Plan, the project focused on the use of gamma radiation for drug sterilization procedures and on the pharmacokinetics behaviour of major drugs in aged people.

Key words: Chirality, Phototoxicity, Solid state properties, Pharmacokinetics

Si ringrazia Andrea Di Giuseppe per la collaborazione tecnica prestata per la realizzazione di questo rapporto.

Per informazioni su questo documento scrivere a: elena.ciranni@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

INDICE

Presentazione	iii
---------------------	-----

SOTTOPROGETTO 1

Aspetti chimico-fisici e profili analitici connessi alla qualità di farmaci per uso umano e veterinario

Linea di ricerca A.1

FARMACI CHIRALI

Separazione e analisi delle proprietà farmacologiche delle diidropiridine chirali: valutazione comparativa degli isomeri ottici della amlodipina e della lercanidipina

Paolo De Caprariis, Giampiero Boatto, Maria Nieddu, Mauro Cataldi, Daniela Melisi, Salvatore Amoroso 5

Sviluppo di metodiche biocromatografiche per la separazione e la valutazione delle interazioni di farmaci chirali a livello di sieroproteine

Francesco Barbato, Patrizia Morrica, Agnese Miro, Fabiana Quaglia, Maria Immacolata La Rotonda 11

Monitoraggio biologico del sotalolo con cromatografia liquida enantioselettiva accoppiata alla spettrometria di massa

Ilaria D'Acquarica, Francesco Gasparri, Silvana Lalli, Domenico Misiti, Claudio Villani..... 14

Racemato o enantiomero puro: una strategia d'indagine per un più adeguato impiego in terapia dei farmaci chirali

Maria Giovanna Quaglia, Anna Farina, Maura Palmery, Elena Bossù, Viviana Cotichini..... 22

Linea di ricerca A.2

FOTOSTABILITÀ E FOTOREATTIVITÀ

Reattività fotoindotta di farmaci e sua relazione con la fotostabilità di preparati farmaceutici e con effetti fotosensibilizzanti

Elisa Fasani, Mariella Mella, Andrea Ricci, Sandra Monti, Angelo Albini..... 27

Studio delle proprietà fotochimiche e fototossiche di farmaci

Vanni Cavrini, Vincenza Andrisano, Carlo Bertucci, Roberto Gotti, Jessica Fiori, Romeo Pomponio, Roberto Ballardini, Patrizia Hrelia 33

Meccanismi molecolari di fotosensibilizzazione indotta da farmaci in sistemi biologici e design di sistemi fotoprotettivi

Giuseppe Condorelli, Lucia Laura Costanzo, Guido De Guidi, Salvatore Giuffrida, Sandra Monti, Salvatore Sortino 37

Farmaci fototossici: studio delle proprietà fototossiche e del meccanismo d'azione

Francesco Dall'Acqua, Daniela Vedaldi, Sergio Caffieri, Giorgia Miolo, Giampietro Viola, Laura Levorato 47

Studi di parametri molecolari e cellulari che regolano l'azione fototossica di fluorochinoloni

Orazio Saporà, Antonella Maggi, Gina La Sala, Chiara Proietti Pannunzi, Ewa Krasnowska, Tiziana Parasassi..... 56

Linea di ricerca A.3

PROCESSI DI STERILIZZAZIONE E LORO INFLUENZE SULLE PROPRIETÀ DEL PRINCIPIO ATTIVO

Processi di sterilizzazione e loro influenza sulle proprietà del principio attivo

Luisa Montanari, Francesco Cilizurzo, Luisa Valvo, Paola Bertocchi, Antonio Faucitano, Armando Buttafava, Ida Genta, Bice Conti 67

SOTTOPROGETTO 2

Farmaci e loro metabolici in campioni biologici

Linea di ricerca B.1

FATTORI DI VARIABILITÀ IN FARMACOCINETICA

Monitoraggio terapeutico della netilmicina nel neonato pretermine

Vincenzo Basile, Gennaro Vetrano, Antonio Gentile, Stefano Zappelli, Lucio D'Aiello, Giuseppe Palmiero, Fulvio Veneri, Domenico Capone 81

Variabilità della farmacocinetica degli enantiomeri di fluoxetina e norfluoxetina: ruolo di fattori genetici e correlazioni con la risposta clinica

Emilio Perucca, Giuliana Gatti, Giovanna Jannuzzi, Cinzia Fattore, Piergiorgio Zuccaro, Roberta Pacifici, Maria Gabriella Scordo, Edoardo Spina 86

Fattori di variabilità farmacocinetica nell'anziano: previsione dell'andamento cinetico di molecole chirali e possibili rapporti fra variabilità cinetica e diversa risposta farmacodinamica

Cesare Sirtori, Franco Pazzucconi..... 94

PRESENTAZIONE

Con la conclusione della terza fase, termina il Progetto di ricerca “Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d’uso” iniziato nel 1995 e finanziato, per un totale di 2,9 miliardi di lire, con i fondi di cui dal DL.vo. 502/1992, art.12.

Tra le diverse proposte pervenute a seguito del bando nazionale pubblicato sul *Notiziario dell’Istituto Superiore di Sanità* (Vol. 13, n. 2 - Suppl., febbraio 2000) il Comitato Scientifico del Progetto stesso ha ritenuto opportuno, al fine di permettere una adeguata conclusione delle ricerche intraprese, di procedere al finanziamento della maggior parte delle Unità Operative (n. 12) impegnate in precedenza nel Progetto stesso.

I risultati dei lavori svolti nella terza fase di attuazione del Progetto, nonché i relativi dati conclusivi sono stati oggetto del terzo e conclusivo *Convegno Nazionale delle Unità Operative*, tenutosi a Roma presso l’Istituto Superiore di Sanità il 27 maggio 2002, e costituiscono l’oggetto del presente *Rapporto ISTISAN*.

Come si evince dalle singole relazioni, l’obiettivo di acquisire conoscenze al fine di migliorare la sicurezza d’uso, collegata con la qualità, di alcuni medicinali attualmente in commercio, è da ritenersi raggiunto.

Nel corso degli studi sono inoltre emersi elementi di particolare rilievo che suggeriscono l’opportunità di continuare l’approfondimento di alcuni aspetti delle problematiche trattate.

Il Responsabile Scientifico
Elena Ciranni

SOTTOPROGETTO 1
Aspetti chimico-fisici e profili analitici
connessi alla qualità di farmaci
per uso umano e veterinario

LINEA DI RICERCA A.1
Farmaci chirali

SEPARAZIONE E ANALISI DELLE PROPRIETÀ FARMACOLOGICHE DELLE DIIDROPIRIDINE CHIRALI: VALUTAZIONE COMPARATIVA DEGLI ISOMERI OTTICI DELLA AMLODIPINA E DELLA LERCANIDIPINA

Paolo De Caprariis (a), Giampiero Boatto (b), Maria Nieddu (b), Mauro Cataldi (c), Daniela Melisi (c), Salvatore Amoroso (c)

(a) Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Fisciano, Salerno

(b) Dipartimento Farmaco Chimico Tossicologico, Università di Sassari, Sassari

(c) Dipartimento di Neuroscienze, Università Federico II di Napoli, Napoli

Sintesi dell'attività svolta e dei principali risultati

La sostituzione asimmetrica dei carboni in posizione 3 e 5 dell'anello eterociclico delle diidropiridine ha l'importante effetto di dare origine ad un centro chirale. Per tale ragione un gran numero di diidropiridine esiste tanto nella forma enantiomerica R quanto in quella speculare S. Fin dall'osservazione di Towart *et al.* nel 1981 (1) è apparso evidente che le due forme enantiomeriche delle diverse diidropiridine chirali presentano marcate differenze nella loro potenza quali calcioantagonisti. La gran parte degli studi in merito è stata effettuata utilizzando approcci sperimentali piuttosto grossolani quali l'impiego di anelli aortici precontratti, mentre solo pochi studi sono stati effettuati con un approccio più appropriato per lo studio dell'attività dei canali del calcio voltaggio-dipendenti (*Voltage-Dependent Calcium Channels*, VDCC) quali il *patch clamp*. Nell'ambito del di una delle due prime fasi di tale progetto di ricerca in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) abbiamo potuto analizzare in dettaglio le capacità calcioantagoniste dei singoli stereoisomeri di tre differenti diidropiridine chirali, la manidipina, la nitrendipina e la nimodipina. Oltre a confermare che, come descritto in letteratura, gli stereoisomeri tali diidropiridine differiscono nella loro potenza, abbiamo potuto mettere in luce differenze importanti nella cinetica del blocco dei VDCC da essi determinati (2). Una successiva pubblicazione di Handrock *et al.* nel 1999 (3) ha fornito ulteriori evidenze a sostegno dell'idea che la differenza essenziale tra gli stereoisomeri delle diidropiridine possa essere essenzialmente dovuta ad aspetti cinetici. Nel presente studio abbiamo proceduto alla separazione e all'analisi farmacologica di un nuovo gruppo di diidropiridine.

Metodi

Separazione degli isomeri ottici

La separazione analitica degli antipodi ottici delle diidropiridine è stata effettuata con un'apparecchiatura HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, cromatografia liquida ad elevate prestazioni) assemblata, costituita da: 1) Minipump mod.392 (LDC Analytical); 2) rivelatore UV mod.UV-106 (Linear Instrument); 3) registratore mod. RD 1101 (Barnstead/Thermolyne); 4) iniettore manuale Rheodyne con un loop di 20 µl. Il flusso è stato regolato a 0,8 ml/min. E la lettura è stata effettuata a 254 nm. Si sono utilizzate diverse condizioni separative a seconda delle diidropiridine da separare:

a) *Separazione degli enantiomeri delle diidropiridine a struttura neutra (isradipina, nimodipina, felodipina e nisoldipina)*

La colonna analitica utilizzata per la separazione è una Chiral AGP (100 x 4,0 mm 5 µm *particle size*, Chromtech UK), impaccata con un'unica fase stazionaria di gel di silice a cui è legata, mediante legame chimico, la α1 glicoproteina acida. La miscela eluente utilizzata per la separazione degli enantiomeri delle quattro diidropiridine è costituita da tampone fosfato 0,01 M (pH 6,7) e isopropanolo (75/25).

Le soluzioni standard (1 mg/ml) delle quattro diidropiridine sono state fatte in isopropanolo per HPLC. Per la separazione chirale, in colonna vengono iniettate concentrazioni di 0,05 mg/ml, secondo le istruzioni riportate nel manuale. Tali soluzioni di lavoro vengono preparate a partire dalle soluzioni standard mediante diluizione con tampone fosfato 0,01 M (pH 6,7) (Figura 1).

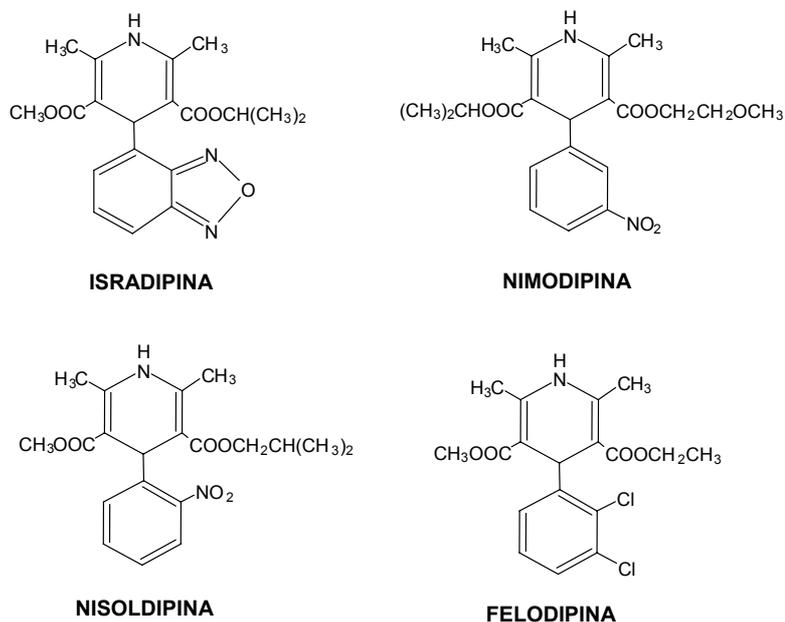


Figura 1. Separazione degli enantiomeri delle diidropiridine a struttura neutra, isradipina, nimodipina, felodipina e nisoldipina

I tempi di ritenzione delle quattro coppie di enantiomeri sono risultati :

– isradipina	3,9 min	7,0 min
– nimodipina	4,3 min	5,3 min
– nisoldipina	6,5 min	12,0 min
– felodipina	11,3 min	13,5 min

b) *Separazione degli enantiomeri di due diidropiridine a struttura basica (lercanidipina e amlodipina)*

La colonna analitica utilizzata per la separazione è una Astec Chirobiotic V (250 x 4,6 mm 5 µm *particle size*; Alltech Italia), impaccata con un'unica fase stazionaria di gel di silice a cui è legato, mediante legame chimico, un macrolide glicopeptidico, la

vancomicina, legata al gel di silice attraverso degli *spacer* di opportuna lunghezza che conferiscono al legame una solida stabilità (Figura 2).

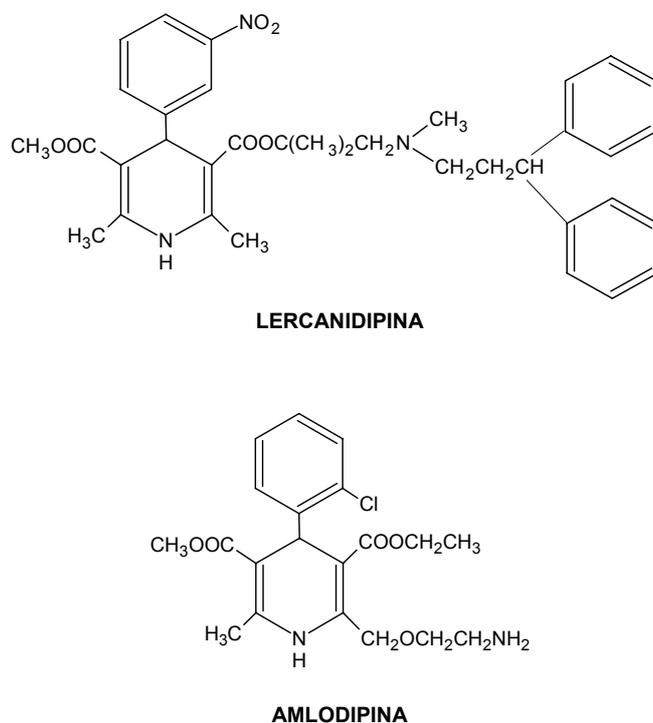


Figura 2. Separazione degli enantiomeri delle diidropiridine a struttura basica

La colonna Chirobiotic V consente l'utilizzo di una nuova fase polare organica in cui si utilizza il metanolo esclusivamente come carrier, mentre la separazione chirale dipende dalla concentrazione e dal rapporto della coppia acido-base (acido acetico/trietilamina). Le soluzioni standard delle due diidropiridine sono state preparate in metanolo per HPLC. Le composizioni delle miscele eluenti utilizzate per la separazione dei due enantiomeri della lercanidipina e della amlodipina sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Composizione volumetrica della miscela eluente utilizzata per la separazione dei due enantiomeri della lercanidipina e della amlodipina

Eluente – Campioni	Metanolo	Acido acetico	Trietilamina
Lercanidipina	100	0,1	0,01
Amlodipina	100	0,5	0,1

I tempi di ritenzione dei due enantiomeri sono risultati:

- lercanidipina 10 min 11 min
- amlodipina 18 min 19 min

Elettrofisiologia

L'attività dei canali del calcio di tipo L è stata valutata impiegando la tecnica del *patch clamp* nella sua configurazione *whole cell* e, quale modello cellulare le cellule GH3 che hanno il pregio di esprimere alte densità di canali L con una minima o nulla componente di tipo T. Per gli esperimenti di *patch clamp*, le cellule sono state pilastrate su *coverslip* in vetro e, dopo 24-48 ore, i *coverslip* sono stati trasferiti in una camera di perfusione a flusso laminare, del volume approssimato di 500 μ l (Warner Comp., USA), montata sullo stage di un microscopio invertito Axiovert 25 (Zeiss).

È stato utilizzato un sistema di perfusione multilinea a caduta dotato di una valvola a più posizioni. La soluzione presente nella cameretta veniva continuamente rimossa con l'impiego di una pompa operata elettricamente. Si sono utilizzati elettrodi di borosilicato con una resistenza compresa tra 3 e 5 M Ω , riempiti con una soluzione interna contenente: 110 mM CsCl, 30 mM TEA-Cl, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 8 mM Glucosio, 15 mM CreatinFosfato, 5 mM ATP. La soluzione extracellulare conteneva: 125 mM N-MetilGlucammina, 10 mM BaCl₂, 10 mM Hepes, 1 mM MgCl₂; l'osmolarità era aggiustata a 300 mOsm previa aggiunta di sucorsio. Le registrazioni sono state effettuate con l'impiego di un amplificatore per *patch clamp* Axopatch 200B. Il potenziale di membrana è stato clampato a -80 mV e i canali L sono stati attivati applicando rampe di potenziale da -80 mV a +40 mV della durata di 75 ms.

Si è proceduto alla correzione online per la capacitanza e le resistenze in serie e il *leak* è stato corretto utilizzando un protocollo P/4. La scelta della rampe di voltaggio è stata giustificata dal fatto che tali protocolli di stimolazione permettono di analizzare la risposta dei canali L ad un ampio spettro di potenziali di membrana minimizzando il problema del *run-down* delle correnti. L'intervallo di stimolazione è stato di 15 secondi.

Risultati

La perfusione delle cellule GH3 con concentrazioni crescenti di lercanidipina ha determinato una inibizione concentrazione-dipendente dell'attività dei canali L. Le concentrazioni necessarie per ottenere una riduzione del 50% dell'ampiezza delle correnti fluenti attraverso i canali del calcio di tipo L sono risultate diverse per i due enantiomeri di tale antagonista. Infatti, una riduzione di tale entità è evocata da concentrazioni pari ad 1 nM nel caso dell'enantiomero S (-), mentre sono risultate necessarie concentrazioni di 100 nM dell'enantiomero R(+).

La cinetica del blocco dell'attività dei canali del calcio di tipo L è risultata essere molto diversa per i due enantiomeri della lercanidipina. Infatti, mentre l'attività calcioantagonista dello stereoisomero S si manifestava quasi istantaneamente, nel caso dell'enantiomero R compariva con molta gradualità (Figura 3).

Le caratteristiche del nostro sistema di perfusione non ci permettono di quantificare accuratamente queste differenze che pure sono risultate estremamente accentuate. Abbiamo anche valutato la reversibilità del blocco dei canali di tipo L da parte della lercanidipina. In nessun caso però, il blocco è risultato reversibile giacché è risultato pressoché impossibile evidenziare un recupero dell'ampiezza delle correnti a seguito del *wash-out* del calcioantagonista.

Gli esperimenti condotti utilizzando la amlodipina hanno confermato l'esistenza di marcate differenze nell'attività degli enantiomeri R ed S ma la quantificazione di tali differenze ha fornito valori leggermente diversi da quelli riportati in letteratura.

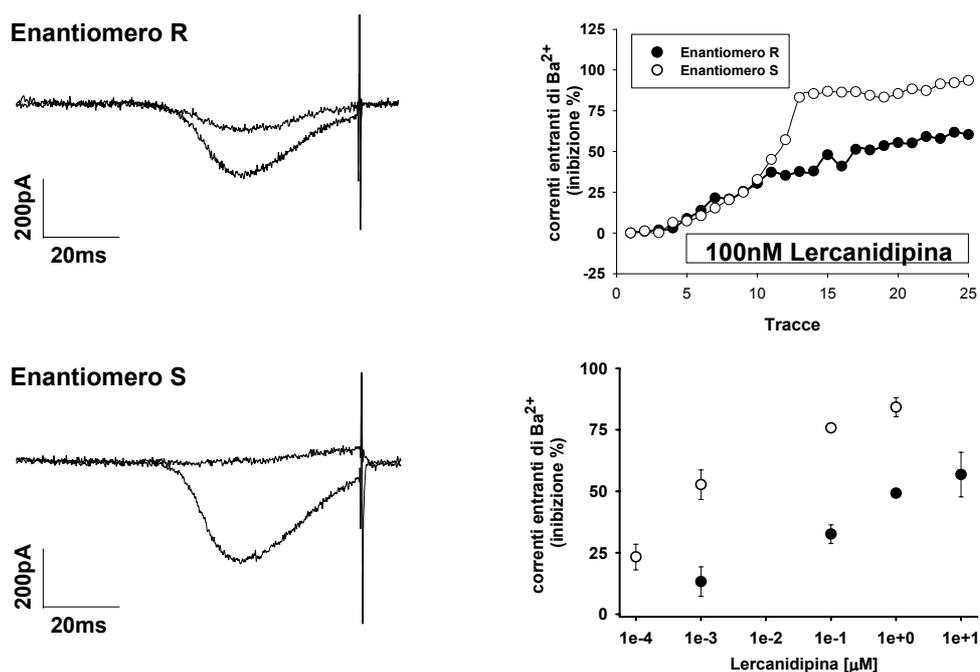


Figura 3. Esperimenti condotti utilizzando la lercanidipina: esistenza di marcate differenze nell'attività degli enantiomeri R ed S

Discussione

Il presente studio estende a nuove diidropiridine i nostri sforzi precedenti miranti alla messa a punto di metodiche di HPLC che accoppiassero ad una ottima risoluzione degli isomeri ottici una resa adeguata all'ottenimento di quantità adeguate per l'effettuazione di studi farmacologici. Per quanto riguarda la valutazione farmacologica dell'attività degli stereoisomeri di due di queste diidropiridine, la lercanidipina e l'amlodipina, i risultati ottenuti confermano ampiamente quanto già descritto in letteratura (4, 5). Infatti, nel caso della Lercanidipina, abbiamo ritrovato una differenza di circa 100 volte nella potenza dei due stereoisomeri di questo calcioantagonista. È sicuramente interessante sottolineare che abbiamo potuto anche dimostrare che gli enantiomeri della lercanidipina presentano una differente cinetica del blocco delle correnti L. Lo stereoisomero S determina un blocco rapido e marcato mentre lo stereoisomero R esplica la sua attività di blocco delle correnti in maniera molto più graduale. Ovviamente, il nostro sistema sperimentale non ci permette di fare alcuna valutazione strettamente quantitativa delle differenze di tali cinetiche di blocco (che richiederebbe l'effettuazione di esperimenti con sistemi di microperfusione rapida). È comunque opportuno segnalare che queste nostre osservazioni sembrano ulteriormente confermare che le diidropiridine idrofobiche a lunga catena laterale possano esercitare la loro attività calcioantagonista con per lo meno due diverse modalità: un blocco rapido che è forse da attribuirsi ad un *open channel block* come suggerito da Lacinova e Hofmann nel 1998 (6) per la isradipina R, un calcioantagonista che non abbiamo

esaminato nella presente serie di esperimenti, e un blocco lento che, con ogni probabilità, richiede la ripartizione del calcioantagonista nella fase lipidica della membrana. Il blocco del canale aperto potrebbe presupporre l'ingresso della diidropiridina nella regione del poro del canale e spiegare, date le ovvie limitazioni conformazionali che questo comporta, la rigida dipendenza dalla conformazione della molecola che si osserva per tale modalità di inibizione dell'attività del canale L. Per contro, la probabile ripartizione nella fase lipidica della membrana, che potrebbe spiegare la cinetica lenta di blocco, è una possibile chiave di lettura per la persistenza del blocco esercitato dalle diidropiridine esaminate nel presente studio per le quali è stato impossibile osservare una reversione del blocco a seguito del *wash-out*.

Bibliografia

1. Towart R, Wehinger E, Meyer H. Effects of unsymmetrical ester substituted 1,4-dihydropyridine derivatives and their optical isomers on contraction of smooth muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1981;317(2):183-5.
2. Cataldi M, Tagliatela M, Palagiano F, Secondo A, de Caprariis P, Amoroso S, di Renzo G, Annunziato L. Effects of manidipine and nitrendipine enantiomers on the plateau phase of K⁺-induced intracellular Ca²⁺ increase in GH3 cells. *Eur J Pharmacol* 1999;376(1-2):169-78.
3. Handrock R, Rao-Schymanski R, Klugbauer N, Hofmann F, Herzig S. Dihydropyridine enantiomers block recombinant L-type Ca²⁺ channels by two different mechanisms. *J Physiol* 1999;521 Pt 1:31-42.
4. Arrowsmith JE, Campbell SF, Cross PE, Stubbs JK, Burges RA, Gardiner DG, Blackburn KJ. Long-acting dihydropyridine calcium antagonists. 1. 2-Alkoxyethyl derivatives incorporating basic substituents. *J Med Chem* 1986;29(9):1696-702.
5. Guarneri L, Angelico P, Ibba M, Poggesi E, Taddei C, Leonardi A, Testa R. Pharmacological *in vitro* studies of the new 1,4-dihydropyridine calcium antagonist lercanidipine. *Arzneimittelforschung*. 1996;46(1):15-24.
6. Lacinova L, Hofmann F. Isradipine interacts with the open state of the L-type calcium channel at high concentrations. *Receptors Channels* 1998;6(3):153-64.

Nell'ambito del progetto "Separazione e analisi delle proprietà farmacologiche delle diidropiridine chirali: valutazione comparativa degli isomeri ottici della amlodipina e della lercanidipina" è stato anche realizzato il seguente lavoro.

Sviluppo di metodiche biocromatografiche per la separazione e la valutazione delle interazioni di farmaci chirali a livello di sieroproteine

Francesco Barbato, Patrizia Morrica, Agnese Miro, Fabiana Quaglia, Maria Immacolata La Rotonda
Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Napoli, Napoli

Lo scopo di questa ricerca è consistito nella individuazione e caratterizzazione, mediante l'applicazione di metodi biocromatografici (1), dei siti di interazione specifici enantioselettivi della sieralbumina umana (HSA) e della alfa glicoproteina acida (AGP) in grado di interagire con farmaci antipertensivi quali i bloccanti i canali del calcio a struttura 4-fenildiidropiridinica ed i β -bloccanti .

È ben noto che tali due sieroproteine svolgono un importante ruolo nel legame con i farmaci modulandone la percentuale di quota libera, la sola farmacologicamente attiva e, di norma, disponibile per i processi di escrezione. È altresì ormai accertato che il legame dei farmaci a livello di tali sieroproteine non deriva unicamente da meccanismi ripartitivi aspecifici ma risente anche della possibilità di legami a livello di siti specifici che possono essere enantioselettivi. Tale ultima modalità di legame può rivestire un ruolo importante nel determinare interferenze farmacocinetiche fra più principi attivi o fra diversi enantiomeri di uno stesso farmaco. I farmaci antipertensivi in esame rivestono particolare interesse nell'ambito di questa problematica in quanto sono molecole chirali ma somministrate sotto forma di miscela racemica. Il loro diffuso utilizzo in terapie croniche rende particolarmente attuale la possibilità che eventuali interferenze possano realmente realizzarsi durante il loro normale impiego clinico.

Sono state impiegate le seguenti colonne per HPLC:

- *Sieroalbumina umana*
Hypersil-HSA; 4,6 x 50 mm, 7 μ (Thermo Hypersyl Ltd, Runcorn – UK) (utilizzata da sola o utilizzando due di tali colonne in tandem) oppure HSA 4,5 x 150 mm (Shandon, Runcorn, UK);
- *Alfa glicoproteina acida*
Chiral AGP 100; 4,0 x 100 mm (Chromtech AB, Hägersten, Sweden).

In una prima fase di questo lavoro si sono prese in considerazione otto molecole a struttura 4-fenildiidropiridinica ad attività bloccante i canali del calcio (nifedipina, nitrendipina, nimodipina, isradipina, nisoldipina, felodipina, amlodipina, nicardipina). Su fase HSA è stato possibile osservare una separazione degli enantiomeri della sola isradipina mentre per gli altri congeneri, qualunque fosse la condizione sperimentale realizzata, si è rilevato solo uno sdoppiamento del picco cromatografico. Tale risultato, se da un lato testimonia la presenza di siti enantioselettivi in grado di legarsi alle diidropiridine, indica dall'altro che il ruolo giocato da tali siti è solo marginale nel determinare il fenomeno globale di interazione. L'ordine di eluizione è risultato dipendere dalla lipofilia delle molecole, espressa come coefficiente di ripartizione fra *n*-ottanolo ed acqua, $\log P_{oct}$, come mostrato dalla seguente equazione per i sei congeneri neutri (escluse, quindi, amlodipina e nicardipina):

$$\log k'_{\text{HSA}} = 0,427 (\pm 0,076) \log P_{\text{Oct}} - 0,891 (\pm 0,391)$$

$$n = 6 \qquad r = 0,942 \qquad s = 0,090$$

L'inserimento in tale correlazione dei congeneri basici, considerando però per la nicardipina il valore di lipofilia corretto per la ionizzazione, $\log D_{7,4}$, produce un miglioramento degli indici di correlazione ($n = 8$; $r = 0,945$; $s = 0,045$).

Sulla fase AGP è stato possibile separare gli enantiomeri di tutti i congeneri neutri, con la ovvia eccezione della nifedipina, che è achirale, utilizzando un eluente costituito da *i*-propanolo/tampone fosfato 0,01 M pH 7,0 10:90 (v/v). Il fattore di risoluzione è sempre risultato superiore al 50% con isradipina e nisoldipina risolte alla linea di base. Inoltre sono state condotte analisi con dimetilottilammina (DMOA) in concentrazione variabile nell'eluente in quanto tale composto è noto per la sua capacità di legarsi ai siti enantioselettivi dell'AGP (2).

I risultati sono riassunti nella seguente Tabella 1.

Tabella 1. Enantioselettività della colonna AGP per le diidropiridine neutre in funzione delle diverse concentrazioni di DMOA nell'eluente. (valori di α ; $\alpha = k'R/ k'S$)

[DMOA] mM	0	1,00	2,00	3,00	4,00
Nitrendipina	1,34	1,25	1,20	1,10	1,00
Nimodipina	1,32	1,22	1,15	1,00	1,00
Isradipina	2,34	1,69	1,52	1,34	1,10
Felodipina	1,32	1,31	1,18	1,00	1,00
Nisoldipina	2,30	1,37	1,19	1,00	1,00

Tale tecnica, detta "dello spiazzante", ha inoltre consentito di dimostrare la presenza sulla AGP di due famiglie di siti specifici di interazione, di cui solo una con capacità enantioselettive e legante più fortemente gli enantiomeri *R*-. Entrambi i siti possono comunque risentire della presenza di sostanze interferenti, indebolendosi il legame sul sito enantioselettivo e rafforzandosi debolmente il legame sul sito non-enantioselettivo.

Inoltre si sono prese in considerazione 12 molecole ad attività betabloccante (sotalolo, atenololo, nadololo, oxprenololo, acebutololo, pindololo, timololo, metoprololo, labetalolo, betaxololo, alprenololo, propranololo).

Sulla fase HSA si è potuto osservare, dopo aver individuato le condizioni sperimentali opportune, lo sdoppiamento dei picchi cromatografici dei diversi beta bloccanti in esame dimostrando così l'esistenza su tale sieroproteina di siti enantioselettivi leganti tali farmaci. Mantenendo il pH dell'eluente a pH 7,0 (prossimo cioè al valore fisiologico di 7,4 del sangue), utilizzando come modificatori organici *n*-propanolo o metanolo ed utilizza

ndo diverse forze ioniche dell'eluente si sono ottenuti valori di ritenzione su tale fase proteica che inducono a ritenere che la capacità interattiva dei betabloccanti con la sieralbumina umana dipenda essenzialmente dalla lipofilia mostrata dalle molecole al pH sperimentale ($\log D_{7,0}$) piuttosto che dalla lipofilia delle forme neutre ($\log P$). La concomitante realizzazione di legami a livello di siti specifici ed enantioselettivi sembrerebbe rivestire un ruolo solo secondario nel legame con tale proteina. Le analisi biocromatografiche su colonne AGP hanno anche esse richiesto una lunga fase di esplorazione per la valutazione dell'influenza sulle caratteristiche ritenitive, e quindi interattive, derivanti dall'impiego di diverse condizioni sperimentali. Fra l'altro con eluenti a pH 7,0 sono stati adoperati diversi modificatori organici, quali metanolo, isopropanolo ed acetonitrile. Per tutti i composti considerati è stato possibile osservare una netta separazione degli enantiomeri dimostrando l'importanza del ruolo giocato dai siti specifici enantioselettivi nell'interazione globale di tale sieroproteina con i betabloccanti.

Purtroppo la separazione chirale, generalmente molto netta e ben definita, è stata osservata in condizioni sperimentali differenti per i singoli congeneri della classe non consentendo la formulazione di una scala di interazione unica su tali siti per tutti i congeneri. In considerazione della rilevante partecipazione dei siti specifici dell'AGP all'interazione globale dei betabloccanti con tale sieroproteina, è legittimo attendersi una competizione diretta fra betabloccanti ed altre molecole farmacologicamente attive di possibile cosomministrazione nella corrente pratica clinica (ad es. calcio antagonisti, antiinfiammatori non steroidei).

Bibliografia

1. Domenici E, Bertucci C, Salvadori P, Motellier S, Wainer IW. Immobilized serum albumin: rapid HPLC probe of stereoselective protein-binding interactions. *Chirality* 1990;2(4):263-8.
2. Hermansson J, Eriksson M. Direct liquid chromatographic resolution of acidic drugs using a chiral α 1-acid glycoprotein column. *J Liq Chromatogr* 1986;(9):621.

MONITORAGGIO BIOLOGICO DEL SOTALOLO MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA ENANTIOSELETTIVA ACCOPPIATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA

Ilaria D'Acquarica, Francesco Gasparri, Silvana Lalli, Domenico Misiti, Claudio Villani
*Dipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia delle Sostanze Biologicamente Attive,
Università degli Studi "La Sapienza" di Roma, Roma*

Sintesi dell'attività svolta e principali risultati

L'attività svolta nell'ambito del Terzo Progetto Nazionale di Ricerca dal titolo "Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso" ha riguardato essenzialmente la messa a punto di strategie cromatografiche stereoselettive finalizzate allo studio del comportamento farmacocinetico del sotalolo (STL) (Figura 1), un farmaco chirale antagonista dei recettori β -adrenergici, utilizzato in terapia come racemato nel trattamento dell'ipertensione e dell'aritmia ventricolare.

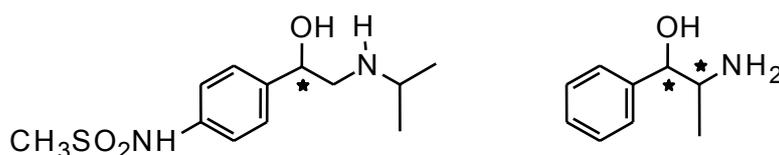


Figura 1. Strutture chimiche del sotalolo (STL) (a sinistra) e della nor-efedrina (N-EPH) (a destra)

Nell'ambito del Secondo Progetto Nazionale (1), la risoluzione ottica del sotalolo era stata da noi ottenuta mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) seguendo l'approccio cosiddetto "indiretto", che prevede cioè la formazione di diastereoisomeri stabili mediante derivatizzazione con sostanze chirali ad elevatissimo eccesso enantiomerico, e la successiva separazione dei diastereoisomeri formati su fasi stazionarie achirali. Nonostante gli ottimi risultati ottenuti in termini di diastereoselettività (a) e di chemioselettività nei confronti della molecola in questione, il metodo basato sull'approccio "indiretto" si è dimostrato lungo e laborioso, pur consentendo l'uso di rivelatori convenzionali (UltraViolet, UV; Photo-Diode-Array, PDA). L'approccio cosiddetto "diretto", che pure era stato esplorato con successo, aveva evidenziato una bassa chemioselettività, parametro di fondamentale importanza nel caso di matrici biologiche complesse. Si era reso pertanto indispensabile l'accoppiamento di rivelatori estremamente selettivi alla metodica in questione, al momento non disponibili.

Nell'ambito del Terzo Progetto, potendo disporre presso i nostri laboratori di uno spettrometro di massa (Mass Spectrometer, MS), è stato preso nuovamente in considerazione e applicato con successo il metodo cromatografico basato sull'approccio "diretto", che prevede

cioè la formazione di diastereoisomeri “transienti” ottenuti mediante interazione dinamica reversibile con il mezzo, e la successiva separazione su fasi stazionarie chirali (FSC).

Messa a punto di una metodica cromatografica stereoselettiva accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC/MS) per la risoluzione diretta del sotalolo

Nel corso degli studi effettuati durante il Secondo Progetto Nazionale, era stata da noi individuata, come migliore metodica di risoluzione diretta degli enantiomeri del sotalolo, quella basata sull'uso di fasi stazionarie chirali contenenti teicoplanina (TE), appositamente sviluppate presso i nostri laboratori (2). La TE (Figura 2) è un antibiotico macrociclico glicopeptidico, prodotto naturalmente da alcuni ceppi di *Actinoplanes teichomyeticus* (3,4), recentemente utilizzato con successo in qualità di selettore chirale per risolvere gli enantiomeri di una grande varietà di molecole chirali, mediante HPLC, cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*, TLC) ed elettroforesi capillare ad elevate prestazioni (*High-Performance Capillary Electrophoresis*, HPCE). Il suo successo, come pure quello degli altri antibiotici della stessa famiglia (vancomicina, ristocetina) va attribuito alla varietà delle sue strutture, alla notevole molteplicità di centri stereogenici presenti e alla diversità dei gruppi funzionali (5, 6).

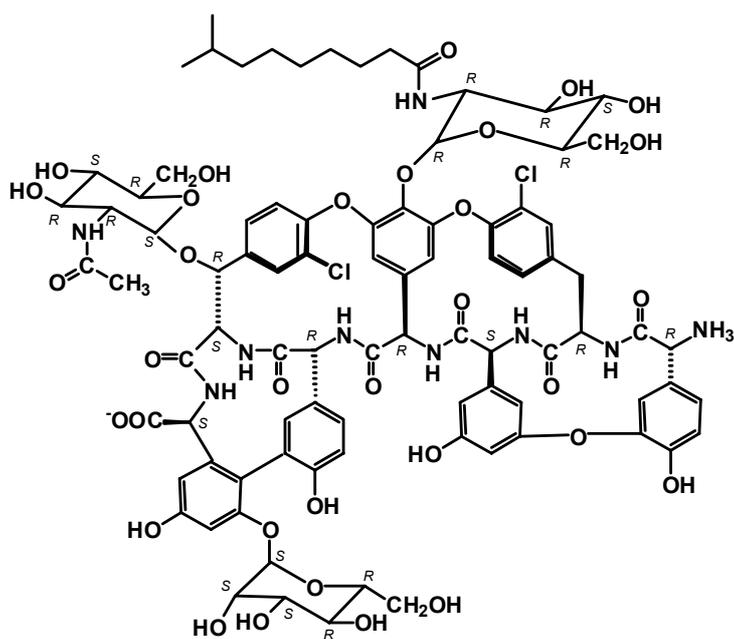


Figura 2. Struttura chimica della teicoplanina (TE)

La strategia d'immobilizzazione dell'antibiotico sulle particelle di silice da noi messa a punto (2) ha previsto l'attivazione in due passaggi della superficie silicea mediante l'uso di un

isocianato alifatico bifunzionale, e la formazione di due legami ureidici stabili nella struttura finale della fase (Figura 3).

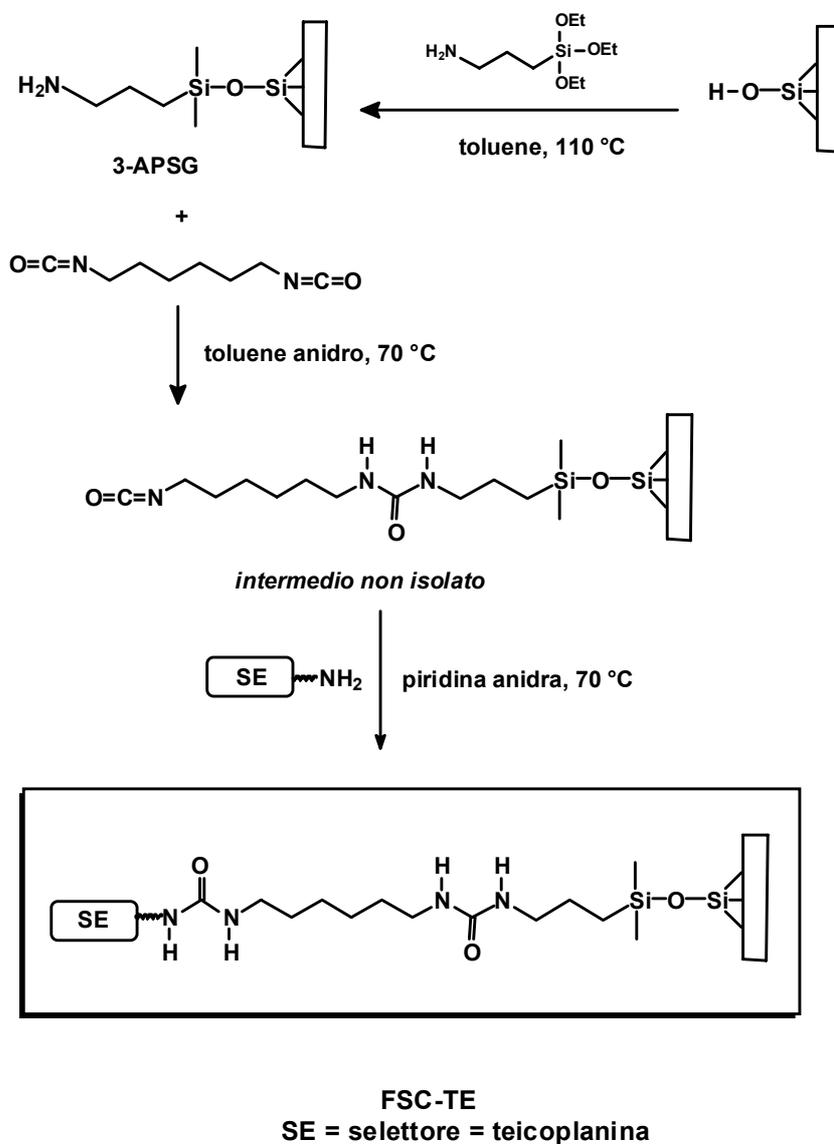


Figura 3. Strategia sintetica di ancoraggio della teicoplanina (TE) alla matrice silicea

Tale chimica di *binding* ha portato alla sintesi di una fase (Fused Silice Capillaries-Teicoplanine, FSC-TE) molto stabile chimicamente e sufficientemente passivata, con una densità superficiale di glicopeptide legato pari a 0,36 mmoli/m². Il supporto siliceo che ha consentito di ottenere i migliori risultati è stato il LiChrospher® Si 100, 5 µm (area superficiale 400 m²/g), contenente particelle di natura perfettamente sferica. La MS ha assunto in questi ultimi anni un ruolo di fondamentale importanza nel dosaggio di molecole di diversa origine (7): si presta, infatti, all'analisi di composti presenti in tracce, attraverso il monitoraggio dei

singoli ioni specifici (Selected Ion Recording, SIR), e rende inequivocabile l'identificazione dei diversi principi attivi, grazie all'acquisizione in corrente ionica totale (TIC).

La risoluzione diretta degli enantiomeri del sotalolo è stata dunque da noi ottenuta sulla fase a base di teicoplanina (FSC-TE) mediante HPLC organico-polare, utilizzando, come sistema di rivelazione, l'interfaccia MS, basata sulla tecnica della ionizzazione per elettronebulizzazione (*ElectroSpray Ionization*, ESI), in modalità ioni positivi (ESI+).

Come standard interno per le determinazioni quantitative è stata scelta la molecola della L-nor-efedrina (N-EPH) (vedi Figura 1), a struttura simile a quella dell'analita.

Prima dell'analisi cromatografica, sono stati ottenuti i singoli spettri di massa dell'analita e dello standard interno, attraverso l'iniezione diretta degli stessi nello spettrometro (Figura 4).

Per quanto riguarda il sotalolo (Figura 4A), lo ione molecolare protonato ($[M + H]^+$) è stato identificato a 273 m/z , con un'intensità relativa inferiore al 40 %, mentre il frammento principale è stato attribuito allo ione molecolare disidratato (255 m/z).

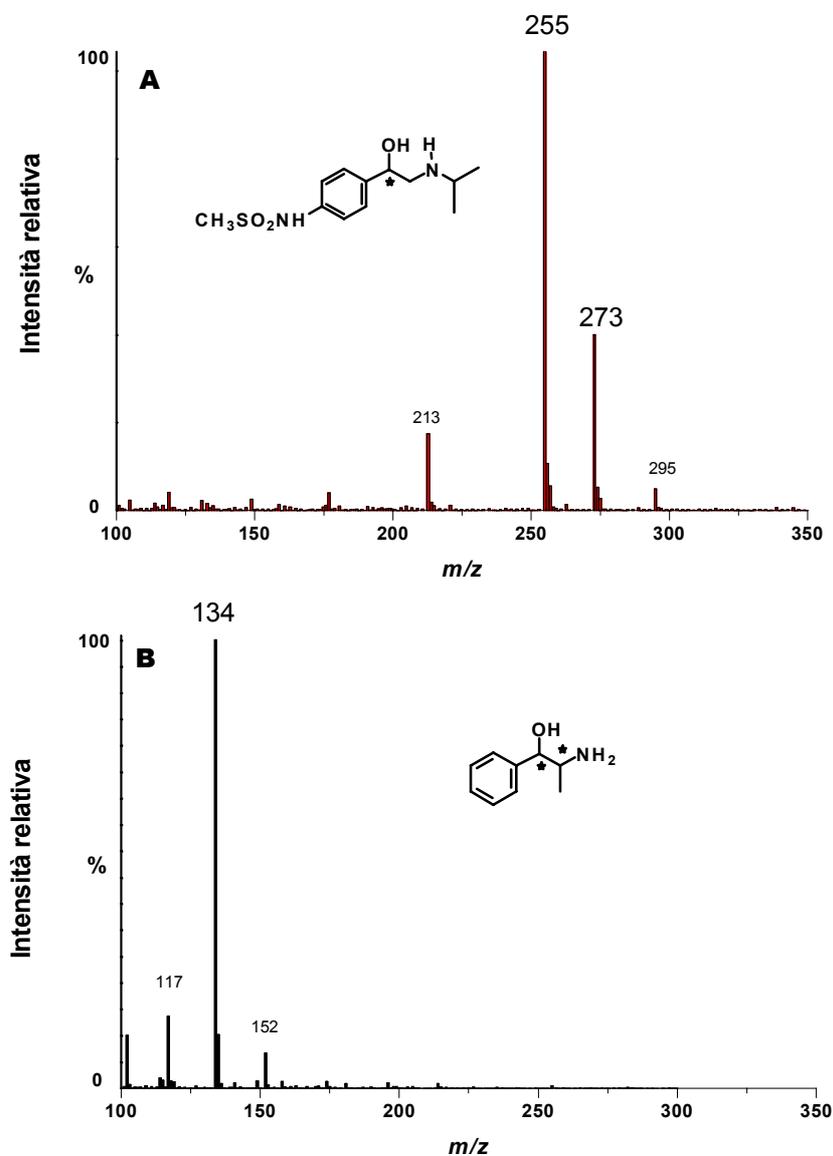


Figura 4. Spettri di massa del sotalolo (A) e della nor-efedrina (B)

Per quanto riguarda invece lo standard interno (Figura 4B), lo ione molecolare protonato ($[M + H]^+$) è stato identificato a 152 m/z , con un'intensità relativa inferiore al 10%, mentre il frammento principale è stato attribuito allo ione molecolare disidratato (134 m/z). Per l'acquisizione in modalità SIR, sono stati scelti i frammenti a 273 m/z ($[M + H]^+$) e a 255 m/z ($[MH-18]^+$) per il sotalolo, mentre per lo standard interno è stato preso in considerazione lo ione a 134 m/z ($[MH-18]^+$).

È stato condotto uno studio della linearità della risposta al rivelatore MS per l'analita e per lo standard interno, dal quale è risultato che le due molecole rispondono in maniera lineare ($R = 0,997-0,998$) e del tutto analoga tra di loro. Dopo un accurato studio di selettività della fase mobile, realizzato attraverso l'impiego di diverse combinazioni di modificatori organici (metanolo, etanolo, acetonitrile) e di diversi tamponi (acetato d'ammonio, formiato d'ammonio, carbonato d'ammonio, acetato di trietilammonio, trimetilammonio idrossido), siamo giunti alla completa separazione dei due enantiomeri in questione (Figura 5).

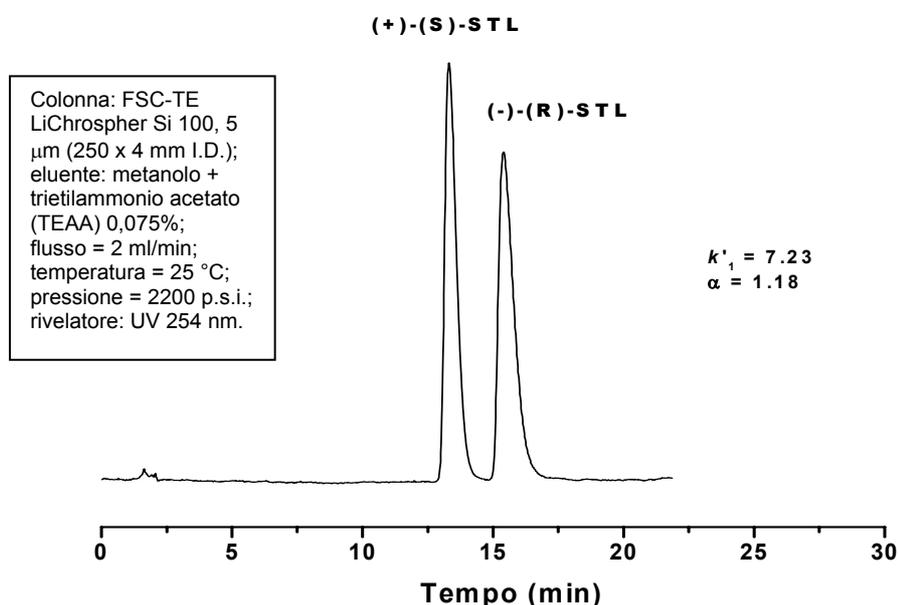


Figura 5. Risoluzione diretta mediante HPLC enantioselettiva degli enantiomeri del sotalolo

L'ordine di eluizione dei due enantiomeri del sotalolo è stato determinato mediante cromatografia di campioni arricchiti in uno dei due enantiomeri, ed è risultato essere (+)-(S)-STL prima di (-)-(R)-STL, inverso a quello stabilito nel caso del metodo cromatografico indiretto.

Studio farmacocinetico del sotalolo

I campioni biologici utilizzati in questo studio sono stati forniti dall'Istituto di Scienze Farmacologiche dell'Università di Milano e costituiscono parte integrante di una collaborazione con il suddetto Istituto, volta a definire il destino metabolico degli enantiomeri di alcuni farmaci somministrati in forma racemica.

Sono stati presi in considerazione cinque volontari sani (denominati A, B, C, D, E), di età compresa tra 21 e 29 anni, ai quali è stato somministrato sotalolo racemico in una singola dose di 80 mg per via orale. I prelievi di sangue sono stati eseguiti prima della somministrazione e dopo 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 36 ore.

Prima dell'analisi cromatografica, i campioni biologici sono stati sottoposti ad estrazione in fase solida (Solid Phase Extraction, SPE) utilizzando le cartucce Oasis™ HLB, che si sono rivelate migliori delle tradizionali cartucce Sep-Pak C18 normalmente utilizzate per l'estrazione di analiti da liquidi biologici. I recuperi ottenuti sono stati pari al 95% per il sotalolo e superiori al 99% per lo standard interno. Non è stata osservata alcuna differenza nel recupero dei due enantiomeri dell'analita.

In Figura 6 è riportato un esempio di cromatogramma ottenuto nel caso di un campione di plasma corrispondente alla concentrazione ematica massima di sotalolo (0,22 e 0,25 µg/ml per (+)-(S)- e (-)-(R)-STL, rispettivamente), rinvenuta dopo 4 ore dalla somministrazione orale di 80 mg di farmaco nel volontario denominato A, di 21 anni.

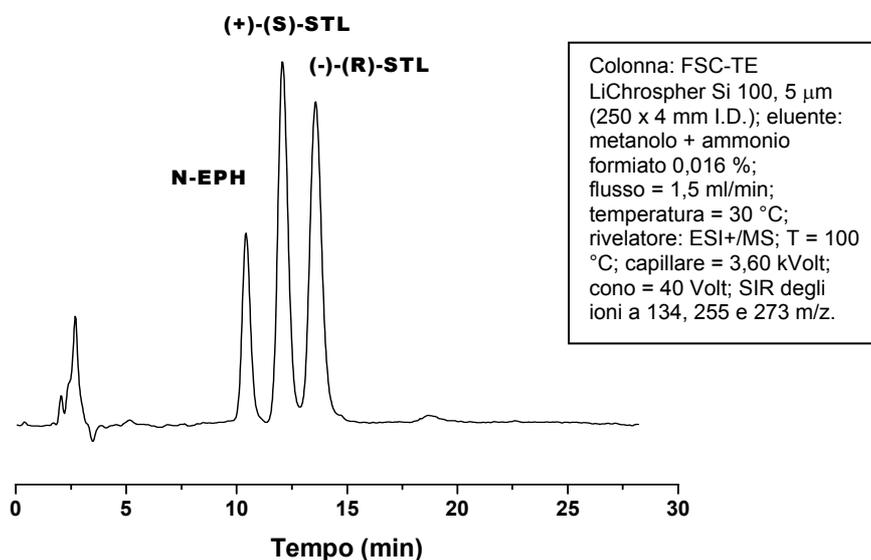


Figura 6. Analisi cromatografica del plasma umano del volontario denominato A, corrispondente alla concentrazione massima di sotalolo (4 h)

In Figura 7 sono infine illustrati i livelli plasmatici medi di STL, relativi ai cinque volontari sani analizzati. Il comportamento farmacocinetico del sotalolo si è dimostrato assai variabile nei cinque volontari esaminati, con valori di C_{max} e T_{max} oscillanti tra 0,47 e 0,75 µg/ml e tra 2 e 6 ore, rispettivamente. I livelli massimi medi di (+)-(S)- e (-)-(R)-sotalolo sono risultati pari a circa 0,27 µg/ml.

Per quanto riguarda il comportamento degli enantiomeri, appare evidente che non ci sono differenze significative nei parametri farmacocinetici, in accordo alla letteratura (8, 9) e a quanto già da noi trovato mediante il metodo cromatografico indiretto (Figura 8) (1).

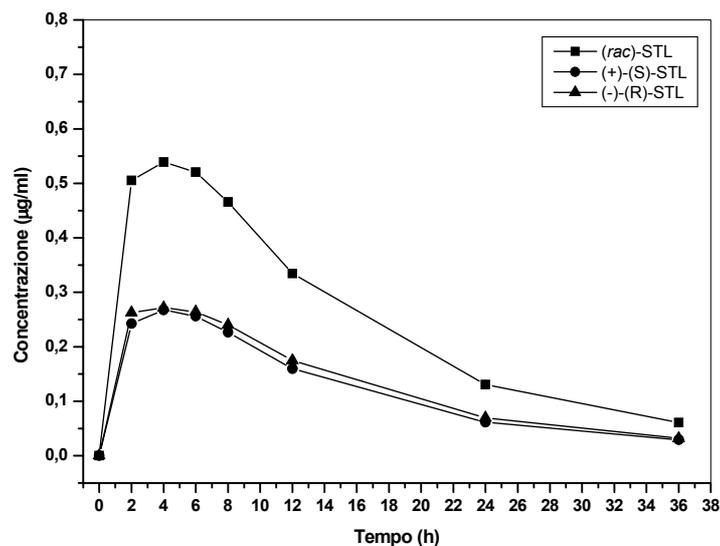


Figura 7. Livelli plasmatici medi di sotalolo ottenuti mediante il metodo cromatografico diretto, relativamente a cinque volontari sani denominati A, B, C, D, E

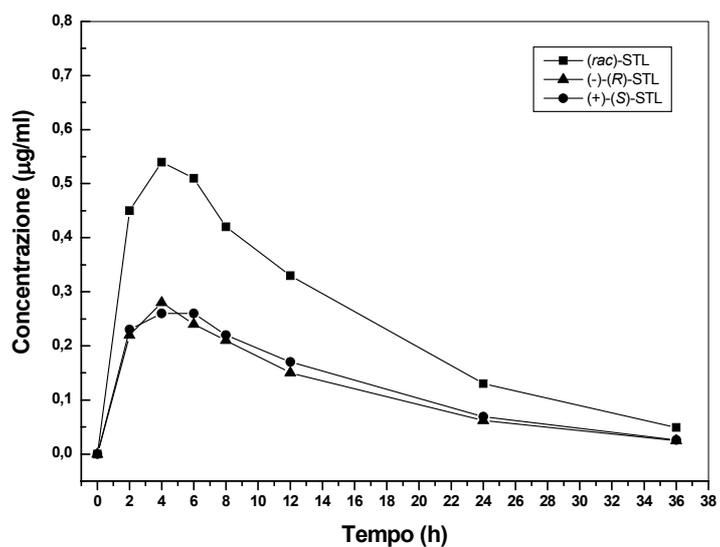


Figura 8. Livelli plasmatici medi di sotalolo ottenuti mediante il metodo cromatografico indiretto, relativamente a cinque volontari sani denominati 1, 2, 3, 4, 5

Conclusioni

L'approccio cromatografico diretto da noi applicato in questo studio farmacocinetico del sotalolo si è dimostrato molto più sensibile e preciso rispetto a quello indiretto (1), e senza dubbio meno lungo e laborioso. Inoltre, la metodica sviluppata risulta del tutto innovativa, sia

per il tipo di fase stazionaria chirale applicata per la prima volta all'analita in questione, sia per l'accoppiamento con la MS.

I risultati ottenuti hanno mostrato che non vi è un'apprezzabile stereoselettività nel profilo farmacocinetico del sotalolo. Tali dati sono in accordo con studi precedenti presenti in letteratura (8, 9), relativi a volontari sani trattati con dosi singole di sotalolo racemico. In uno studio successivo (10) è stata osservata una qualche stereoselettività, ma solo nel caso di somministrazioni ripetute di sotalolo in pazienti affetti da tachicardia supraventricolare.

Bibliografia

1. Badaloni E, Cancelliere G, D'Acquarica I, Misiti D, Gasparrini, F, Pierini M, Villani C. Determinazione mediante HPLC enantioselettiva dei livelli ematici di sotalolo nell'uomo: confronto tra approccio diretto ed indiretto. In: Ciranni E (Ed.). *Progetto di ricerca: Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. (Rapporti ISTISAN 00/18).
2. D'Acquarica I, Gasparrini F, Misiti D, Villani C, Carotti A, Cellamare S, Muck S. Direct chromatographic resolution of carnitine and O-acyl carnitine enantiomers on a teicoplanin-bonded chiral stationary phase. *J Chromatogr A* 1999;857:145-55.
3. Parenti F, Beretta G, Berti M, Arioli V. Teicomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties. *J Antibiotics* 1978;31:276-83.
4. Bardone MR, Paternoster M, Coronelli C. Teicomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov. sp. II. Extraction and chemical characterization. *J Antibiotics* 1978;31:170-7.
5. Armstrong DW, Tang Y, Chen S, Zhou Y, Bagwill C, Chen JR. Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal Chem* 1994;66:1473-84.
6. Armstrong DW, Liu Y, Ekborgott KH. A covalently bonded teicoplanin chiral stationary phase for HPLC enantioseparation. *Chirality* 1995;7:474-97.
7. Lee MS, Kerns EH. LC/MS applications in drug development. *Mass Spectrom Rev* 1999;18:187-279.
8. Poirier JM, Jaillon P, Lecocq B, Lecocq V, Ferry A, Cheymol G. *Eur J Clin Pharmacol* 1990;38:579.
9. Carr RA, Foster RT, Lewanczuk RZ, Hamilton PG. Pharmacokinetics of sotalol enantiomers in humans. *J Clin Pharmacol* 1992;32:1105-9.
10. Fiset C, Philippon F, Gilbert M, Turgeon J. Stereoselective disposition of (\pm)-sotalol at steady-state conditions. *Br J Clin Pharmacol* 1993;36 :75-7.

RACEMATO O ENANTIOMERO PURO: UNA STRATEGIA D'INDAGINE PER UN PIÙ ADEGUATO IMPIEGO IN TERAPIA DEI FARMACI CHIRALI

Maria Giovanna Quaglia (a), Anna Farina (b), Maura Palmery (c), Elena Bossù (b), Viviana Cotichini (b)
(a) Dipartimento Studi Farmaceutici, Università degli Studi "La Sapienza", Roma
(b) Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(c) Istituto di Farmacologia e Farmacognosia, Università degli Studi "La Sapienza", Roma

Sintesi dell'attività svolta e dei principali risultati

Nella ricerca intrapresa sono stati presi in considerazione alcuni farmaci cardiovascolari di largo consumo, tutti chirali, quali: flecainide, indapamide, mexiletina, midodrina, propafenone e alcuni derivati diidropiridinici come nitrendipina, nimodipina, nicardipina.

Lo studio è stato articolato in tre parti e precisamente:

- enantioseparazione della miscela racemica per HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, cromatografia liquida ad elevate prestazioni) mediante fasi stazionarie chirali (Chiral Stationary Phase, CSP). *Scale up* delle condizioni operative, messe a punto con colonne analitiche, per l'ottimizzazione della fase mobile da usare con una colonna di tipo preparativo per raccogliere separatamente gli enantiomeri delle miscele racemiche studiate;
- studio di idonei selettori chirali al fine di mettere a punto metodi di enantioseparazione mediante HPCE (*High-Performance Capillary Electrophoresis*, elettroforesi capillare ad elevate prestazioni), utili nella verifica rapida della purezza enantiomerica e quindi della stabilità degli enantiomeri separati;
- studio della bioattività degli enantiomeri separati al fine di individuare l'eutomero e il distomero, valutandone le possibili differenze quali-quantitative.

I metodi HPLC di enantioseparazione, messi a punto nella prima parte della ricerca, sono stati eseguiti usando come fasi stazionarie chirali la cellulosa tris-(3,5 dimetildifenilcarbammato), Alfa1-glicoproteina e l'ovomucoide. Gli enantiomeri, ottenuti da ogni miscela racemica dei farmaci considerati, sono stati usati per testare la loro attività farmacologica. Contemporaneamente, ma lo studio è continuato soprattutto nella seconda parte, sono stati studiati selettori chirali per l'elettroforesi zonale (*Capillary Zone Electrophoresis*, CZE) o micellare (*Micellar Electrokinetic capillary Chromatography*, MEKC) quali le ciclodestrine (*Cyclodextrins*, CD), gli acidi colici e alcune proteine.

I risultati di questa parte della ricerca sono stati pubblicati come atti di congressi nazionali e internazionali o come articoli su riviste internazionali (1-8).

Nell'ultima parte della ricerca si è cercato di verificare la stabilità dei singoli enantiomeri separati e di confermare, mediante lo studio del *binding* di alcuni dei composti esaminati con le proteine plasmatiche, le differenze di attività tra i singoli enantiomeri e i racemati. Questo studio aveva lo scopo di permettere una valutazione sull'utilità o meno di sostituire nella specialità medicinale il racemato con l'eutomero.

Prima di affrontare lo studio del *binding* farmaco-proteine plasmatiche è stata verificata nel tempo la stabilità degli enantiomeri separati. La verifica è stata eseguita determinando eventuali

differenze nell'area del picco corrispondente mediante CE (*Capillary Electrophoresis*), usando come selettore chirale le trimetil-beta-ciclodestrine. L'osservazione, durata circa una settimana, non ha evidenziato differenze di area tali da far pensare ad una interconversione tra i due enantiomeri. Ha fatto eccezione l'indapamide i cui enantiomeri fin dalle prime analisi hanno mostrato, non interconversione tra i due enantiomeri, ma picchi di degradazione che non sono stati identificati.

Il *binding* con le proteine plasmatiche è stato studiato in particolare per due dei farmaci cardiovascolari oggetto della ricerca e precisamente per la mexiletina e per l'indapamide.

Questi due farmaci essendo uno, la mexiletina, di natura basica e l'altro, l'indapamide, di natura acida hanno legato rispettivamente con l'alfa 1-glicoproteina (*Alpha GlicoProtein*, AGP) e con la sieralbumina (*Human Serum Albumin*, HSA).

Il metodo più usato nella determinazione del *binding* dei farmaci con le proteine plasmatiche è il metodo Kummel-Dryer (9). In un nostro precedente lavoro (10) questo metodo era stato da noi leggermente modificato cambiando il campione da iniettare e il *running buffer*. Nel metodo Hummel-Dryer il campione iniettato era costituito dal complesso farmaco-proteina e nel *running buffer* era presente una concentrazione nota del farmaco in studio. La nostra modifica ha riguardato il campione che non è stato più il complesso farmaco-proteina, ma la sola proteina, solubilizzata nel tampone. I risultati ottenuti concordano con i dati ottenuti dalla sperimentazione farmacologica: il farmaco più attivo è risultato essere quello meno legato alle proteine plasmatiche. Pur essendoci una differenza di attività tra gli enantiomeri separati e la miscela racemica, questa non è significativa. Quindi non sembra utile sostituire nella forma farmaceutica il racemato con l'eutomero soprattutto se si considera che tutti i composti esaminati sono in commercio da molti anni. Infatti la vera sperimentazione clinica di un farmaco è di fatto realizzata solo dopo la sua immissione in commercio. Per un farmaco di largo impiego i pazienti, oggetto di questa seconda "sperimentazione", passano da poche centinaia a centinaia di migliaia. Se l'osservazione clinica del medico di base e la farmacovigilanza sono attente, pregi e difetti del farmaco sotto osservazione emergeranno in modo statisticamente corretto e molto significativo. Al momento quindi della richiesta di rinnovo da parte del produttore della autorizzazione a mantenere in commercio la specialità medicinale, le autorità competenti avranno a disposizione dati oggettivi che garantiscano efficacia e sicurezza d'uso del farmaco osservato. Alcuni effetti collaterali, a volte anche seri, non ben evidenziati nello studio sperimentale fatto prima dell'immissione in terapia, potranno essere meglio valutati sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo. Per contro anche la validità del farmaco, pur considerando gli eventuali effetti collaterali, sarà meglio evidenziata.

Per i farmaci chirali, oggetto della nostra ricerca, quanto ora detto è di particolare interesse. Infatti l'osservazione nel lungo periodo consente di vedere con oggettività il ruolo del distomero nella miscela racemica e di giustificare la ricerca eseguita.

La normativa comunitaria per i farmaci chirali, già in commercio sotto forma di miscela racemica, prevede un'indagine che ne evidenzia la sicurezza d'uso.

Solamente per uno dei farmaci osservati potrebbe essere vantaggioso l'uso dell'enantiomero puro. Ci riferiamo alla midodrina, farmaco usato nell'ipotensione. Le sue caratteristiche farmaco-dinamiche sono dovute ad un'azione stimolante, diretta e selettiva, sui recettori alfa 1-adrenergici periferici. Da questa azione deriva un incremento delle resistenze vascolari che portano ad un aumento della pressione sanguigna.

In genere la midodrina viene considerata un profarmaco attribuendo tutta l'attività al suo metabolita, la deglimidodrina.

Dal nostro studio è risultata evidente l'attività della midodrina che sia come racemato che come (-) enantiomero ha contratto in maniera dose-dipendente le strisce di aorta. Le differenze nell'intensità di azione tra il racemato e l'enantiomero puro non sono risultate statisticamente

diverse. La (+) midodrina si è mostrata debolmente attiva solo ad una concentrazione di $7,2 \cdot 10^{-7}$ M, concentrazione alla quale il (-) enantiomero e il racemo avevano già raggiunto l'effetto massimale. Anche la deglimidodrina, metabolita della midodrina, ha mostrato che l'attività sia del racemato che del (-) enantiomero è dose dipendente e si è mostrata per ambedue di una intensità circa sette volte maggiore rispetto a quella della midodrina. Il (+) enantiomero è risultato inattivo. Da quanto risulta dalla nostra ricerca la midodrina, contrariamente a quanto riportato in letteratura, agisce come agente simpaticomimetico confermando la sua attività alfa1 agonista anche se il metabolita risulta essere più attivo. Dai nostri dati risulta che l'attività dei (-) enantiomeri è equipotente a quella dei rispettivi racemati. Questi dati sono stati confermati da studi sulla valutazione della pressione cruenta nel ratto anestetizzato. Dai dati sperimentali è risultato che la midodrina e la deglimidodrina sono entrambi attivi nel provocare un rialzo della pressione. La deglimidodrina è risultata 1000 volte più potente, ma l'effetto della midodrina si è dimostrato più persistente e duraturo. Il (+) enantiomero del metabolita è risultato praticamente non attivo.

Anche per la deglimidodrina il (-) enantiomero e il racemato non mostrano differenze qualitative nell'attività.

Queste osservazioni possono suggerire di usare in terapia la (-) midodrina (l'eutomero), dimezzando la dose e diminuendo così gli effetti collaterali. Naturalmente questa è una ipotesi che deve essere confermata da ulteriori ricerche e soprattutto da una sperimentazione anche clinica.

Bibliografia

1. Quaglia MG, Farina A, Porrà R, Bossù E, Dell'Aquila C, Silvestrini B. Racemate or pure enantiomer: an investigation strategy for a safer use of chiral drugs. In: *Proceedings 8th International Symposium On Chiral Discrimination*. Edimburgo (UK) 30 giugno-3 luglio 1996. p. P7-13.
2. Quaglia MG, Farina A, Porrà R, Bossù E, Dell'Aquila C, Palmery M. Uno schema d'indagine analitica su un farmaco chirale per il confronto quali-quantitativo dell'attività del racemato e degli enantiomeri puri. XIII Convegno Nazionale della Divisione di Chimica Farmaceutica della SCI. Paestum 23-27 settembre 1996, pag. 74 degli Atti del Convegno – Comunicazione.
3. Quaglia MG, Farina A, Bossù E, Cotichini V, Gasparrini F. α 1-AGP as chiral selector in resolution of midodrine and its main metabolite racemates by HPLC and CE. In: *XXXXX 21 Symposium on Column Liquid Chromatography and related techniques - HPLC 97*. Birmingham 22-27 giugno 1997. p. 68.
4. Quaglia MG, Bossù E, Dell'Aquila C, Donati E, Porrà R. Biile acids as chiral selectors in the enantiomers separation of cardiovascular drugs. In: *7th Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis (RDPA '97)*. Elba 16-20 settembre 1997. p. 223 OC 5.
5. Quaglia MG, Bossù E, Donati E, Farina A. Human alfa-glycoprotein acid as chiral selector in the enantioseparation of a beta 2-blocker and some cardiovascular drugs. In: *10th International Symposium on Chiral Discrimination*. Vienna 30 Agosto-3 settembre 1998. p. P59.
6. Quaglia MG, Farina A, Bossù E, Cotichini V. Human α 1-glycoprotein acid as chiral selector in the enantioseparation of midodrine and deglymidodrine racemates by HPLC. *J Pharm Biom Anal* 1998;18, 171-7.
7. Quaglia MG, Fanali S, Donati E, Catarcini P. The enantioseparation of some cardiovascular drugs. In: *9th Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis (RDPA 2001)*. Lipari 5-8 giugno 2001. p. 68-9.
8. Quaglia MG, Bossù E, Dell'Aquila C, Guidotti MC. Determination of the binding of a β 2-blocker drug, frusemide and ceftriaxone to serum proteins by capillary zone electrophoresis. *J Pharm Biom Anal* 1997;15, 1033-9.

LINEA DI RICERCA A.2
Fotostabilità e fotoreattività

REATTIVITÀ FOTOINDOTTA DI FARMACI E SUA RELAZIONE CON LA FOTOSTABILITÀ DI PREPARATI FARMACEUTICI E CON EFFETTI FOTOSENSIBILIZZANTI

Elisa Fasani (a), Mariella Mella (a), Andrea Ricci (a), Sandra Monti (b), Angelo Albini (a)

(a) Dipartimento Chimica Organica dell'Università di Pavia, Pavia

(b) Istituto di Fotochimica e Radiazioni d'Alta Energia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna

Sintesi dell'attività svolta e dei principali risultati

Fotoreattività e fototossicità dei farmaci

I farmaci, come tutte le molecole, possono subire reazioni fotochimiche, ma questa reattività ha destato abbastanza poco interesse per molto tempo. Questa scarsa attenzione è dovuta al fatto che, mentre molte molecole ad azione farmacologica si decompongono rapidamente quando esposte alla luce naturale o artificiale in soluzione diluita, la fotodegradazione è di solito molto meno evidente per le preparazioni farmaceutiche, che consistono in soluzioni concentrate, sospensioni o solidi in cui la penetrazione della luce è scarsa. Nella maggior parte dei casi, risulta quindi abbastanza semplice proteggere il principio attivo attraverso un confezionamento opaco, o con l'opportuna scelta di un *coating* per capsule o compresse. Tuttavia, l'attenzione al fenomeno è cresciuta negli ultimi anni, anche a causa delle più stringenti richieste sulla purezza dei preparati farmaceutici e, insieme alla definizione degli altri aspetti della stabilità, deve ora essere valutata quantitativamente anche la stabilità alla luce, attraverso procedure internazionalmente riconosciute (*International Conference on Harmonisation Guidelines*), che comunque lasciano al momento alcune ambiguità che dovranno essere chiarite nel prossimo futuro.

Anche se la protezione della preparazione farmaceutica può essere perfettamente garantita da involucri o rivestimenti, non si deve dimenticare che i farmaci, una volta assunti non sono più protetti. La luce infatti penetra nella cute per una profondità non trascurabile, che dipende della lunghezza d'onda. L'UV-C è infatti completamente assorbito dall'epidermide, ma l'UV-B e l'UV-A penetrano fino al derma con percentuali crescenti con la lunghezza d'onda e nel caso del visibile le radiazioni raggiungono i tessuti sottocutanei. Questo fatto rende possibili reazioni fotochimiche per i molti farmaci che assorbono radiazioni presenti nella luce ambiente, sia quando dopo l'assunzione vengano trasportati dalla circolazione nella cute o nei vasi periferici, che, naturalmente, quando vengano usati in forma topica o come gocce oculari. Ne possono risultare fenomeni allergici o tossici di varia natura, sia localizzati che sistemici. I dati clinici sull'incidenza dei fenomeni fototossici o fotoallergici legati all'assunzione di farmaci sono in forte crescita negli ultimi anni, forse anche in relazione alla crescente abitudine alla vita all'aria aperta e, almeno in alcuni casi, questi rappresentano uno dei seri effetti collaterali dei farmaci.

Lo studio della fototossicità si sta sviluppando sotto l'aspetto clinico e biologico attraverso indagini condotte sia *in vivo* che *in vitro*. L'obiettivo è naturalmente quello di stabilire una correlazione tra la struttura del farmaco e il tipo di azione tossica rilevata. Si tratta di un obiettivo ambizioso, su cui la ricerca è appena all'inizio, e che richiede uno sforzo interdisciplinare. È evidentemente importante che una gran parte del lavoro sia condotta attraverso prove *in vitro* e uno degli elementi base è la determinazione accurata dei processi fotochimici che avvengono sui

principi farmaceutici in condizioni paragonabili a quelle cui sono esposti nell'organismo. Abbiamo cercato di dare un'idea dell'importanza della fototossicità e del ruolo che gli studi fotochimici possono avere per chiarirla in uno specifico articolo (1) e alcune presentazioni (2, 3).

L'indagine scientifica da noi svolta è stata concentrata su due famiglie di farmaci note per la loro fototossicità, quella degli antibatterici fluorochinolonici e quella dei glucocorticosteroidi, ed è stata rivolta a chiarire tutti gli aspetti fotochimici e fotofisici come contributo alla comprensione e alla previsione della fototossicità.

Fotochimica dei fluorochinoloni

Gli acidi 7-amino-6-fluorochinol-4-one-3carbossilici (FQ), largamente usati come antibatterici, assorbono intensamente fino all'UV-A e costituiscono uno dei più importanti gruppi di farmaci in cui la fototossicità viene segnalata essere un serio effetto collaterale e una limitazione terapeutica (ad esempio è stata considerata l'opportunità di limitarne l'assunzione al periodo precedente il riposo notturno). Prima dell'inizio di questo progetto di ricerca i dati sulla fotochimica di queste molecole erano praticamente inesistenti, mentre ora è stato svolto un lavoro approfondito su praticamente tutti i FQ di significativo uso terapeutico da parte di questo gruppo e di quello dell'Università di Catania, oltre che da alcuni laboratori stranieri.

Praticamente tutti i farmaci di questa classe subiscono reazioni di defluorurazione in solvente acquoso e questo fenomeno deve essere considerato, insieme alla sensibilizzazione dell'ossigeno, uno dei meccanismi alla base degli effetti fototossici.

Sviluppando l'indagine dopo gli studi preliminari di cui si è riferito nelle precedenti relazioni, si è potuto ora dimostrare che la defluorurazione avviene secondo tre meccanismi distinti (4-10).

Nel primo di essi lo stato tripletto del FQ reagisce con l'acqua e in definitiva subisce sostituzione nucleofila attraverso l'usuale meccanismo di addizione-eliminazione caratteristico delle molecole eteroaromatiche. L'efficienza di questo processo è tanto maggiore quanto più elettrofilo è il substrato. Nelle strutture più diffuse tra i FQ (Figura 1) la posizione più critica da questo punto di vista è la 8. In effetti gruppi elettron attrattori (es. nel caso dell'aza-sostituzione dell'enoxacina) rendono la molecola più reattiva di quelle non sostituite in 8 (es. norfloxacin, ciprofloxacina) che a loro volta sono più reattive di quelle con gruppi elettron attrattori come l'ofloxacina.

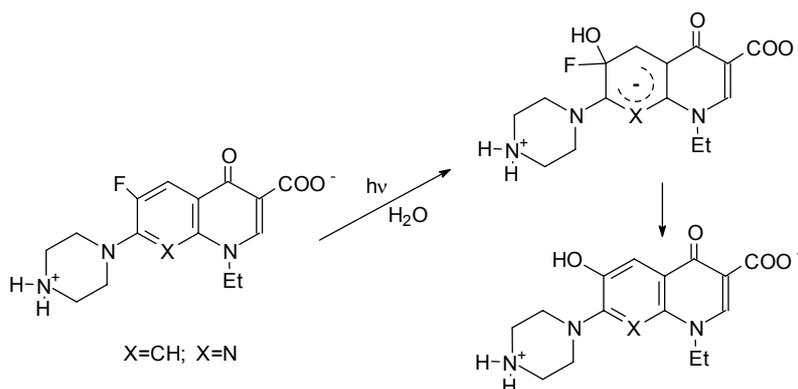


Figura 1. Fotodefluorurazione bimolecolare di fluorochinoloni

Un secondo meccanismo comporta la defluorurazione monomolecolare. Questo processo è significativo solo per molecole polifluorate con un atomo di fluoro in posizione 8. In questo caso una reazione molto efficiente (resa quantica > 0,5, mentre con il meccanismo precedente si

arriva al massimo a 0,15, con minimi nell'ordine di 0,001 per molecole come l'ofloxacin) porta alla defluorurazione selettiva in 8, con formazione di un catione arilico allo stato tripletto. Questo intermedio mostra una chimica peculiare: non si ha somma di acqua, ma solo di anioni quando presenti (es. cloruri) o alternativamente avviene estrazione di idrogeno intramolecolare dalla catena in posizione 1, come mostrato nella Figura 2 per il caso della lomefloxacin (4, 7, 11).

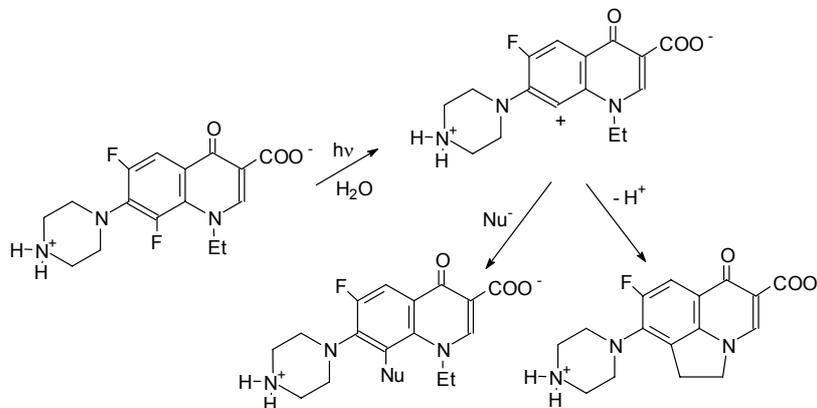


Figura 2. Fotodealogenazione monomolecolare della lomefloxacin

Un terzo meccanismo è operativo quando sono presenti anioni inorganici. Le forti proprietà ossidanti del tripletto eccitato causano allora un processo di trasferimento di elettrone a formare il radicale anione (la stessa specie che si ottiene per riduzione catodica) (12) che è anch'esso in grado di defluorurare, seppure con bassa efficienza. In questo modo si originano radicali arilici che si riducono ulteriormente in ambiente marcatamente riducente (es. in presenza di solfiti) o subiscono diversi trasferimenti di idrogeno con anioni come il fosfato (4, 7, 13) (Figura 3).

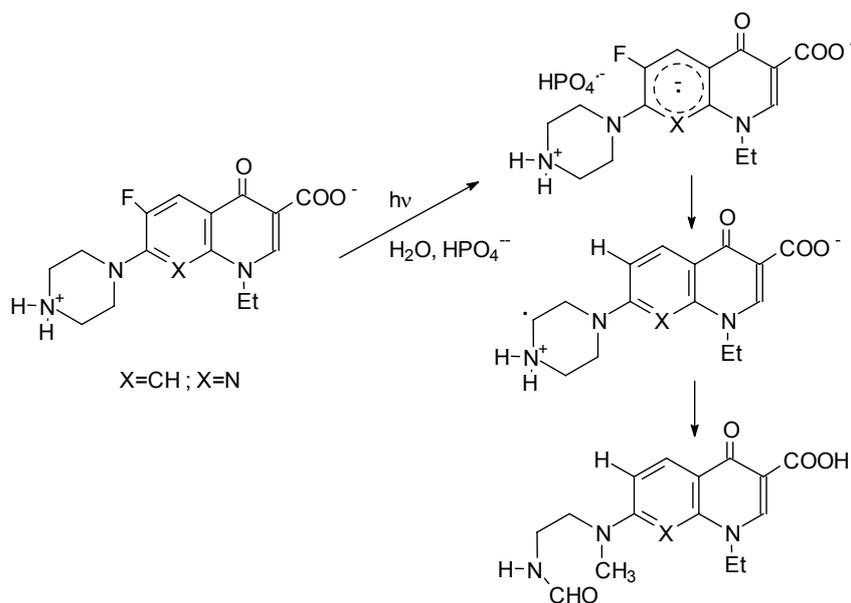


Figura 3. Fotodealogenazione dei fluorochinoloni via trasferimento di elettrone in presenza di anioni

Come si vede la fotochimica dei FQ è molto diversificata. Soprattutto, è importante notare che nel secondo e terzo meccanismo si formano intermedi altamente reattivi (cationi e radicali). Questo induce a considerare ulteriori vie per l'effetto fototossico, basate sull'effetto che tali specie hanno su componenti cellulari, in alternativa ai meccanismi di attivazione dell'ossigeno usualmente proposti, ma poi dimostrati essere del tutto insufficienti a spiegare la scala di reattività dei FQ. Su questa ipotesi si stanno ora costruendo modelli che possano mimare le fotoreazioni in diverse localizzazioni cellulari.

Fotochimica dei glucocorticosteroidi

Un'altra famiglia di farmaci che abbiamo studiato è quella dei glucocorticosteroidi. Molti derivati di questo gruppo sono usati come antinfiammatori in forma topica e questo fatto, unito all'estensione dello spettro di assorbimento fino all'UV-A li candida alla reattività alla luce solare e artificiale. Di fatto, anche in questo caso sono stati segnalati fenomeni di fototossicità.

Dal punto di vista fotochimico, si pone qui un interessante problema in quanto molti di questi farmaci contengono due cromofori separati. Ad esempio, alcuni pregnandiendioni di largo uso come il triamcinolone presentano sia un carbonile doppiamente coniugato nell'anello A che un gruppo carbonilico isolato nella catena laterale in C-17. In effetti, abbiamo trovato che si verificano due fotochimiche indipendenti a seconda che sia eccitato l'uno o l'altro dei due cromofori. L'irraggiamento a 254 nm o a 360 nm portano prevalentemente all'eccitazione del carbonile coniugato che subisce un riarrangiamento concertato a dare un sistema bicicloesenonico. Al contrario, l'irraggiamento a 310 nm corrisponde essenzialmente all'eccitazione del carbonile in catena e provoca una frammentazione omolitica a dare un radicale alchilico in posizione 17 (14-16). Si ha dunque uno spettro di fotoreattività differenziato con due diverse fotoreazioni che si alternano al variare della lunghezza d'onda (Figura 4).

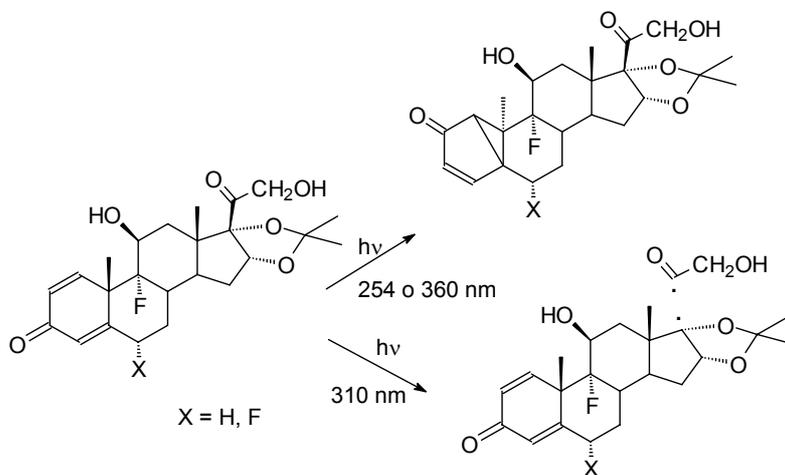


Figura 4. Fotoreattività dipendente dalla lunghezza d'onda di alcuni pregnandiendioni

Tutto induce a pensare che si abbia anche uno spettro di fototossicità differenziato, dato che la prima delle reazioni è una isomerizzazione concertata, che potenzialmente produce un derivato fototossico, la seconda procede attraverso intermedi radicalici che abbiamo dimostrato

essere efficientemente intrappolati dall'ossigeno e che probabilmente attaccano direttamente componenti cellulari.

Indagini per ora preliminari sono state condotte anche su altre famiglie di farmaci, in particolare su nitrofenildiidropiridine, specie per quanto riguarda l'effetto del mezzo sui cammini di fotoreazione (17-19) con lo scopo, anche in questo caso, di identificare i meccanismi responsabili della fototossicità.

Conclusioni

La fototossicità che accompagna l'uso di alcuni farmaci ne costituisce una forte limitazione all'impiego. È importante quindi che le industrie e le autorità di controllo abbiano a disposizione tests *in vitro* che mettano in evidenza una potenziale tossicità indotta dalla luce abbastanza presto nel processo di sviluppo di nuovi farmaci.

D'altra parte si deve tener conto che il fenomeno tossico può essere legato a reazioni molto diverse. Ad esempio, i dati sommariamente indicati sopra indicano che in molti casi reazioni di frammentazione, omolitica od eterolitica, portano a radicali o ioni organici che ben potrebbero essere all'origine dei danni cellulari, che a loro volta si traducono nell'effetto tossico o allergico. Queste reazioni possono quindi competere con la sensibilizzazione dell'ossigeno, fin ad ora considerata dalla maggior parte degli studiosi come l'unico meccanismo importante. Ottenere informazioni dettagliate sulla fotofisica e la fotochimica di molecole usate come principi attivi può quindi contribuire a fare previsioni sulla relazione struttura/fototossicità. Ad esempio nel caso dei fluorochinoloni si evidenzia come una alta fotoreattività venga indotta dall'introduzione di un secondo alogeno in posizione 8, cosa che va tenuta presente in contrasto ai vantaggi farmacologici di tale variazione strutturale; nei glucocorticosteroidi l'introduzione di una catena laterale-idrossichetonica porta a frammentazione radicalica a meno che altri cromofori presenti nella molecola prevengano l'assorbimento di luce da parte di questo gruppo. Inoltre, tali studi possono fornire indicazioni che consentano di proporre tests *in vitro* più mirati.

Bibliografia

1. Albini A, Fasani E. Fototossicità indotta da farmaci. *Cron Farm* 2001; 44:63-7.
2. Fasani E. Photostability of drugs, cosmetics and sunscreens: natural vs artificial light. Users Workshop. Almeria (Spagna), 23-27 febbraio 2002.
3. Fasani E. Light and drugs. Solar Energy and Applied Photochemistry. Cairo (Egitto), 30 marzo – 4 aprile 1999.
4. Fasani E, Barberis Negra FF, Mella M, Monti S, Albini A. Photoinduced C-F bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxylic acids. *J Org Chem* 1999;121:5388-95.
5. Fasani E, Albini A, Mella M, Rampi M, Barberis Negra FF. Light and drugs: the photochemistry of fluoroquinolone antibiotics. *Int J Photoenergy* 1999;1:7-11.
6. Fasani E, Albini A. Photochemistry of fluoroquinolone antibiotics in water. *Photochem Photobiol* 1999;70:855.
7. Monti S, Sortino S, Fasani E, Albini A. Multifaceted photoreactivity of 6-fluoro-7-aminoquinolones from their lowest excited states in aqueous media: a study by nanosecond and picosecond spectroscopy. *Chem Eur J* 2001;7:2186-96.
8. Mella M, Fasani E, Albini A. Photochemistry of 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-7-piperazinyl-4-quinolone-3-carboxylic acid (= cyprofloxacin) in aqueous solution. *Helv Chim Acta* 2001;84:2508-19.

9. Albini A, Fasani E, Mella M, Rampi M, Barberis Negra FF. Photochemistry of antibacterial fluoroquinolones with phototoxic side effects. IV Congr. Fotochim. Gandia (Spagna) 21-24 marzo 1999. p. P-7.
10. Albini A. Photochemistry of some fluoroquinolones. 9th Congr. Europ. Soc. Photobiol. 3-8 settembre 2001.
11. Fasani E, Rampi M, Albini A. Photochemistry of some fluoroquinolones. Effect of pH and chloride ion. *J Chem Soc Perkin Trans 2*. 1999;1901-8.
12. Profumo A, Fasani E, Albini A. First electrochemical defluorination in heterocyclic chemistry. Mild cathodic reduction of some fluoroquinolones. *Heterocycl* 1999;51:1499-502.
13. Fasani E, Mella M, Monti S, Albini A. Unexpected photoreactions of some 6-fluoro-7-aminoquinolones in phosphate buffer. *Eur J Org Chem* 2001;391-7.
14. Ricci A, Fasani E, Mella M, Albini A. Non communicating photoreaction paths in some pregna-1,4-diene-3,20-diones. *J Org Chem* 2001;66:8086-93.
15. Ricci A. Fotochimica in soluzione di alcuni glucocorticosteroidi. Conv. Ann. GIF-GIDF. Ferrara 4-6 dicembre 1999.
16. Ricci A. Non communicating photochemistry of separate chromophores in some glucocorticosteroids. Joint Meeting Italian, French and Swiss Photochem. Groups. Lausanne 25-27 febbraio 2001.
17. Ricci A. Studio di reazioni radicaliche indotte da radiazioni UV e gamma su nitrofenildiidropiridine di interesse farmaceutico. Conv. Ann. GIF-GIDF. Perugia 15-16 dicembre 2001.
18. Aldrigo M, Buttafava A, Fautitano A, Ballardore A, Ricci A, Albini A, Fasani E. UV and gamma induced degradation of nifedipine and nimodipine. Joint Meeting Italian, French and Swiss Photochem. Groups. Lausanne 25-27 febbraio 2001.
19. Fasani E, Albini A, Ballardore A, Ricci A, Buttafava A, Fautitano A, Maggi L, Conte U, Ochoa Machiste E, Segale L. Photostab. Drugs Drug Prod. Res. Triangle Park (USA) 16-19 febbraio 2001.

STUDIO DELLE PROPRIETÀ FOTOCHIMICHE E FOTOTOSSICHE DI FARMACI

Vanni Cavrini (a), Vincenza Andrisano (a), Carlo Bertucci (a), Roberto Gotti (a), Jessica Fiori (a), Romeo Pomponio (a), Roberto Ballardini (b), Patrizia Hrelia (c)

(a) Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Bologna, Bologna

(b) Istituto di Fotochimica e Radiazioni d'Alta Energia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna

(c) Dipartimento di Farmacologia, Università di Bologna, Bologna

Sintesi dell'attività svolta e principali risultati

Nell'ambito del progetto di ricerca su proprietà fotochimiche e fototossiche di farmaci, dopo aver acquisito utili informazioni negli studi relativi a melatonina (1), labetalolo (2) e diltiazem (3), l'attività di ricerca nel terzo anno del programma è stata condotta seguendo due principali linee:

1. Completamento delle indagini su fotostabilità e fototossicità *in vitro* di terfenadina e bumetanide;
2. Avvio di nuove indagini su possibili aspetti stereoselettivi nei processi di fotodegradazione di farmaci chirali complessati con ciclodestrine (CD). Questi studi sono stati effettuati su nicardipina (farmaco a struttura diidropiridinica) complessata con β -CD e idrossi propil- β -CD.

Terfenadina

Per la terfenadina sono state riportati effetti collaterali legati a reazioni di fotosensibilizzazione (4); tuttavia su questo farmaco sono stati condotti solo preliminari valutazioni di stabilità (5) e non studi mirati di fotoreattività e fototossicità. Per queste ragioni la terfenadina è stata inclusa nel presente programma di ricerca.

Poiché la terfenadina presenta scarsa solubilità in acqua, gli studi di fotostabilità sono stati effettuati su soluzioni del farmaco (0,5 mg/ml) in metanolo-acqua 7:3 (v/v). Le soluzioni sono state esposte a temperatura ambiente a radiazioni UVA-UVB (lampada allo xenon; 150 W) e il processo di fotodegradazione è stato seguito mediante spettroscopia UV e cromatografia liquida (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) a fase inversa su Kromasil C-18, usando come fase mobile metanolo-ammonio acetato (pH 6) 75:25 (v/v) ad una velocità di flusso di 0,5 ml/min. La terfenadina è fotolabile e dà luogo a molteplici fotoprodotti, molti dei quali si formano immediatamente e simultaneamente per esposizione alla luce suggerendo un processo fotodegradativo piuttosto complesso. In soluzione diluita (0,5 mg/ml) la fotodegradazione segue una cinetica di pseudo primo ordine con una costante cinetica $k = -1,52 \times 10^{-3}$ e $t_{0,5} = 456$ min. In atmosfera inerte (azoto) la reazione procede in modo simile ma in misura minore. Soluzioni di terfenadina fotodegradata sono state poi sottoposte ad analisi HPLC-MS (*High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) per identificare alcuni dei principali fotoprodotti. Così è stato possibile riconoscere la formazione di azaciclonolo, del chetone e del N-ossido derivato.

Per quanto riguarda i dati di fototossicità *in vitro*, preliminari dati di fotomutagenicità del farmaco sono già stati forniti in una precedente relazione (6).

Bumetanide

Dati di letteratura riguardanti una possibile attività fototossica della bumetanide (7), diuretico a struttura solfonamidica, ci hanno indotto a studiare le proprietà fotochimiche del farmaco e ad isolare e caratterizzare i suoi principali fotoprodotti. I dati fotofisici e fotochimici sono stati ottenuti mediante tecniche fluorimetriche e sono già stati oggetto di una preliminare relazione (8).

La fotodegradazione della bumetanide in soluzione acquosa a vari valori di pH è stata seguita mediante tecnica HPLC a fase inversa. La cinetica di fotodegradazione della bumetanide è risultata essere di pseudo primo ordine e la velocità di fotodegradazione diminuisce passando da pH 10 a pH 13, pH 7,4 e metanolo, in accordo con i valori di rese di scomparsa ottenuti negli studi mediante fluorimetria.

I principali fotoprodotti sono stati isolati mediante estrazione in fase solida (*Solid Phase Extraction*, SPE) e cromatografia HPLC semipreparativa, per essere poi identificati tramite l'analisi ¹H-NMR, LC-MS e MS-MS. I risultati di tali analisi hanno portato all'identificazione di due fotoprodotti principali: il primo, più idrofilo della bumetanide, formatosi per perdita del gruppo amminico della solfonamide, il secondo, più lipofilo, dovuto alla perdita dell'intero gruppo solfonamidico e successiva ciclizzazione in posizione orto al gruppo fenilitero. Un terzo prodotto è risultato essere il fenolo, identificato per confronto con uno standard puro. La struttura dell'altro fotoprodotto è stata proposta sulla base dello spettro MS-MS.

Test di fototossicità sono stati condotti su culture di cellule, usando il test 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity test (3T3 NRU PT test), metodo *in vitro* convalidato (9), usando come controllo positivo 8-metossipsoralene (8-MOP) in presenza e assenza di radiazioni UVA/UVB. In tali test, 8-MOP ha mostrato citotossicità solo in presenza di radiazioni UV (000/161 mJ/cm²), mentre la bumetanide nelle stesse condizioni di fotoesposizione non ha mostrato alcuna citotossicità fino alla più alta concentrazione provata (50 µg/ml).

Fotodegradazione enantioselettiva di nicardipina mediata da ciclodestrine

Nicardipina è un farmaco a struttura diidropiridinica usato nel trattamento dell'ipertensione. Come tutte le diidropiridine è fotoinstabile (10) ed è caratterizzata dalla presenza di un centro stereogenico al C-4. Il farmaco è usato come miscela racemica anche se i due enantiomeri hanno dimostrato diversa attività e farmacocinetica.

Infine, nicardipina mostra scarsa solubilità in acqua; per superare questo limite e migliorare la biodisponibilità un approccio efficace e largamente applicato è quello basato sulla complessazione del farmaco con CD (11). Quindi, nicardipina rappresenta un farmaco sul quale convergono vari aspetti critici: fotoinstabilità, chiralità e insolubilità in acqua. In questo contesto si è ritenuto importante valutare: a) la solubilità e la fotostabilità di nicardipina in presenza di CD; b) una possibile fotodegradazione enantioselettiva del farmaco racemico in un ambiente chirale come quello fornito dalle CD (12).

Diagrammi di solubilità di fase

In via preliminare si è ritenuto necessario verificare la formazione di complessi di inclusione a pH 7,4 della nicardipina con β-CD e idrossipropil-β-ciclodestrina. Sono state così ottenute le

curve di solubilità di fase dalle quali è possibile dedurre (13) che nicardipina forma complessi di inclusione con le due CD in un rapporto molare 1:1, con un apparente costante di associazione K_c di 500 e di 316 M⁻¹ per β -CD e idrossipropil- β -CD, rispettivamente.

Queste soluzioni acquose contenenti complessi di inclusione di nicardipina in CD sono poi state sottoposte a radiazioni UVA-UVB.

Analisi mediante elettroforesi capillare (CE)

Per effettuare gli studi sopra indicati occorre disporre di un metodo separativo molto efficiente in grado di separare in tempi rapidi nicardipina dai suoi fotoprodotto e di separare anche i due enantiomeri del farmaco. La separazione di nicardipina e suoi fotoprodotto è stata ottenuta facilmente mediante elettroforesi capillare (*Capillary Electrophoresis*, CE). Per ottenere simultaneamente la enantiorisoluzione di nicardipina, al tampone di corsa (tampone fosfato pH 2.5) è stata aggiunta β -CD solfato come selettore chirale. Le condizioni di separazione sono poi state ottimizzate al fine di acquisire enantiorisoluzione in tempi rapidi, compatibili con l'esigenza di seguire la fotodegradazione di nicardipina relativamente rapida.

Fotodegradazione in ambiente chirale

Soluzioni acquose (pH 7,4) contenenti β -CD e rac-nicardipina come complessi di inclusione e soluzioni contenenti solo nicardipina senza CD, sono state simultaneamente esposte a radiazioni UVA-UVB. I risultati ottenuti possono essere così riassunti: a) la concentrazione dell'enantiomero che migra per secondo è più bassa di quella che migra per primo, così i due enantiomeri presentano due diversi profili di degradazione con una alterazione del rapporto enantiomerico di circa il 10% dopo fotoesposizione di 4 ore; b) in assenza di CD i profili di degradazione dei due enantiomeri sono del tutto sovrapponibili; c) la β -CD sembra avere un effetto fotoprotettivo su nicardipina.

La stessa serie di esperimenti è stata poi condotta su soluzioni di nicardipina complessata con idrossipropil- β -CD.

I risultati ottenuti mostrano alcuni aspetti interessanti: a) l'enantiomero che migra per primo subisce maggior fotodegradazione e questo porta ancora a due diversi profili di degradazione, ma invertiti rispetto a quelli ottenuti con β -CD; b) la idrossipropil- β -CD sembra favorire la fotodegradazione. In ogni caso le soluzioni di nicardipina mantenute al buio sono del tutto stabili.

Queste indagini sulla nicardipina hanno evidenziato la grande versatilità della CE nel seguire processi di fotodegradazione rapidi nei quali siano coinvolti anche aspetti stereochimici. In particolare sono stati evidenziati specifici e significativi effetti delle CD sul processo di fotodegradazione di farmaci racemici in soluzione acquosa. Infatti, sono state osservate diverse velocità di fotodegradazione per i due enantiomeri della nicardipina e questi risultati sono di interesse pratico per tutti i farmaci chirali, i cui enantiomeri dimostrano diversa attività, fotolabili e poco solubili in acqua, per i quali la solubilità potrebbe essere migliorata attraverso la complessazione con CD.

Bibliografia

1. Andrisano V, Bertucci C, Battaglia A, Cavrini V. Photostability of drugs: photodegradation of melatonin and its determination in commercial formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2000;22:15-23.

2. Andrisano V, Ballardini R, Hrelia P, Cameli N, Tosti A, Gotti R, Cavrini V. Studies on the photostability and *in vitro* phototoxicity of Labetalol. *Eur J Pharm Sci* 2001;12:495-504.
3. Andrisano V, Hrelia P, Gotti R, Leoni A, Cavrini V. Photostability and phototoxicity studies on Diltiazem. *J Pharm Biomed Anal* 2001;25:589-97.
4. Martindale [The Extra Pharmacopoeia] – 31st Ed., J.E.Reynolds (Ed), London 1996.
5. Chen TM, Sill AD, Honsemyer CVL. Solution stability study of Terfenadine by HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 1986;4:533-9.
6. Cavrini V, Andrisano V., Di Pietra A, Peduli G, Ballardini R, Tosti A, Guerra L, Hrelia P. Studio delle proprietà fitochimiche e fototossiche di farmaci In: Cignitti M (Ed.). *Progetto di ricerca: Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1998. p.19-22. (Rapporti ISTISAN, 98/13).
7. Selvaag E. Studies on the phototoxicity effects of oral antidiabetic and diuretics, *Arzneim. Forsch./ Drug Res* 1997;47: 97-100 e 1031-4.
8. Cavrini V, Andrisano V, Bertucci C, Gotti R, Gatti R, Ballardini R, Cameli N, Tosti A, Hrelia P. In: Ciranni E (Ed.). *Secondo progetto di ricerca. Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. p. 36- 44. (Rapporti ISTISAN 00/18).
9. European Commission. Test guideline B-41 “Phototoxicity *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test” of Annex V of the EU Directive 86/906/EEC for classification and labelling of hazardous chemicals. *Official Journal of the European Communities* 2000;L136:98-107.
10. Albini A, Fasani E. *Drug: photochemistry and photostability*. London: The Royal Society of Chemistry; 1998
11. Fernandes CM, Vieira MT, Veiga FJB. Physicochemical characterization and *in vitro* dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrins inclusion compounds. *Eur J Pharm Sci* 2002;15:79-88.
12. Pomponio R, Gotti R, Bertucci C, Cavrini V. Evidences of cyclodextrin-mediated enantioselective photodegradation of rac- nicardipine by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2001;22:3243-50.
13. Mosher G, Thompson D, Swarbrik J, Boylan JC (Ed.). *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. Vol. 19. New York: Marcell-Dekker; 2000. p.49-88.

MECCANISMI MOLECOLARI DI FOTOSENSIBILIZZAZIONE INDOTTA DA FARMACI IN SISTEMI BIOLOGICI E DESIGN DI SISTEMI FOTOPROTETTIVI

Giuseppe Condorelli (a), Lucia Laura Costanzo (a), Guido De Guidi (a), Salvatore Giuffrida (a), Sandra Monti (b), Salvatore Sortino (b)

(a) *Dipartimento di Scienze Chimiche Università di Catania, Catania*

(b) *Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività (ISOF)-CNR, Area della Ricerca, Bologna*

Sintesi dell'attività svolta e principali risultati

Le ricerche svolte in questo terzo progetto sono il proseguimento e lo sviluppo di quelle avviate nei due precedenti.

L'obiettivo è quello di chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nella fotodegradazione di farmaci, la natura dei processi di fotosensibilizzazione, i danni biologici fotoindotti, l'origine della fototossicità e fotoallergia.

Affinché i risultati abbiano una ragionevole utilità, dopo lo studio effettuato in mezzo omogeneo è necessario investigare la fotoreattività del farmaco in condizioni da mimare il più possibile l'ambiente in cui esso si trova nell'organismo.

La formazione di aggregati supramolecolari tra farmaco fotosensibilizzante e biomolecola può determinare una risposta all'eccitazione fotonica differente rispetto a quella della molecola libera. Natura dei più bassi stati eccitati, efficienza dei cammini di disattivazione fotofisica e fotochimica, destino degli intermedi di reazione, apertura di nuovi canali di disattivazione sono alcune delle caratteristiche del farmaco che possono essere marcatamente influenzate dalla sua compartimentalizzazione in specifici siti del microambiente biologico. Queste considerazioni hanno suggerito pertanto di esplorare il comportamento fotochimico in sistemi biologici modello di crescente complessità, quali ciclodestrine, micelle di varia natura, vescicole liposomiali, membrane biologiche eritrocitarie, proteine, DNA. Tale studio è inoltre indispensabile per lo sviluppo di opportuni sistemi fotoprotettivi sia in grado sia di incrementare la fotostabilità dei farmaci che di ridurre l'estensione del danno da essi fotoindotto.

L'approccio sperimentale è stato basato sulla combinazione sinergica di tecniche spettroscopiche pulsate, indispensabili mezzi di indagine al fine di ottenere le duplici informazioni spettrali e temporali sugli intermedi di breve e lunga vita generati in seguito alla fotoeccitazione, con tecniche fotochimiche in stato stazionario quali spettroscopia di assorbimento e di emissione UV-VIS, di emissione in luce polarizzata e di dicroismo circolare.

La ricerca ha interessato farmaci appartenenti alle categorie dei fluorochinoloni antibatterici, antinfiammatori non steroidei, anticancerogeni e b-bloccanti.

Fluorochinoloni antibatterici

Una parte delle ricerche su questa importante classe di composti largamente usati come agenti antibatterici e altrettanto noti per indurre effetti di fotocarcinogenesi in seguito

all'assorbimento della luce è stata effettuata in collaborazione con l'Unità Operativa dell'Università di Pavia coordinata dal Prof. A. Albini ed è ha rappresentato il logico sviluppo del lavoro già oggetto dei due precedenti progetti.

La forte dipendenza della natura dei fotoprodotti, originati in seguito al non comune processo di fotodefluorurazione di lomefloxacin (LM) enoxacin (EN) e norfloxacin (NF) (Figura 1), dalla presenza di ioni inorganici come fosfato e solfito è stata correlata con l'effetto di tali agenti sugli intermedi di breve vita originati in seguito alla fotoeccitazione (1).

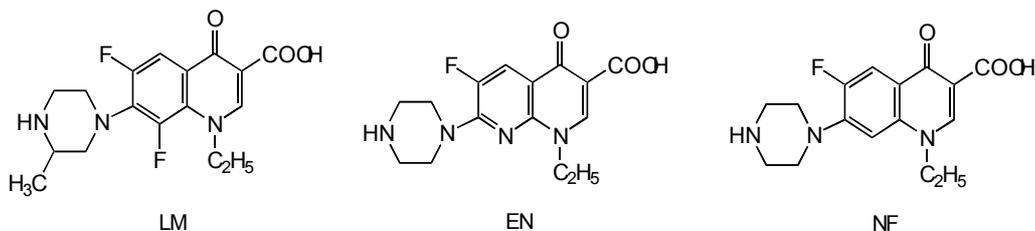


Figura 1. Formule di struttura di lomefloxacin (LM), enoxacin (EN) e norfloxacin (NF)

È stato evidenziato come tali ioni, solitamente “testimoni silenziosi” nei confronti degli eventi chimici innescati in seguito all'assorbimento fotonico, partecipano attivamente ai processi fotoindotti attraverso una serie di fenomeni di *quenching* statici e dinamici sui più bassi stati eccitati dei farmaci in oggetto. In particolare, è stato dimostrato che i processi di *quenching* statico sono dovuti alla formazione di complessi *ground-state* tra fosfato e l'anello piperazinico dei fluorochinoloni mediata da un'interazione di tipo elettrostatico (Figura 2).

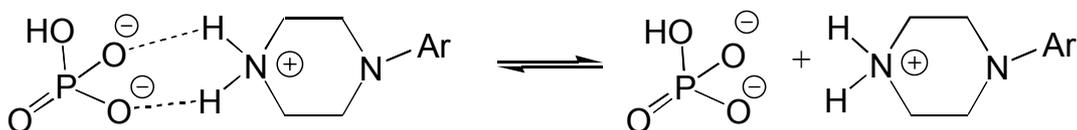
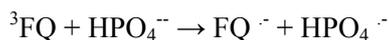


Figura 2. Rappresentazione schematica dei complessi *ground-state* tra fluorochinoloni e ioni fosfato

La formazione di tali complessi ha un notevole effetto sia sulle rese quantiche di fluorescenza che su quelle di tripletto. I processi di *quenching* dinamico sono invece dovuti ad inaspettate reazioni di trasferimento elettronico tra gli ioni inorganici, che si comportano da riducenti, e i più bassi stati eccitati di tripletto dei fluorochinoloni, che fungono da specie ossidanti:



L'efficienza di questi processi ha un ruolo chiave nel modulare il meccanismo di fotodefluorurazione da puramente ionico a puramente radicalico.

Esperimenti di spettroscopia laser risolta nel tempo hanno permesso di dimostrare direttamente sia l'esistenza di questi processi che di determinarne le costanti cinetiche bimolecolari. Un tipico esperimento di laser *flash photolysis* è mostrato in Figura 3 dove è possibile notare che, in presenza di ioni fosfato, al decadimento del tripletto dell'EN si accompagna la formazione del suo radicale anione in accordo con la reazione sopra riportata.

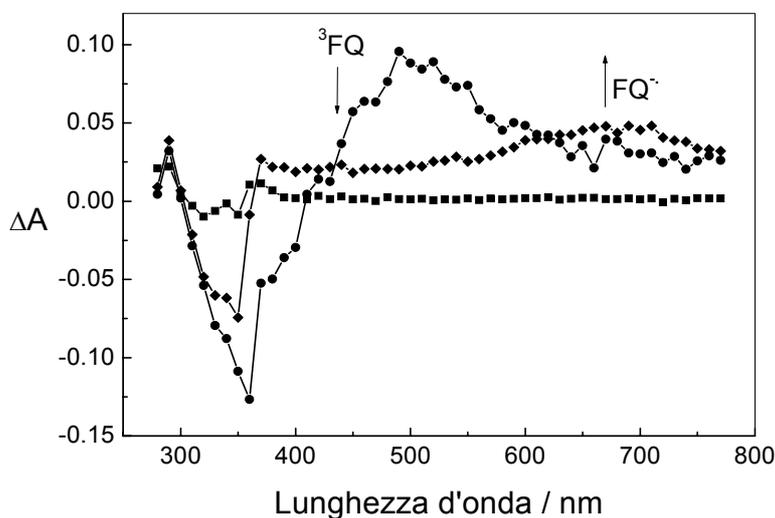


Figura 3. Spettri transienti ottenuti per eccitazione dell'EN in presenza di fosfato 10^{-2} M a differenti tempi di ritardo rispetto all'impulso di eccitazione

Grazie ad un lavoro sinergico fondato sulla caratterizzazione di fotoprodotto stabili (svolto presso l'Università di Pavia), degli stati eccitati di singoletto e di tripletto, dell'effetto degli ioni in questione sulla loro efficienza di formazione e di decadimento è stato possibile formulare un quadro generale relativo all'insieme dei fotoprocessi di LM, EN e NF dal quale emergono nuovi, inusuali e utili aspetti sia dal punto di vista strettamente fotochimico che puramente fotobiologico (vedi il lavoro di Fasani *et al.* in questo rapporto). La fotoreattività della LM è stata studiata in presenza di micelle anioniche di sodiododecilsolfato (SDS) come sistema biologico modello (2). È stato dimostrato che a pH fisiologico la forma prototropica dominante è quella cationica la quale si incorpora selettivamente ed efficacemente dentro la gabbia micellare come mostrato in Figura 4.

L'aggregato micellare ottenuto è caratterizzato da una notevole fotostabilità se confrontato con la molecola libera. La drastica riduzione della resa di fotodegradazione di circa 30 volte è strettamente correlabile alla formazione delle micelle di SDS. Tale significativa inibizione della fotoreattività può essere spiegata sulla base di:

- bassa polarità del mezzo micellare, la quale destabilizza lo stato eccitato a trasferimento di carica responsabile della fotodegradazione;
- alta viscosità del microintorno micellare, la quale ostacola la rotazione dell'anello piperazinico durante il tempo di vita dello stato eccitato;
- dimensioni relativamente ristrette della gabbia micellare, che influenzano il processo di fotodissociazione.

I risultati ottenuti sono generalizzabili anche ad altri fluorochinoloni caratterizzati da simile struttura molecolare, ma con differenti cammini di fotodegradazione, fornendo pertanto

indispensabili basi meccanicistiche per la preparazione di opportuni sistemi fotoprotettivi biocompatibili per questa classe di composti altamente fototossici.

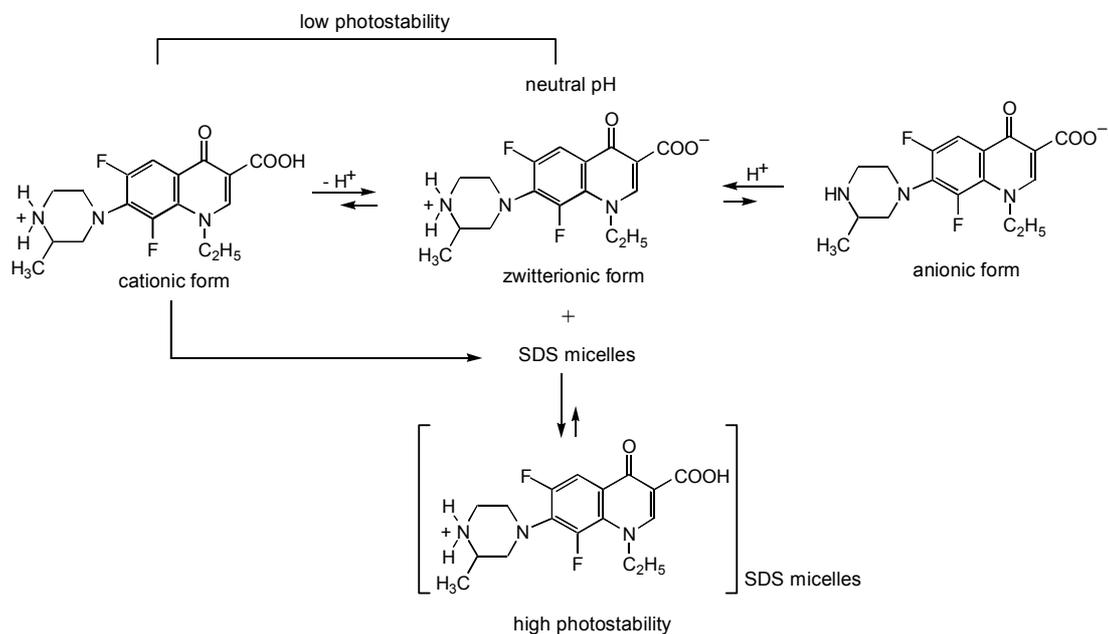


Figura 4. Equilibri prototropici della LM in assenza e in presenza di SDS a pH fisiologico

Sono stati caratterizzati i complessi di EN e LM con DNA (3) i quali mostrano un *binding mode* fortemente dipendente dalla forza ionica e un meccanismo di fotodefluorurazione intimamente connesso al tipo di complesso formato.

In particolare è stato riscontrato che a bassi valori di forza ionica i complessi sono di tipo intercalativo e coinvolgono prevalentemente la forma cationica dei due farmaci (*path a* Figura 5). Ad alti valori di forza ionica i complessi FQ DNA risultano essenzialmente di tipo superficiale coinvolgendo in modo dominante la forma zwitterionica di entrambi i composti (*path b* Figura 5).

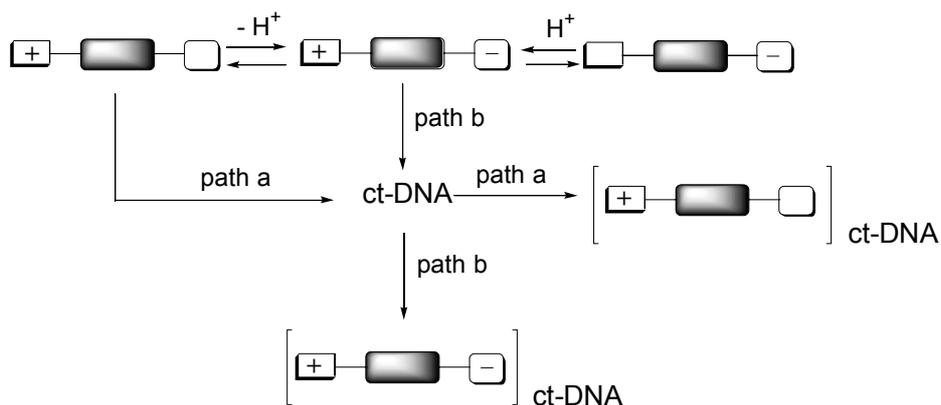


Figura 5. Rappresentazione schematica delle differenti forme prototropiche dei FQ in esame interagenti con il DNA a bassi (*path a*) e alti (*path b*) valori di forza ionica

La fotoreattività degli aggregati supramolecolari è notevolmente differente: il complesso LM-DNA è altamente fotoreattivo ed è caratterizzato da una reazione di fotodefluorurazione da singoletto con efficienza simile a quella del farmaco libero. Il complesso EN-DNA risulta invece fotochimicamente inerte; tale comportamento è razionalizzabile sulla base della marcata riduzione dell'efficienza di formazione dello stato di tripletto precursore della defluorurazione di EN. Lo studio condotto permette una più adeguata comprensione dei fenomeni legati all'attività fototossica e fotocarcinogenica indotta da fluorochinoloni.

Antinfiammatori non steroidei

I complessi di inclusione tra farmaci antinfiammatori fotosensibilizzanti caratterizzati da strutture cromoforiche di tipo benzotiofenico – suprofen (SP) e acido tiaprofenico (TA) (4) – e difenilico – diflunisal (DF) e fenbufen (FB) (5) –, con ciclodestrine sono stati studiati sia dal punto di vista della complessazione che della loro fotoreattività. I dati ottenuti hanno evidenziato il duplice ruolo giocato dalla cavità ciclodestrinica sia come sistema fotostabilizzante che come sistema biologico modello, in grado di mimare le interazioni deboli che possono instaurarsi tra i farmaci e siti idrofobici di biosubstrati. Metodi teorici semiempirici sono stati di aiuto nel correlare fotoreattività e struttura molecolare dei complessi *host-guest*.

L'inclusione del farmaco nella cavità del macrociclo induce effetti differenziati sulle proprietà fotochimiche. SP e TA sono caratterizzati da una più alta fotoreattività quando inclusi nella ciclodestrina; questo suggerisce che la loro compartimentalizzazione in sacche idrofobiche potrebbe dar luogo ad una maggior efficienza di fotodegradazione e di fotosensibilizzazione. L'FB viene invece fotostabilizzato dalla gabbia ciclodestrinica, a causa di un efficiente ricombinazione della coppia di radicali formati in seguito al processo di *alfa-cleavage* responsabile della formazione del principale fotoprodotto stabile. L'incorporazione del DF nella cavità ciclodestrinica non influenza l'efficienza del fotoprocesso primario di fotoionizzazione, osservato in soluzione omogenea, ma ha un marcato effetto sulla natura dei fotoprodotti stabili. Il principale fotoprodotto stabile, originato da una *cross-combination* di un fenossi radicale e un radicale sigma in soluzione acquosa, non si forma in presenza di ciclodestrina a causa della inclusione e reattività di questi radicali con il macrociclo. Due processi di tipo estrattivo dalla cavità portano infatti alla rigenerazione del composto di partenza e alla formazione di un nuovo fotoprodotto monofluorurato (Figura 6).

L'insieme delle indagini svolte su questa classe di composti, oltre che a fornire indicazioni utili al fine di correlare fotochimica e fototossicità, permettono di enfatizzare che non è possibile fare alcuna generalizzazione sull'utilizzo delle ciclodestrine come agenti fotostabilizzanti e che conseguentemente uno studio particolareggiato è necessario per ogni singolo farmaco.

La fotoreattività dell'FB è stata anche studiata in micelle anioniche e cationiche (6).

La fotodegradazione del farmaco è mediata da due stati di tripletto in equilibrio termico la cui differenza di popolazione influisce sia sulla resa di *alfa-cleavage* del composto che sulla sua capacità di agire come efficiente fotosensibilizzatore di ossigeno di singoletto (Figura 7).

La diversa efficienza e modo di compartimentalizzazione dell'FB nei mezzi micellari si riflette drasticamente sulle proprietà fotochimiche del farmaco.

È stato infatti riscontrato che la localizzazione dell'FB in zone a ridotta polarità nel caso di micelle cationiche comporta un maggior mescolamento dei due stati di tripletto con un aumento della resa di fotodecomposizione.

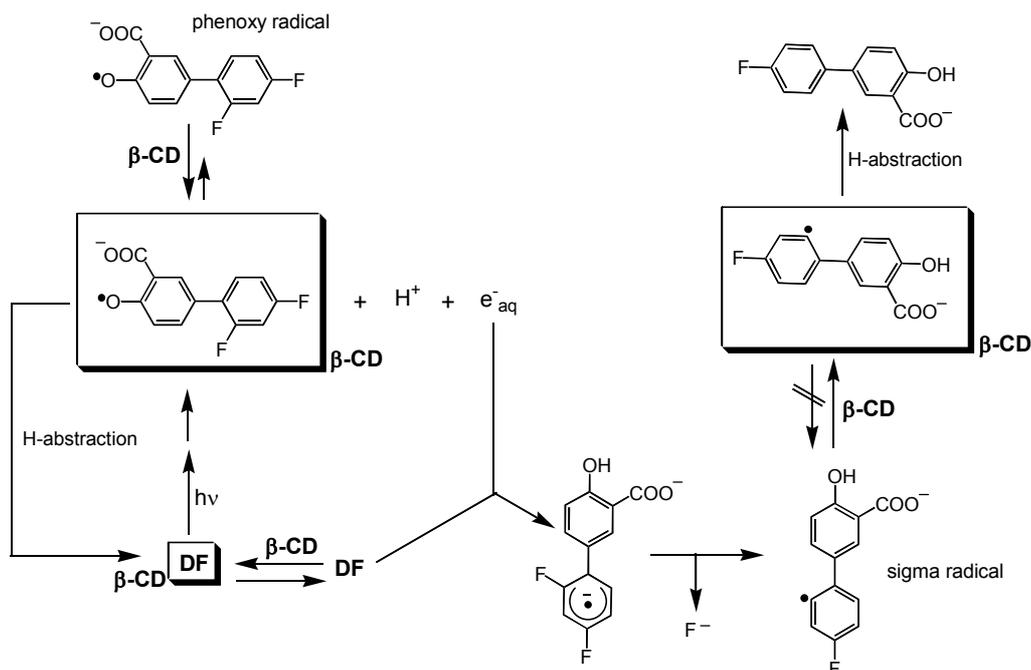


Figura 6. Meccanismo molecolare di fotodegradazione del DF in presenza di β -ciclodestrina (β -CD)

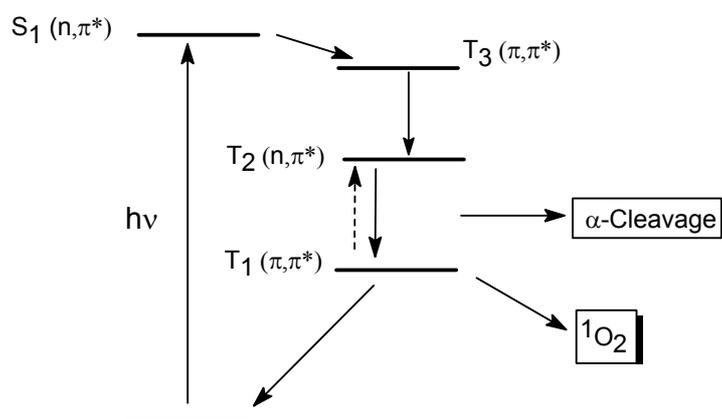


Figura 7. Rappresentazione schematica dei più bassi stati eccitati dell'FB

L'utilizzo di sistemi biocompatibili basati su network polimerici e idrogel si è rivelata una strategia adatta al fine di inibire l'efficienza dei processi di fotosensibilizzazione indotta da tolmetin (7) e DF (8) su membrane eritrocitarie. È stato riscontrato che le matrici impiegate riducono fortemente la velocità di fotoemolisi nel caso dei due farmaci. In particolare esse sono in grado di intrappolare il tolmetin e il DF, di rilasciarli in modo molto lento e di modificarne sensibilmente la loro fotoreattività attraverso la formazione di fotoaddotti covalenti farmaco-matrice. Alla luce dei risultati ottenuti, i sistemi utilizzati rappresentano buoni veicolanti biocompatibili per farmaci fototossici.

Anticancerogeni

Uno studio fotochimico sull'anticancerogeno flutamide (FM) è stato portato a termine in soluzione omogenea (9) e in presenza di ciclodestrine (9) e vescicole liposomiali (10,11). I risultati ottenuti hanno mostrato chiaramente l'importanza del microintorno molecolare nel modulare natura ed efficienza dei processi fotoindotti. La fotoreattività del farmaco in soluzione omogenea è caratterizzata da un fotoriarrangiamento nitro-nitrito innescato dalla geometria *twisted* del nitrogruppo della molecola dando luogo alla formazione del fenolo derivato 1 come principale fotoprodotto stabile (Figura 8).

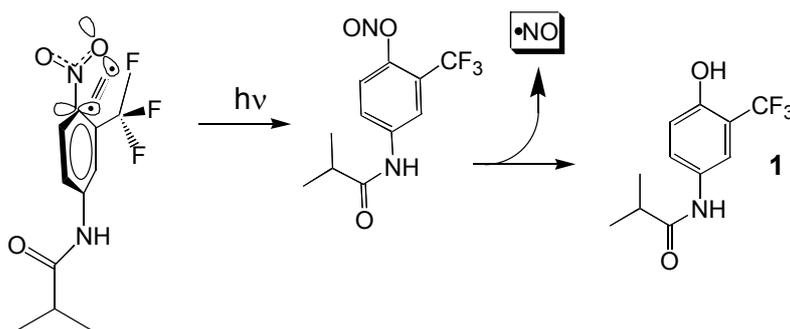


Figure 8. Meccanismo molecolare di fotodegradazione della FM in soluzione omogenea

L'incorporazione della FM in cavità ciclodestriniche porta non solo ad un aumento della fotodegradazione, ma anche a differenti prodotti di fotodecomposizione.

Tali effetti sono molto più marcati e selettivi quando il farmaco si trova intrappolato in vescicole liposomiali. Le differenti variazioni spettrali registrate in presenza e in assenza di vescicole rivelano il diverso comportamento della fotolisi del farmaco nei due ambienti (Figura 9).

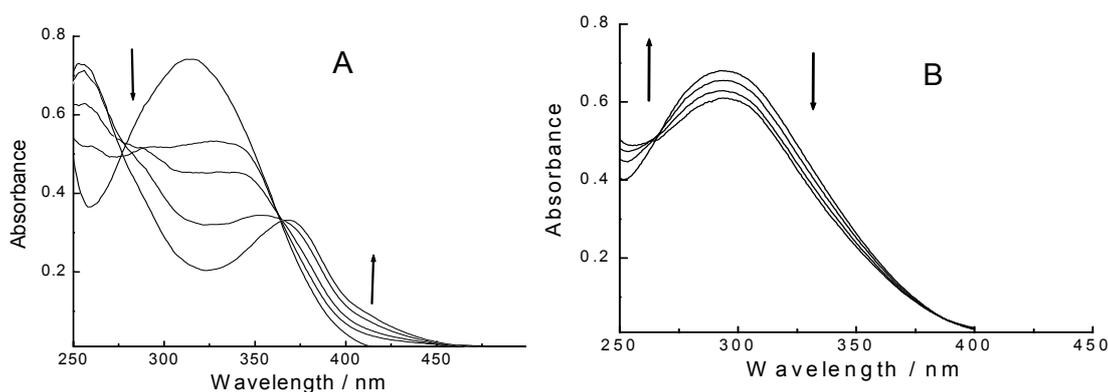


Figura 9. Fotolisi della FM in presenza (A) e in assenza (B) di vescicole liposomiali di fosfatidilcolina

La resa di fotodegradazione della FM nelle vescicole aumenta di circa 20 volte rispetto a quella in mezzo acquoso, la formazione del fotoprodotto 1 viene totalmente inibita e un nuovo canale di disattivazione fotochimica di tipo riduttivo viene innescato. Quest'ultimo processo porta alla formazione di due nuovi prodotti di reazione di cui uno è un prodotto di *photobinding* con le vescicole liposomiali (Figura 10). Questo nuovo e inaspettato fotocomportamento è attribuibile alla parziale planarizzazione del nitrogruppo della molecola dovuta a costrizioni steriche e interazioni specifiche dovute alla localizzazione del farmaco nella struttura ordinata del *bilayer* lipidico.

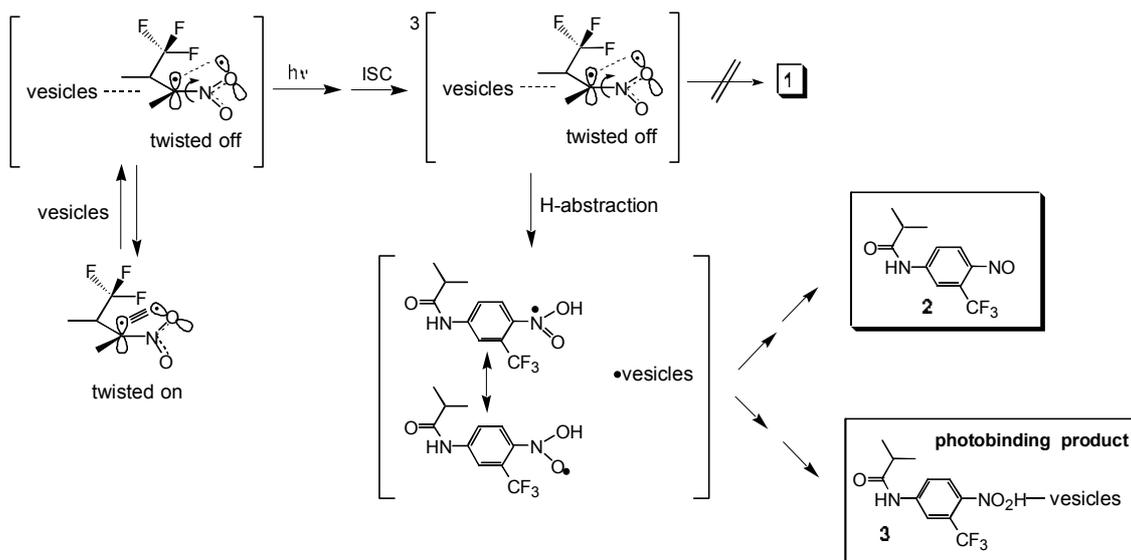


Figura 10. Meccanismo molecolare di fotodegradazione della FM in presenza di vescicole liposomiali

I risultati ottenuti danno utili informazioni per correlare adeguatamente la fotoreattività del farmaco con i fenomeni di fototossicità e fotoallergia da esso indotti.

β -bloccanti

Sono state studiate le proprietà fotofisiche e fotochimiche del propranololo (PR) che per irradiazione UVA induce emolisi di globuli rossi e cleavage del DNA (11).

Il farmaco si comporta da sensibilizzatore di ossigeno di singoletto. In un microintorno polare da luogo ad un processo di autofotoossidazione che genera un fotoprodotto con altissime potenzialità fotosensibilizzanti (Figura 11).

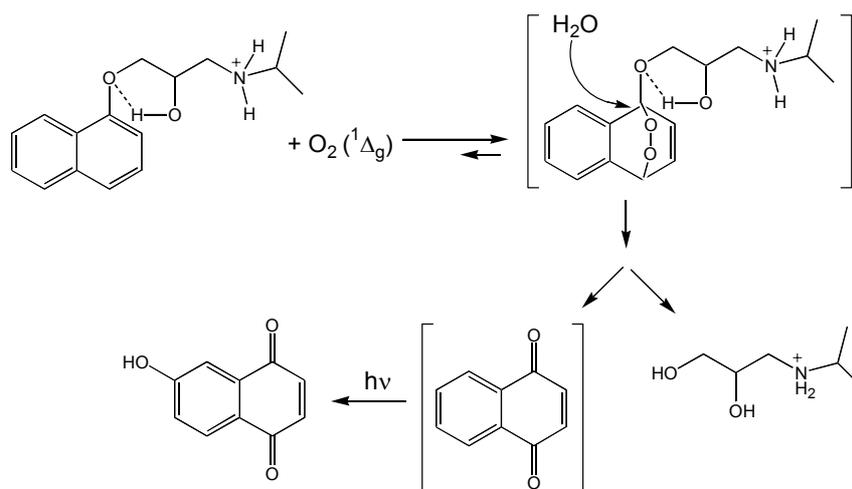


Figura 11. Meccanismo molecolare di fotodegradazione del PR

Alla luce dell'illelegale ma assai diffuso uso del propranololo come agente dopante in campo sportivo, i risultati ottenuti assumono particolare rilievo.

Bibliografia

1. Monti S, Sortino S, Fasani E, Albini A. Multifaceted photoreactivity of 6-fluoro-7-aminoquinolones from the lowest excited states in aqueous media: a study by nanosecond and picosecond spectroscopic techniques. *Chem Eur J* 2001;7:2185-96.
2. Sortino S, De Guidi G, Giuffrida S. Drastic photochemical stabilization of lomefloxacin through selective and efficient self-incorporation of its cationic form in anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles. *New J Chem* 2001;25:197-9.
3. Sortino S, Condorelli G. Complexes between fluoroquinolones and calf thymus DNA: binding mode and photochemical reactivity. *New J Chem* 2002;26:250-8.
4. Monti S, Encinas S, Lahoz A, Marconi G, Sortino S, Perez-Prieto J, Miranda MA. Structure and photochemical behavior of the cyclodextrin inclusion complexes of the benzoylthiophene-derived drugs tiaprofenic acid and suprofen. *Helvetica Chimica Acta* 2001;84:2452-66.
5. Sortino S, Giuffrida S, Fazio S, Monti S. Spectroscopic characterization and photochemical behavior of host-guest complexes between β -cyclodextrin and drugs containing a biphenyl-like chromophore. *New J Chem* 2001;25:707-13.
6. Sortino S, Martinez LJ, Marconi G. On the photophysical and photochemical behavior of fenbufen: a study in homogeneous media and micellar environments. *New J Chem* 2001;25:975-80.
7. Pitarresi G, Cavallaro G, Giammona G, De Guidi G, Salemi MG, Sortino S. New hydrogel matrices containing an anti-inflammatory agent. Evaluation of *in vitro* release and photoprotective activity. *Biomaterials* 2001: 1-14.
8. Pignatello R, Ferro M, De Guidi G, Salemi G, Vandelli MA, Puglisi G. Preparation, characterisation and photosensitivity studies of solid dispersions of Diflunisal and Eudragit RS100 and RL100. *Int J Pharm* 2001;218:27.

9. Sortino S, Giuffrida S, De Guidi G, Chillemi R, Petralia S, Marconi G, Condorelli G, Sciuto S. The photochemistry of flutamide and its inclusion complex with β -cyclodextrin. Dramatic effect of the microenvironment on the nature and on the efficiency of the photodegradation pathways. *Photochem Photobiol* 2001;73:6-13.
10. Sortino S, Marconi G, Condorelli G. New insight on the photoreactivity of the phototoxic anti-cancer flutamide: photochemical pathways selectively locked and unlocked by structural changes upon drug compartmentalization in phospholipid bilayer vesicles. *Chem Comm* 2001:1226-7.
11. Sortino S, Petralia S, Boscà F, Miranda MA. Irreversible photo-oxidation of propranolol triggered by self-photogenerated singlet molecular oxygen, *Photochem. Photobiol. Science* 2002;1:136-40.

FARMACI FOTOTOSSICI: STUDIO DELLE PROPRIETÀ FOTOTOSSICHE E DEL MECCANISMO D'AZIONE

Francesco Dall'Acqua, Daniela Vedaldi, Sergio Caffieri, Giorgia Miolo, Giampietro Viola,
Laura Levorato
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova, Padova

Sintesi dell'attività svolta e dei principali risultati

Un punto importante della ricerca di questo secondo anno di attività è stato quello di determinare il tipo e l'entità della fotodegradazione del farmaco e, dopo isolamento e caratterizzazione, il ruolo dei prodotti di fotodegradazione nell'attività fotosensibilizzante dei farmaci oggetto di studio.

La fotodegradazione di un farmaco, infatti, può comportare non solo la perdita dell'attività terapeutica, ma anche la formazione di fotoprodotto con tossicità diversa dal farmaco.

La fotodegradazione è stata seguita:

- a) in diversi solventi, in particolar modo in tampone fosfato (PBS, pH 7.4), solvente nel quale sono stati condotti gli studi di fototossicità, in modo tale da conoscere l'entità della fotodegradazione nell'ambiente più simile a quello fisiologico;
- b) nella forma farmaceutica, in modo tale da conoscere l'entità della fotodegradazione e il tipo di fotoprodotto che si possono formare se il farmaco viene esposto alla luce prima della sua assunzione o durante l'assunzione (ad es. per via topica).

Sono state perciò studiate le proprietà fotosensibilizzanti dei seguenti farmaci e di eventuali loro fotoprodotto: tioridazina, flufenazina, perfenazina (fenotiazine) fluvoxamina (antidepressivo) betametasona, triamcinolone, fluocinolone, flumetasone (glucocorticosteroidi), chinina, meflochina, cloroquina chinacrina, primachina e amodiachina (antimalarici), ofloxacina, levofloxacina moxifloxacina (fluorochinoloni).

Metodologie

Isolamento e caratterizzazione dei fotoprodotto

Ogni farmaco è stato irradiato con dosi di luce UVA (365 nm) e UVB (312 nm) tali da ottenere una resa elevata di fotodegradazione. Il solvente utilizzato (etanolo, metanolo, etanolo-acqua) durante l'irradiazione è stato scelto in base alla maggiore solubilità del farmaco.

Dopo l'irradiazione i fotoprodotto sono stati isolati mediante TLC (*Thin Layer Chromatography*) e caratterizzati mediante tecniche NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) e spettrometria di massa.

L'andamento e l'entità della fotodegradazione è stato inoltre seguito mediante spettrofotometria di assorbimento e HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

Determinazione delle proprietà fotosensibilizzanti *in vitro*

Ogni farmaco e i suoi fotoprodotto sono stati testati per stabilire le loro proprietà fotosensibilizzanti mediante i seguenti test:

- produzione di specie reattive dell'ossigeno: determinazione spettrofotometrica di ossigeno singoletto e anione superossido;
- emolisi di globuli rossi di topo albino in seguito a irradiazione UVA e UVB, mediante misure spettrofotometriche dei globuli rossi rimasti intatti; per comprendere il ruolo dell'ossigeno in queste reazioni, le irradiazioni sono state svolte in presenza e in assenza di ossigeno (ottenuta mediante aumenti di azoto o argon) e sono stati utilizzati *quencher* dell'ossigeno e *scavenger* di radicali (sodio azide, dimetiltiourea DMTU, superossidodismutasi SOD, terbutil-p-idrossianisolo BHA, catalasi);
- perossidazione dei lipidi di membrana, utilizzando come modello sperimentale l'acido linoleico, le membrane eritrocitarie e le cellule *in toto*;
- *cross-linking* di proteine di membrana (impiegando *ghost* di globuli rossi umani) determinando mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti il danno alla spettina eritrocitaria, e su proteine isolate modello (ribonucleasi A, albumina bovina);
- rotture singole e doppie e danni ossidativi al DNA, impiegando come modello sperimentale il plasmide pBR322, e determinando il tipo e l'entità delle rotture di catena indotte dal farmaco in seguito a irradiazione UVA e UVB mediante elettroforesi su gel di agarosio e quantificazione mediante analisi densitometrica;
- citotossicità su fibroblasti murini 3T3, impiegando l'MTT test per verificare la vitalità cellulare in seguito ad irradiazione UVA e UVB;
- localizzazione dei farmaci a livello subcellulare e misurazione del potenziale mitocondriale mediante microscopia ad epifluorescenza.

Risultati

Fenotiazine

Le proprietà fotosensibilizzanti di tre fenotiazine (perfenazina, tioridazina e flufenazina) sono state studiate negli anni precedenti e i risultati pubblicati nei *Rapporti ISTISAN 98/13 e 00/18* (1, 2).

Per quanto riguarda la loro fotodegradazione con luce UVA, della perfenazina sono stati isolati due fotoprodotto (FP), ottenuti irradiando il composto in due solventi diversi; in particolare, irradiando in etanolo:acqua, si è isolato un FP che deriva dalla dechlorurazione riduttiva in posizione 2 (PI), mentre irradiando in metanolo:acqua, si ottiene la sostituzione nucleofila del cloro con il metossile del solvente. Il PI è risultato poco tossico rispetto agli altri composti, sebbene riesca a indurre lisi totale dei globuli rossi aumentando la dose di irradiazione. Se, poi, esso viene incubato per 24 ore con i fibroblasti murini, la sua fotocitotossicità risulta superiore a quella del composto parente. Per la perfenazina, comunque, si può concludere che il contributo degli FP stabili sia inferiore rispetto alle altre fenotiazine studiate. La dechlorurazione, con conseguente formazione di un radicale intermedio promazinico, sembra invece l'ipotesi più concreta per spiegare la fotocitotossicità di questo farmaco.

La flufenazina si fotodegrada formando 2 fotoprodotti: il principale, ancora in corso di caratterizzazione, sembra comunque perdere il gruppo -CF₃ (FI), l'altro è un N-ossido esociclico (FII).

Il principale fotoprodotto della flufenazina ha dimostrato di essere più tossico del farmaco immodificato. La correlazione ottenuta dagli esperimenti di fotoemolisi, fotocitotossicità e legame con le proteine di membrana suggerisce che il target primario della flufenazina è la membrana cellulare.

Anche la tioridazina, infine, si fotodegrada formando due fotoprodotti principali, un solfossido endociclico (T2), e un N-ossido endociclico idrossilato in posizione 2 (T4), la cui struttura è riportata in Figura 1. Il più fototossico si è dimostrato il T4. Quest'ultimo, assieme al T2, è in grado di produrre rotture singole nel DNA plasmidico in seguito a irradiazione UVA.

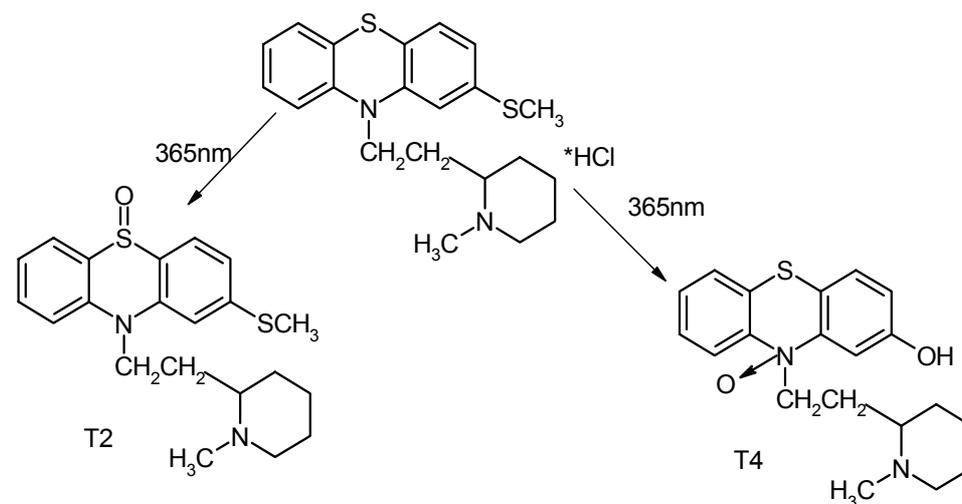


Figura 1. Fotodegradazione della tioridazina con luce UVA

In generale, dai risultati ottenuti è emerso che tutti i fotoprodotti delle fenotiazine studiate hanno un ruolo nell'effetto fototossico del farmaco parente. In particolare, essi hanno dimostrato di agire principalmente a livello della membrana plasmatica.

Inoltre, comparando la fototossicità dei diversi fotoprodotti, si può concludere che il sostituente in posizione 2 delle fenotiazine assume un ruolo importante non solo per l'attività farmacologica, ma anche in termini di fototossicità (3, 4).

Fluvoxamina

L'isomero in commercio di questo farmaco antidepressivo è il *trans* (E). Prendendo spunto dal fatto che alcuni antidepressivi triciclici precedentemente studiati hanno dimostrato proprietà fototossiche *in vitro* (5) è stata studiata la fototossicità di questo farmaco. Dai dati ottenuti, la fluvoxamina sembra non possedere proprietà fotosensibilizzanti. Tuttavia si degrada efficacemente quando irradiata in soluzione acquosa con luce UVA e UVB (60%), e il suo fotoprodotto principale è risultato l'isomero *cis* (Z) (Figura 2).

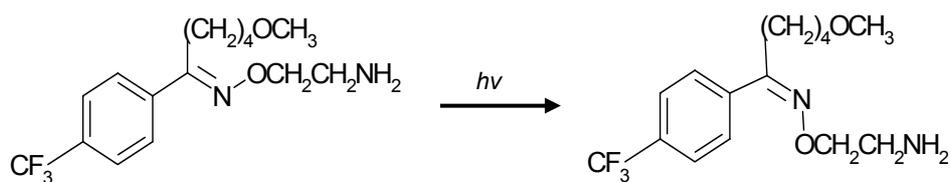


Figura 2. Isomerizzazione *trans-cis* della fluvoxamina indotta dalla luce

Questa fotoisomerizzazione è risultata importante nello studio del comportamento di questo farmaco alla luce dal momento che, mediante esperimenti di inibizione dell'*uptake* della 5-[3H]-HT in sinaptosomi di ratti, si è dimostrato che l'isomero *cis* perde l'attività farmacologica. La luce, dunque, è in grado di inattivare il farmaco (6-8).

Betametasona

Questo farmaco ha dimostrato discrete proprietà fotosensibilizzanti *in vitro*, provocando emolisi in presenza di luce UVA e UVB. La fototossicità si manifesta soprattutto a livello dei lipidi di membrana, sui quali provoca perossidazione. Non sembra, invece, danneggiare le proteine di membrana, né il DNA. La fotocitotossicità sui fibroblasti murini è modesta nelle condizioni sperimentali utilizzate e molto probabilmente le dosi di luce necessarie per manifestare la sua fototossicità anche *in vitro* sono superiori a quelle che si possono utilizzare nei nostri esperimenti, nei quali la dose di luce deve essere controllata per non indurre la morte cellulare con la sola irradiazione.

Il betametasona si degrada con luce UVA e UVB formando principalmente 4 fotoprodotti che sono stati isolati da una soluzione metanolica e caratterizzati:

- il B1, o lumiprodotto, deriva dal riarrangiamento dell'anello del cicloesadienone che si trasforma in biciclo[3.1.1]es-3-en-2-one;
- il B2 si forma in seguito a perdita dell'ossidrilico in 17;
- il B3 (fotolumiprodotto) deriva da un ulteriore riarrangiamento, in seguito ad assorbimento di luce, del lumiprodotto in un nuovo composto avente un anello a cinque atomi formato da un ponte a ossigeno tra il carbonio in posizione 1 e quello in 11;
- il B4 deriva dalla perdita del gruppo $-\text{COCH}_2\text{OH}$ e successiva formazione di un chetone in posizione 17 (4, 9).

Triamcinolone, fluocinolone e flumetasone

Sono state studiate le proprietà fototossiche di questi tre farmaci e dei loro fotoprodotti (isolati nel Dipartimento di Chimica Organica dell'Università di Pavia) e sono state determinate le rese di fotodegradazione nei diversi ambienti di reazione (solvente acquoso, organico, forma farmaceutica). Tutti e tre questi farmaci sono risultati più attivi alla luce UVB rispetto alla UVA.

Per quanto riguarda il triamcinolone, esso non sembra in grado di produrre specie reattive dell'ossigeno, tuttavia la presenza dell'ossigeno nell'ambiente di reazione ne condiziona l'attività fototossica. Infatti, l'emolisi indotta da questo farmaco è maggiore in ambiente deaerato, probabilmente perché alla base del suo effetto fotosensibilizzante vi è la produzione di

specie radicaliche che vengono ‘spente’ dall’ossigeno. A conferma di ciò vi è l’inibizione da parte del BHA (*scavenger* di radicali liberi) nell’attività fotoemolitica indotta dalla luce UVB (scissione omolitica di Norrish I al chetone in 17). Tale effetto è invece meno evidente quando si irradia con luce UVA dove la formazione di intermedi radicalici è inferiore (prevalenza della fotomodificazione all’anello del cicloesadienone) (10). Nel caso del fluocinolone, inoltre, nell’attività fotoemolitica ha un ruolo probabilmente anche l’ossigeno singoletto, di cui sembra un buon produttore.

In generale, il meccanismo d’azione attraverso cui i due corticosteroidi danneggiano la membrana cellulare sembra coinvolgere sia la perossidazione lipidica che il danno alle proteine di membrana. In quest’azione i fotoprodotto (in particolare il lumiprodotto e l’idroperossido) giocano un ruolo importante, soprattutto nel caso del derivato idroperossidico la cui azione tossica si manifesta anche al buio (emolisi). Il DNA non è invece un target coinvolto nella loro attività fotosensibilizzante.

Sia il triamcinolone che il fluocinolone e i loro fotoprodotto sono poco fototossici sulle cellule 3T3 alle dosi di luce consentite in questi esperimenti per evitare la morte delle cellule per la sola azione della luce (20 J/cm² UVA, 0,7 J/cm² UVB). Dei tre, il fluocinolone è il più citotossico (20-30% di morte cellulare).

Il flumetasone e i suoi fotoprodotto non hanno invece dimostrato proprietà fotosensibilizzanti di rilievo in nessuno degli esperimenti impiegati. Anche la sua stabilità alla luce è risultata superiore rispetto al triamcinolone e al fluocinolone.

Per quanto riguarda gli studi di fotostabilità, tutti e tre i corticosteroidi sono generalmente un po’ più stabili alla luce UVA, dove si formano principalmente il lumiprodotto e il fotolumiprodotto, rispetto alla luce UVB in cui si forma prevalentemente l’idroperossido (triamcinolone e fluocinolone) o il derivato con un gruppo chetonico in posizione 17 (flumetasone) (Tabella 1). In particolare, il triamcinolone è risultato il più fotoinstabile dei tre in soluzione acquosa (70 % con 30 J/cm² di luce UVA e totalmente con 5 J/cm² di luce UVB). In una crema, invece, la sua fotodegradazione è meno spiccata, ma raggiunge comunque il 25% con dosi elevate di luce UVB (20 J/cm²).

Tabella 1. Fotodegradazione dei corticosteroidi in PBS e nella forma farmaceutica

Corticosteroide		UVA		UVB	
		15 J/cm ² (%)	30 J/cm ² (%)	2,5 J/cm ² (%)	5 J/cm ² (%)
Triamcinolone	in PBS	47,7	68,9	nd	100
	crema	0	13,18	nd	8,50
Flumetasone	in PBS	14	22	nd	50
	gocce	0	0	0	0
Fluocinolone	in PBS	19,5	21,3	61,3	80,6
	lozione	21,1	24,7	48,6	50,0

nd: non determinato

Il fluocinolone presente nella forma farmaceutica di lozione si degrada fino al 50% in seguito ad irradiazione UVB e per un 25% con luce UVA. L’FP isolato mediante HPLC da questa preparazione è l’idroperossido, composto che ha dimostrato una notevole tossicità non solo alla luce ma anche al buio (emolisi). La fotodegradazione del fluocinolone è invece quasi nulla allo stato solido, mentre è molto elevata (80%) in soluzione acquosa con luce UV (11).

Antimalarici

Le proprietà fototossiche di farmaci antimalarici contenenti il nucleo chinolinico, sono state studiate utilizzando diversi modelli biologici.

Un primo approccio è stato condotto con esperimenti di fotoemolisi condotti su eritrociti murini, hanno dimostrato un effetto emolitico solo per chinina (Q) e meflochina (MQ), utilizzati alla concentrazione di 100 μM .

Lo studio della fototossicità *in vitro* degli antimalarici è stato condotto utilizzando una linea di fibroblasti murini (Balb/C 3T3). La meflochina è il composto più attivo, causa infatti alla dose di irradiazione di 0,36 J cm^{-2} una mortalità del 38%, pur essendo utilizzata ad una concentrazione 6 volte minore rispetto alle altre molecole (Figura 3). Anche chinina e chinacrina (QC) manifestano un effetto fototossico considerevole; minore, ma pur sempre significativo, quello di primachina (PQ) e cloroquina (CQ). Assolutamente inattiva si è invece rivelata l'amodiachina (AQ), in accordo con i dati di fotoemolisi (12).

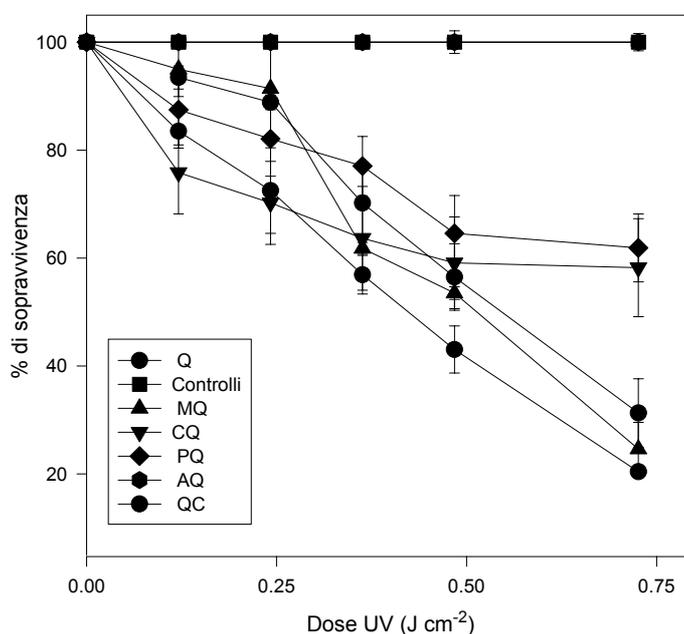


Figura 3. Fototossicità indotta da farmaci antimalarici in colture di fibroblasti murini (3T3)

Nello stesso modello cellulare abbiamo misurato l'entità della perossidazione lipidica sia all'interno delle cellule che nel *medium* dopo irradiazione UV in presenza degli antimalarici. È noto infatti che l'irradiazione UV attiva la fosfolipasi A2, enzima che idrolizza gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana in posizione 2. Di conseguenza i prodotti della perossidazione sono rilevabili anche nel surnatante.

In Figura 4 si può osservare come i tre composti (i tre più fototossici) inducono un elevato grado di perossidazione lipidica, sia a livello extracellulare, che, soprattutto, a livello intracellulare.

Questi esperimenti dimostrano un'ottima correlazione tra l'andamento della citotossicità e la perossidazione lipidica.

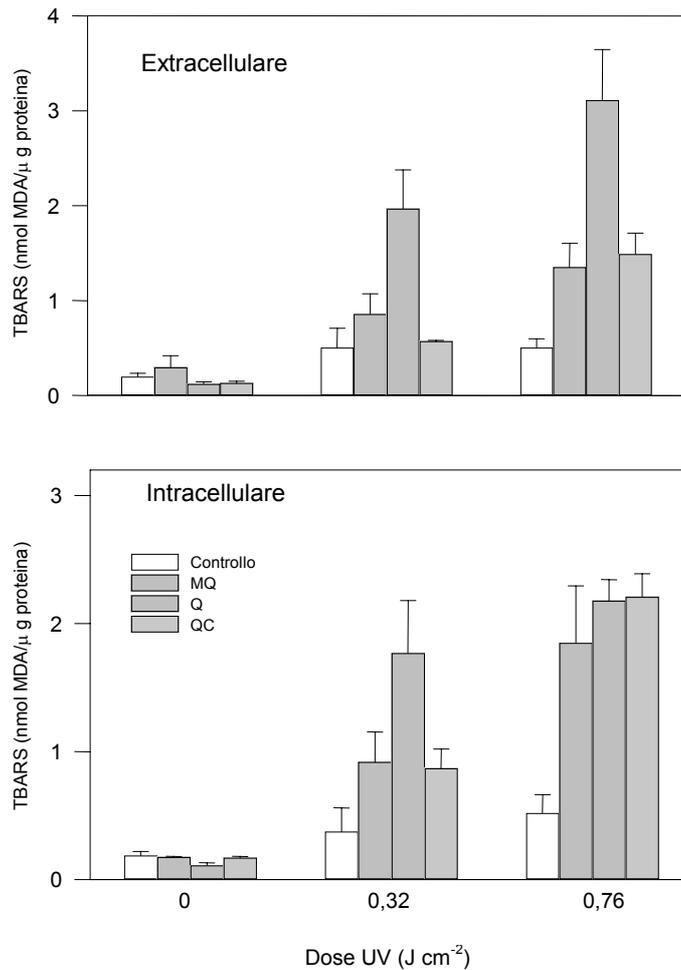


Figura 4. Lipoperossidazione indotta da farmaci antimalarici in colture di fibroblasti murini

Altro possibile target del danno prodotto da parte di sostanze fotosensibilizzanti è rappresentato dalle proteine che costituiscono le membrane cellulari. Come modello sperimentale di membrana sono state utilizzate membrane di globuli rossi umani (*ghost*), che dopo il trattamento vengono sottoposte a gel elettroforesi. I risultati ottenuti dimostrano che meflochina e chinina in ambiente aerobico, provocano la scomparsa del dimero della spettina e la formazione di una nuova banda, che corrisponde presumibilmente a polimeri di spettina formati via *cross-link*. Con lo scopo di evidenziare quali aminoacidi siano coinvolti nel processo di fotodanno alle proteine, le fotoreazioni sono state condotte in presenza di istidina (His), triptofano (Trp) e tirosina (Tyr). I due aminoacidi coinvolti maggiormente nel fotodanno proteico sono His e Trp. Lo studio del fotodanno al DNA da parte dei farmaci antimalarici è stato condotto utilizzando il plasmide pBR322 come modello sperimentale. Il plasmide irradiato è stato sottoposto a trattamento con due enzimi di riparazione del DNA, formamidopirimidin glicosilasi (Fpg) e endonucleasi III (Endo III) rispettivamente. Questi due enzimi mettono in evidenza eventuali danni ossidativi alle nucleobasi, Fpg in particolare alle purine mentre Endo III alle pirimidine. La meflochina, di per sé non produce danni immediati al DNA (*frank strand break*). Al contrario dopo trattamento con Fpg e Endo III è possibile evidenziare un

significativo aumento della forma II del DNA dose UV-dipendente. Questo risultato suggerisce che nell'azione di fotodanno al DNA la meflochina agisce danneggiando prevalentemente le nucleobasi senza attaccare direttamente il legame ribosio e fosfato. La chinina, invece, produce *frank strand break* probabilmente perché essa presenta un debole ma significativo legame al DNA. Dopo trattamento enzimatico si osserva un aumento del *cleavage* al DNA. Infine, la chinacrina sebbene si leghi al DNA attraverso intercalazione provoca solo un debole effetto sul DNA dopo irradiazione anche dopo trattamento enzimatico.

Fluorochinoloni

Sono state studiate le proprietà fotosensibilizzatrici di tre fluorochinoloni: ofloxacina (OFLX), il suo enantiomero attivo levofloxacina (LVFX), di potenza antibatterica doppia rispetto al racemo), e moxifloxacina (MXFX).

Nello studio di fotocitotossicità *in vitro* (365 nm) condotto su fibroblasti marini risulta che OFLX è il composto più attivo, mentre MXFX è il farmaco con fotossicità minore. In accordo con questi dati di fototossicità risultano anche gli studi di perossidazione sui *ghost*.

Per quanto riguarda il fotodanno al DNA, levofloxacina e ofloxacina risultano le molecole più attive: dopo 30 J/cm² d'irradiazione si ha una diminuzione di più del 15% della forma supercoiled dovuta ai *frank strand break*; ancora maggiori risultano poi i danni ossidativi, rivelati dopo trattamento enzimatico. La MXFX risulta scarsamente attiva (13).

Dal punto di vista clinico per tutti i farmaci sin qui studiati valgono le raccomandazioni di tenerli al riparo dalla luce, come pure di evitare l'esposizione alla luce dopo l'assunzione di tali farmaci al fine di prevenire fenomeni di fotosensibilizzazione cutanea o, come nel caso della fluvoxamina, perdita dell'attività farmacologica.

Bibliografia

1. Elisei F, Zatterini L, Aloisi GG, Mazzucato U, Viola GP, Miolo G, Vedaldi D, Dall'Acqua F. Excited state properties and *in vitro* phototoxicity studies of three phenothiazine derivatives, *Photochem Photobiol* 2002;75:11-21.
2. Miolo G, Vedaldi D, Caffieri S, Viola G, Dall'Acqua F. Photostability and photosensitizing properties of some CNS drugs. In: *27th Annual Meeting of the American Society for Photobiology*. July 10-15, 1999, Washington, DC.
3. Levorato L, Miolo G, Reddi E, Caffieri S. Capacità emolitica di fotoprodotti delle fenotiazine, Congresso Annuale della Società Italiana di Fotobiologia, Pisa, 24-26 maggio 2001.
4. Levorato L. *Ruolo dei prodotti di fotodegradazione nell'azione tossica di farmaci fotosensibilizzanti*. [Tesi di Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche]. Padova: Università di Padova; 2001.
5. Viola G, Miolo G, Vedaldi D, Dall'Acqua F. *In vitro* studies of the phototoxic potential of the antidepressant drugs Amitriptyline and Imipramine. *Il Farmaco* 2000;55:211-8.
6. Miolo G, Caffieri S, Levorato L, Vedaldi D, Dall'Acqua F, Giusti P. Fotoisomerizzazione della E-fluvoxamina con perdita dell'attività di reuptake della 5-idrossitriptamina, XX Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana, Rimini, 4-9 giugno 2000.
7. Miolo G, Caffieri S, Levorato L, Vedaldi D, Dall'Acqua F, Giusti P. E-fluvoxamine photoisomerization and loss of 5-hydroxytryptamine reuptake activity, Rencontres Franco-Italiennes de la Societe Francaise de Photobiologie, 26-27 mai 2000, Aix Les Bains, Savoie, France.

8. Miolo G, Caffieri S, Lavorato L, Imbevi M, Giusti P, Uz T, Manev R, Manev H. Photoisomerization of fluvoxamin generates an isomer that has reduced activity on the 5-HT transporter and does not affect cell proliferation. *Eur J Pharmacol* 2002;450:223-9.
9. Narsi L. *Studio della fototossicità e fotosensibilità in vitro di betametasona e captopril*. [Tesi di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia]. Padova: Università di Padova; 2000.
10. Meneghel L. *Studio in vitro della fototossicità del triamcinolone e dei suoi fotoprodotto*. [Tesi di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia]. Padova: Università di Padova; 2001.
11. Voltan A. *Fotolisi e proprietà fototossiche del fluocinolone e dei suoi fotoprodotto*. [Tesi di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia]. Padova: Università di Padova; 2001.
12. De Simone C. *Studio di fototossicità in vitro di farmaci antimalarici*. [Tesi di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia]. Padova: Università di Padova; 2001.
13. Zucchetto E. *Studio di fototossicità in vitro di nuovi fluorochinoloni*. [Tesi di Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia]. Padova: Università di Padova; 2001.

STUDI DI PARAMETRI MOLECOLARI E CELLULARI CHE REGOLANO L'AZIONE FOTOTOSSICA DI FLUOROCHINOLONI

Orazio Sapora (a), Antonella Maggi (a), Gina La Sala (a), Chiara Proietti Pannunzi (a), Ewa Krasnowska (b), Tiziana Parasassi (b)

(a) *Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche Roma, Roma*

Sintesi dell'attività svolta e dei principali risultati

La ricerca, si è svolta nell'arco di sei anni, in tre frazioni di tempo, e aveva come scopo lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari che governano l'effetto fototossico di una classe di antibiotici, i fluorochinoloni (FQ). Si articola su un approccio sequenziale che combina l'impiego di colture di cellule umane in vitro, con *end-point* biologici, come la citotossicità, e la produzione di danni in strutture biologicamente rilevanti, come il complesso delle membrane e il DNA.

Nel primo periodo (1) sono state messe a punto le tecniche necessarie allo svolgimento del programma. A livello cellulare sono stati studiati essenzialmente gli effetti prodotti dal solo agente fisico. È stata caratterizzata la fotosensibilità dei due sistemi cellulari umani impiegati in funzione della lunghezza d'onda della radiazione ultravioletta (UVR), valutando l'effetto citotossico e i meccanismi molecolari che regolano le alterazioni prodotte sulla struttura delle membrane biologiche. Inoltre in questa prima fase è stato valutato l'effetto citotossico intrinseco di differenti fluorochinoloni. Solo due, l'ofloxacina (OFLX) e la lomefloxacina (LFLX), sono stati impiegati in maniera sistematica negli studi che seguono.

Nel secondo periodo sono stati studiati i meccanismi dell'azione fotosensibilizzante dei due fluorochinoloni presi in esame, correlando tra loro, nello stesso campo di dose, l'effetto citotossico, il *recovery* cellulare e il danno sulle membrane in funzione dei differenti protocolli di esposizione (2).

Nel presente rapporto saranno discussi i risultati ottenuti studiando, mediante la tecnica del *Comet Assay*, il danno prodotto sul DNA in cellule trattate nelle stesse condizioni e nello stesso campo di dose degli esperimenti precedentemente riportati. Saranno inoltre discussi i risultati ottenuti dopo trattamento combinato farmaco luce sulle membrane cellulari.

Materiali e metodi

La dosimetria, le condizioni di crescita delle linee cellulari umane impiegate e la tecnica di polarizzazione generalizzata (*Generalized Polarization, GP*), sono state dettagliatamente descritte nel precedente rapporto (2).

Nel presente rapporto sono descritte la tecnica del *Comet Assay* e quella impiegata per la misura dei radicali OH prodotti dall'interazione farmaco luce.

Modalità di esposizione

Le *modalità di esposizione* sono: (i) la sospensione cellulare è irradiata in assenza di farmaco, (ii) il farmaco è aggiunto immediatamente prima dell'esposizione, (iii) le cellule in terreno di crescita, più il farmaco, sono incubate per due ore a 37 °C, centrifugate, lavate per rimuovere il farmaco presente nel terreno e immediatamente esposte a UVR. Tutti i trattamenti farmaco luce sono stati condotti con cellule sospese in PBS (*Phosphate Buffer Solution*) e a temperatura ambiente.

Comet Assay

Questa tecnica chiamata anche *single cell electrophoresis* si basa sull'evidenza sperimentale che il DNA contenuto in un nucleo privo di istoni, se sottoposto ad un campo elettrico, tende a migrare fuori dal nucleo formando una caratteristica coda. Più il DNA è danneggiato più lunga ed evidente è la coda. L'elettroforesi può essere eseguita in due modalità, a pH alcalino o a pH neutro. Nel primo caso si misurano le singole rotture (*single strand break*, ssb) sulla catena del DNA mentre nel secondo caso le doppie rotture (dsb). Le cellule subito dopo il trattamento sono centrifugate, lavate due volte in PBS freddo, risospese in PBS alla concentrazione di 1×10^5 cellule/ml e unite ad un eguale volume di *Low Melting Agarose* (1,4%) tenuto a 37 °C. Immediatamente 0,05 ml di tale sospensione sono posti nelle cellette elettroforetiche (Trevigen Ltd) e stratificati ponendovi sopra un vetrino coprioggetti. Il vetrino con le cellette è posto in ghiaccio per permettere la solidificazione dell'agarosio. Successivamente le cellule vengono lisate (Sarkosyl 1%, Triton 0,01%, Tris 0,01 M, EDTA 0,1 M, pH 10) per 30 minuti in ghiaccio. La procedura, fino a questo punto, è simile per ambedue i protocolli neutro e alcalino. Per il *Comet* alcalino i vetrini sono posti nella cella elettroforetica in tampone di corsa (NaOH 0,2 M, Glicina 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 13). Dopo 90 minuti di incubazione, per permettere la denaturazione del DNA, sono sottoposti ad elettroforesi per 30 minuti a 1 voltV/cm. Al termine i vetrini sono lavati e colorati con il colorante fluorescente *green II* (Molecular Probes) per evidenziare il DNA. L'analisi delle comete è effettuato mediante microscopio a epi-fluorescenza, telecamera e apposito programma per la cattura e le analisi delle immagini acquisite.

La misura del danno è espressa come momento della coda della cometa (*Tail Moment*, TM) ed è definito come il prodotto della lunghezza della coda per la sua intensità di fluorescenza.

Esperimenti di riparazione

Immediatamente dopo il trattamento le cellule sono centrifugate, lavate e risospese in terreno di crescita caldo e incubate per tempi differenti a 37 °C. Al termine dell'incubazione un'aliquota della sospensione è prelevata, messa in ghiaccio e trattata per la determinazione del danno sul DNA.

Valutazione dei radicali OH

La produzione di radicali ossidrilici è stata valutata con una tecnica di fluorescenza basata sull'impiego di cumarina (3). L'OH prodotto reagisce con la cumarina producendo la 7-OH-cumarina che è fluorescente ed è commercialmente disponibile come prodotto puro. Questo rende possibile una valutazione quantitativa della reazione tra l'FQ e la luce. Sperimentalmente si procede come segue: 3 ml di FQ (10 µg/ml di PBS), in presenza di 1×10^{-4} M cumarina, sono stati esposti a differenti dosi di UVR a 330 nm. Gli spettri di emissione di fluorescenza sono

ottenuti impiegando uno spettrofluorimetro Fluorolog 3 con l'eccitazione fissata a 400 nm e l'emissione variabile tra i 420 e i 550 nm.

Valutazione del danno sulle membrane cellulari: le cellule sono lavate, contate e risospese in tampone fosfato ed esposte in presenza o in assenza di FQ a UVR di 330 nm per tempi differenti. Immediatamente dopo il trattamento le cellule sono lavate con PBS, risospese alla concentrazione desiderata e marcate come già riportato (2).

Risultati

Le due linee cellulari impiegate possiedono differenti sensibilità al danno ossidativo e al danno introdotto da UVR nel campo dell'UVA. Le HL60 sono circa due volte più sensibili delle K562. È accettato che nel campo del UVA il danno di tipo ossidativo prevale su quelli tipici dell'UVB, il dimero di timina e il fotoprodotto. Per questi ultimi danni il rapporto tra quelli prodotti a 330 nm e quelli prodotti a 260-280 nm è di circa 1:100.000.

In Figura 1 sono riportati i risultati ottenuti esponendo le due linee cellulari ad una dose di 2 kJ/m² in assenza e in presenza di FQ. Per ogni singolo esperimento sono stati utilizzati un controllo negativo, con cellule non trattate con FQ e mantenute al buio e uno positivo, costituito da un'aliquota di cellule irradiata con una dose di 4 Gy di raggi gamma.

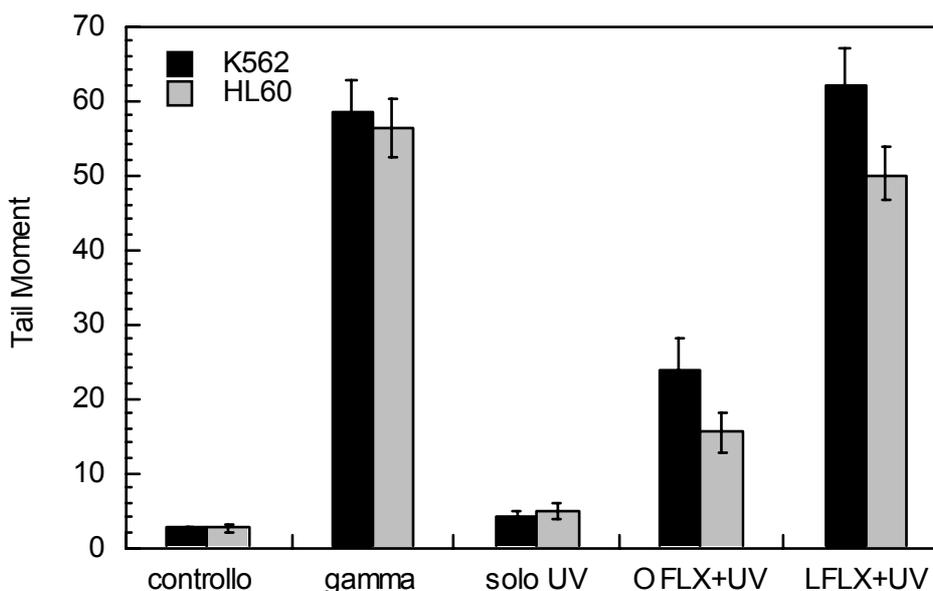


Figura 1. TM della cometa per cellule HL60 e K562 trattate con 4 Gy di raggi gamma, 2 kJ/m² di UVA a 330 nm, 2 kJ/m² di UVA a 330 nm in presenza di LFLX o OFLX

Come si può notare la sola dose di 2 kJ/m² non produce un significativo aumento della coda delle comete, al contrario quando l'esposizione avviene in presenza di FQ, si ha un forte aumento del TM. La LFLX mostra un maggiore effetto rispetto alla OFLX. Inoltre il DNA delle K562 appare più sensibile all'azione combinata UVA-FQ.

È riportato in letteratura che i fluorochinoloni hanno la capacità di produrre in combinazione con UVA specie reattive dell'ossigeno (4).

Tra questi il radicale ossidrilico (OH°) è estremamente reattivo nei confronti di tutte le macromolecole biologiche incluso il DNA su cui produce eventi singoli, come singole rotture e singoli danni alle basi. Mediante una tecnica di fluorescenza è stata valutata, *in vitro*, la produzione di radicali OH° nel trattamento combinato UVA-FQ.

In Figura 2 (b) sono riportati i risultati ottenuti. Nella stessa Figura 2 (a) è riportata la curva di taratura ottenuta con 7-OH-cumarina. La 7-OH-cumarina è stata impiegata sia per determinare, mediante la curva standard, la concentrazione di quella formata sia per interazione tra FQ e UVA sia per una corretta identificazione del prodotto tramite il caratteristico spettro di emissione.

Dai risultati ottenuti si nota che la LFLX produce una quantità di OH° circa 5 volte maggiore della OFLX. Questo giustifica, ma solo in parte, la maggiore efficacia della LFLX nel produrre singole rotture sul DNA cellulare. Infatti il rapporto tra LFLX/OFLX nella produzione di ssb ha solo un valore di 2,5. Dalla Figura 2 è possibile calcolare le concentrazioni di OH° , prodotte nelle condizioni riportate, per unità di dose che sono di $1,58 \times 10^{-9}$ M e di $7,6 \times 10^{-9}$ M rispettivamente per OFLX e LFLX.

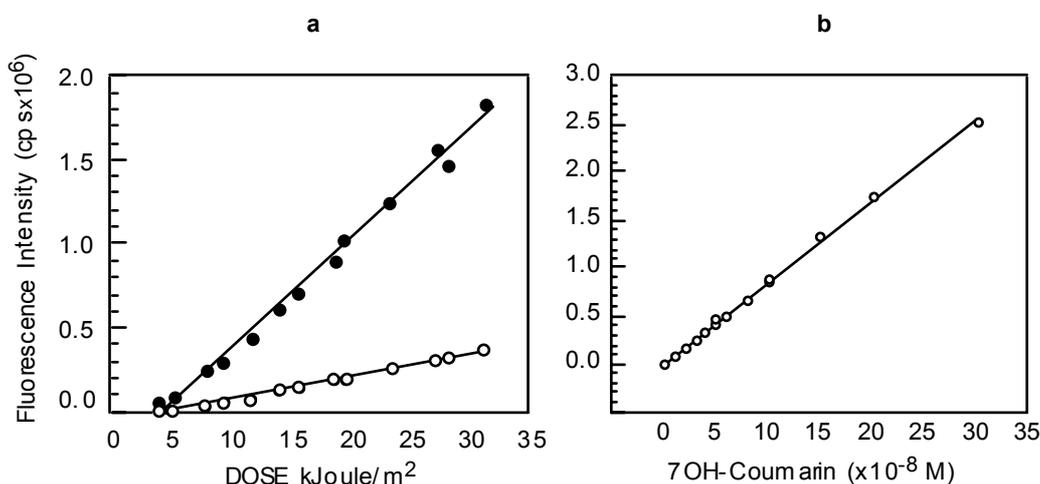


Figura 2. LFLX o OFLX esposti a UVA di 330 nm in presenza di cumarina:
(a) intensità di fluorescenza a 468nm in funzione della dose;
(b) o in funzione della concentrazione di 7OH-cumarina

I danni di tipo ossidativo sul DNA possono essere facilmente ed efficacemente rimossi dai sistemi di riparazione che la cellula possiede.

In Figura 3 sono riportati i dati relativi a cellule HL60 messe in condizione di riparare i danni prodotti dal trattamento combinato UVA+FQ o dalle radiazioni ionizzanti.

Dopo 30 minuti di riparazione il TM è simile a quello riportato per i controlli non trattati, indicando una rapida e completa riparazione del danno prodotto. Risultati simili, non riportati, sono stati ottenuti anche con le cellule K562.

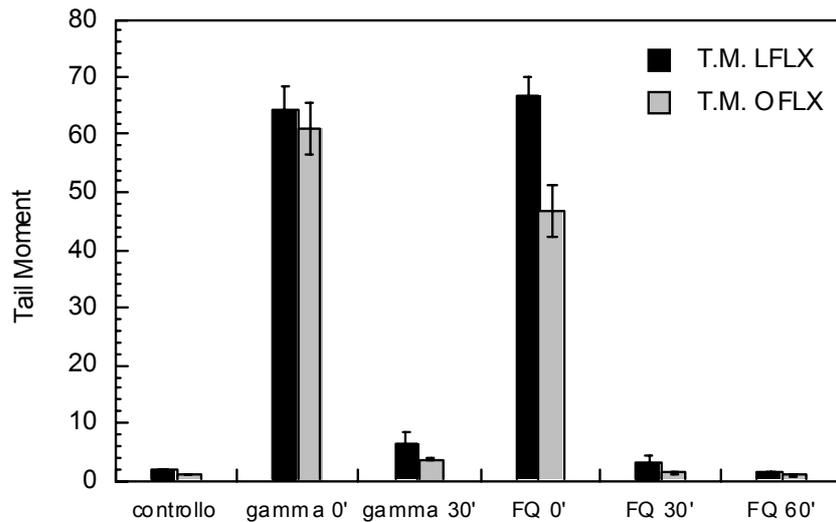


Figura 3. Riparazione del danno sul DNA di cellule HL60 trattate con 4 Gy di raggi gamma o esposte a 330 nm in presenza di FQ

Nel secondo rapporto è stato mostrato che la rimozione dei due FQ impiegati, dopo 2 ore di incubazione a 37°C e immediatamente prima del trattamento con UVA, non modificava l'estensione dell'effetto fotosensibilizzante (2, 5). In figura 4 sono riportati i valori di TM per cellule preincubate con FQ ed esposte a UVA immediatamente dopo la sua rimozione. Come si può osservare si ha praticamente la scomparsa dell'effetto fotosensibilizzante sul DNA cellulare. Solo nel caso delle K562 si nota un marginale danno residuo. Occorre notare inoltre che la sola preincubazione al buio in presenza di FQ non produce alcuna variazione di TM.

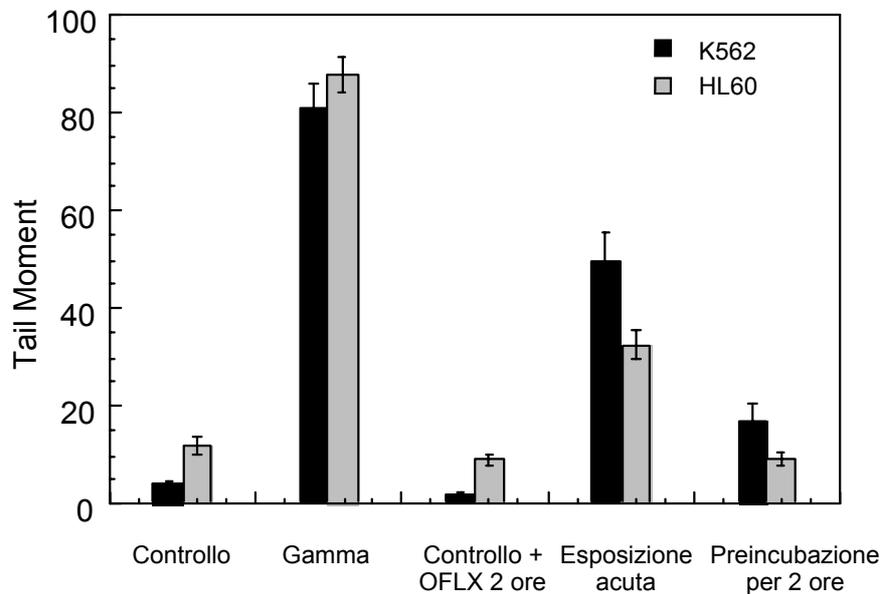


Figura 4. Danno sul DNA in cellule HL60 e K562 pre-incubate per 2 ore con OFLX ed esposte ad una dose di 2 kJoule/m² a 330 nm in assenza di FQ

Al contrario di quando accade per il DNA la preincubazione produce alterazioni relativamente stabili sul complesso delle membrane cellulari, e tali alterazioni persistono per almeno due ore dopo la rimozione del FQ (5). Per questo motivo cellule K562 sono state irradiate con UVA in presenza e in assenza di OFLX. I relativi risultati sono mostrati in Figura 5, in cui i valori normalizzati della GP di emissione sono riportati in funzione della dose. La curva relativa alle cellule esposte a UVA in assenza di FQ mostra un andamento variabile. Infatti ad un primo aumento di GP a basse dosi, segue una progressiva diminuzione al crescere della dose.

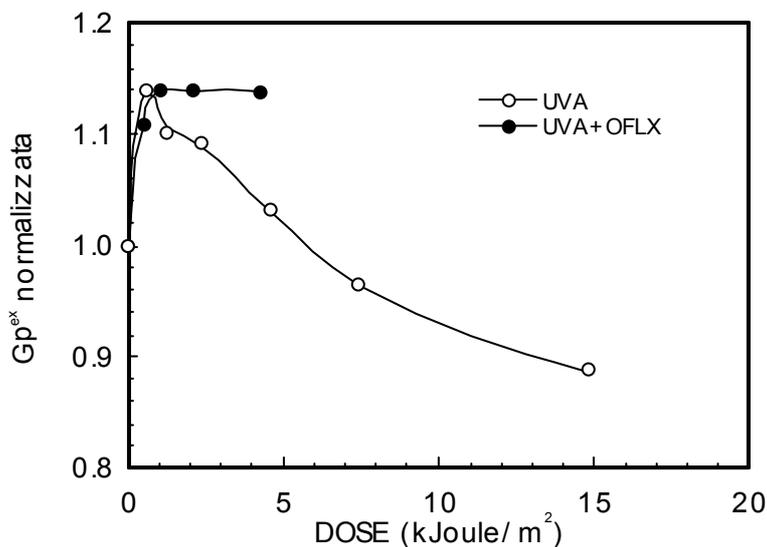


Figura 5: Valori di GP di emissione in funzione della dose di UVA (330 nm) in cellule K562 in presenza o in assenza di OFLX

Al contrario in cellule esposte in presenza di FQ dopo l'aumento iniziale il valore si stabilizza non mostrando alcuna diminuzione. Non è possibile in questo caso esporre le cellule a dosi più alte di 5 kJ/m² a causa di una progressiva lisi cellulare che aumenta in funzione della dose (5). Questo fenomeno è presente anche in cellule preincubate.

Discussione

Le due linee cellulari hanno una differente sensibilità al danno ossidativo (6). La sensibilità delle HL60, sia a UVA che a radiazioni ionizzanti a basso trasferimento lineare di energia, è maggiore di quella delle K562. Impiegando tecniche di fluorescenza statiche e dinamiche è stato inoltre dimostrato che le HL60 sono anche più sensibili al danno ossidativo sulle membrane e che tale sensibilità diminuisce con l'età della cellula (6, 7). L'effetto fototossico valutato con la sopravvivenza cellulare tuttavia è simile nelle due linee cellulari (2) e tale effetto permane anche dopo la rimozione del farmaco. Un ulteriore dato da prendere in considerazione è quello relativo all'alterazione relativamente stabile nel tempo, introdotta dai fluorochinoloni, nell'organizzazione delle membrane cellulari. Sulla base di questi dati, unitamente a quelli ottenuti sul *recovery* cellulare, si è proposto che le membrane cellulari siano il bersaglio più importante nei processi di foto-sensibilizzazione legati all'impiego di queste sostanze.

È opinione corrente che il danno sul DNA, data la sua struttura e la sua funzione, rivesta una particolare importanza nei processi di sensibilizzazione legati al danno ossidativo. Per questo motivo si è ritenuto opportuno studiare, nelle condizioni di trattamento riportate, l'induzione e la riparazione del danno sul DNA cellulare. L'importanza dei danni di tipo ossidativo è sottolineata dalla presenza nella cellula di differenti sistemi passivi e attivi di protezione tra cui la rimozione enzimatica del danno stesso.

I risultati ottenuti mostrano che, a parità di dose, la LFLX è circa 2,5 volte più efficace della OFLX nel produrre danno sul DNA, sebbene risulti 5 volte più efficace nella produzione di OH°. Questa discrepanza è maggiormente evidenziata se si considera che l'effetto fototossico prodotto dai due fluorochinoloni è simile su ambedue le linee cellulari (5). Inoltre il danno sul DNA viene non solo rapidamente ma anche efficacemente riparato. Infatti la dose di 2 kJ/m² è da considerarsi subletale. A tale dose infatti la sopravvivenza è maggiore dell'80% per le HL60 ed è pari al 100% per le K562. In cellule trattate con radiazioni ionizzanti le sbb prodotte vengono anch'esse riparate rapidamente, tuttavia la sopravvivenza è di solo il 10%. Ciò è dovuto al fatto che le radiazioni ionizzanti producono sulla molecola del DNA, oltre ad eventi singoli legati al danno ossidativo, anche altri tipi di danni, come le doppie rotture e i *cross-link*, legati ad eventi di deposizione diretta di energia. Questi ultimi danni possono essere considerati come letali poichè alterano la continuità della molecola del DNA e la sua corretta riparazione. Questa differenza tra i due tipi di trattamento dimostra che: (i) il trattamento FQ-UVA produce essenzialmente eventi singoli legati alla produzione di OH°; (ii) i danni sul DNA non sono direttamente correlabili con i fenomeni di fototossicità; (iii) sono da considerarsi secondari rispetto ai danni prodotti su altre strutture cellulari. I risultati ottenuti con cellule preincubate confermano queste evidenze. Infatti la rimozione del FQ prima dell'esposizione a UVA rimuove anche il danno sul DNA senza alterare l'effetto fototossico. È necessario comunque sottolineare che le dosi impiegate sono relativamente basse e che a dosi più alte, se la distribuzione del danno prodotto non è casuale, si potrebbero avere fenomeni di interazioni tra danni singoli. Inoltre i due FQ, data la loro struttura e il loro coefficiente di ripartizione, possono avere differente accessibilità alla molecola del DNA, la cui struttura non è uniforme, e quindi differente concentrazione sul target cellulare. Quest'ultimo fatto può eventualmente spiegare la differenza tra la produzione di OH° e il danno sul DNA.

Un possibile target per i FQ, a causa della loro natura chimica, può essere il complesso delle membrane cellulari. Per questo motivo la più probabile localizzazione del farmaco dopo la sua rimozione è il doppio strato lipidico. A sostegno di questa ipotesi vi sono le seguenti evidenze sperimentali: (i) il valore di GP di emissione aumenta in funzione della concentrazione di FQ e del tempo di trattamento; (ii) tale aumento permane anche dopo la rimozione del farmaco stesso (5); (iii) data la fluorescenza intrinseca di questi composti, è possibile rilevarne la permanenza e la localizzazione all'interno della cellula anche dopo 12 ore dalla rimozione (8).

Secondo Sortino *et al.* (9) gli intermedi reattivi coinvolti nei processi di fotosensibilizzazione sono il radicale ossidrilico e un carbene aromatico, il primo responsabile del danno alle membrane mentre il secondo del danno al DNA. Il danno sulle membrane è inoltre dipendente dalla concentrazione di ossigeno presente, mentre la formazione di un addotto si ha soprattutto in condizioni ipossiche o anossiche. I nostri risultati concordano con tale ipotesi, infatti non si ha evidenza di formazioni di altri tipi di danno sul DNA se non ssb e il trattamento combinato in assenza di ossigeno non produce alcun cambiamento nei valori di GP della membrana (5). In presenza di ossigeno le cellule trattate con solo UVA dopo un iniziale aumento dei valori di GP di membrana mostrano una marcata diminuzione di questi valori. Questo andamento è dovuto al riassetto del doppio strato lipidico conseguente al danno ossidativo. La sola presenza di fluorochinolone nel doppio strato aumenta la rigidità della membrana cellulare, infatti i corrispondenti valori di GP per cellule in assenza e in presenza di FQ sono 0,31 e 0,36 (5).

Questo aumento si somma a quello prodotto dall'esposizione ad UVA. Il fatto che questi valori raggiungono un massimo senza diminuire indica che il doppio strato lipidico, a causa della presenza di FQ, non è in grado di riassetarsi per compensare le alterazioni prodotte dal danno ossidativo. La conseguenza è una forte lisi cellulare all'aumentare della dose (5).

Un ultimo punto importante è la localizzazione preferenziale all'interno della cellula dei fluorochinoloni. Differenti FQ con differente coefficiente di ripartizione possono influenzare in maniera differente la fisiologia della cellula, e la rilevanza dell'effetto fototossico sia per quanto riguarda la sua estensione che la sua persistenza (10).

In conclusione vi sono evidenze sperimentali che indicano che i FQ si localizzano preferenzialmente sulle membrane cellulari e che tale localizzazione persiste per relativamente lungo tempo. Questi fatti indicano nelle membrane cellulari il target principale per gli effetti dannosi dei FQ. Il DNA cellulare, sebbene sia bersaglio dei radicali prodotti dal trattamento combinato FQ-UVA, sembra non rivestire un ruolo importante e centrale nei processi di fotosensibilizzazione. In teoria FQ con alto coefficiente di ripartizione dovrebbero mostrare maggiori effetti avversi a causa di una maggiore concentrazione sul target e di una più lunga persistenza nel tempo nelle membrane cellulari anche dopo il termine della chemioterapia.

Bibliografia

1. Saporà O, Di Carlo B, Maggi A, Trisciuglio D, Giusti AM, Parasassi T. Meccanismo di azione di agenti fotosensibilizzanti: I, studi a livello cellulare e molecolare. In: Cignitti M (Ed.). *Progetto di ricerca: Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1998. p. 30-33. (Rapporti ISTISAN 98/13).
2. Saporà O, Maggi A, Pozzi R, Trisciuglio D, Krasnowska E, Parasassi T. Meccanismo di azione di agenti fotosensibilizzanti: II, studi a livello cellulare e molecolare. In: Ciranni E (Ed.). *Progetto di ricerca: Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. p. 65-76. (Rapporti ISTISAN 00/18).
3. Botchway SW, Chakrabarti S, Makrigiorgos N. Novel visible and ultraviolet photogeneration of hydroxyl radicals by 2-methyl-4-nitro-quinoline-N-oxide (MNO) and 4,4-dinitro-(2,2)bipyridinidyl-N,N-dioxide (DBD). *Photochemistry and Photobiology* 1998;67:635-40.
4. Wagai N, Tawara K. Possible direct role of reactive oxygens in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. *Archives of Toxicology* 1992;65:495-9.
5. Trisciuglio D, Krasnowska E, Maggi A, Pozzi R, Parasassi T, Saporà O. Phototoxic effect of fluoroquinolones on two human cell lines. *Toxicology in Vitro* 2002;16:449-56.
6. Giusti AM, Raimondi M, Ravagnan G, Saporà O, Parasassi T. Human cell membrane oxidative damage induced by single and fractionated doses of ionizing radiation: a fluorescence spectroscopy study. *International Journal of Radiation Biology* 1998;74:595-605.
7. Levi M, Wilson P, Nguyen S, Iorio E, Saporà O, Parasassi T. K562 and HL60 membrane aging during cell growth is associated with changes in cholesterol concentration. *Mechanisms of Aging and Development* 1997;97: 109-19.
8. Ouedraogo G, Molière P, Bazin M, Santus R, Kratzer B, Miranda MA, Castell JV. Lysosomes are sites of fluoroquinolone photosensitization in human skin fibroblasts: a microspectrofluorimetric approach. *Photochemistry and Photobiology* 1999;70:123-9.
9. Sortino S, Condorelli G, Deguidi G, Giuffrida S. Molecular mechanisms of photo-sensitization XI: membrane damage and DNA cleavage photoinduced by enoxacin. *Photochemistry and Photobiology* 1998;68:652-9.
10. Bliski P, Martinez LJ, Koker EB, Chignell CF. Influence of solvent polarity and proticity on the photochemical properties of norfloxacin. *Photochemistry and Photobiology* 1998;68:20-4.

LINEA DI RICERCA A.3
Processi di sterilizzazione e loro influenze
sulle proprietà del principio attivo

PROCESSI DI STERILIZZAZIONE E LORO INFLUENZA SULLE PROPRIETÀ DEL PRINCIPIO ATTIVO

Luisa Montanari (a), Francesco Cilurzo (a), Luisa Valvo (b), Paola Bertocchi (b), Antonio Faucitano (c), Armando Buttafava (c), Ida Genta (d), Bice Conti (d)

(a) *Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università di Milano*

(b) *Laboratorio di Chimica del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Chimica Generale, Università di Pavia, Pavia*

(d) *Dipartimento di Chimica Farmaceutica, Università di Pavia, Pavia*

Sintesi dell'attività svolta e principali risultati

Il trattamento con radiazioni ionizzanti è sempre più ampiamente utilizzato per la sterilizzazione e per l'abbattimento della carica microbica di medicinali. D'altra parte esso è consentito solo se è documentabile l'assenza di effetti che possono pregiudicare la qualità e quindi la sicurezza del prodotto.

L'irraggiamento β è diventato disponibile come processo su scala industriale in tempi più recenti rispetto all'irraggiamento γ e per il momento ha trovato scarsa applicazione nel settore farmaceutico. D'altra parte, gli indubbi vantaggi in termini di tempi e costi rendono competitivo, quando appropriato, l'irraggiamento β rispetto all'irraggiamento γ ed è ragionevole ritenere che il primo troverà nel prossimo futuro sempre maggiori applicazioni nel trattamento di prodotti farmaceutici. I lavori reperibili in letteratura che riguardano gli effetti dell'irraggiamento γ di microsfele costituite da polimeri e copolimeri dell'acido lattico e glicolico sul rilascio dell'attivo contenuto e sul peso molecolare del polimero sono numerosi (1-10), mentre sono molto scarsi quelli che riguardano la stabilità nel tempo di sistemi microparticellari irraggiati (11). Inoltre, non esistono finora pubblicazioni specifiche sugli effetti indotti dai raggi β sui sistemi microparticellari costituiti da questi polimeri. Risulta pertanto interessante approfondire questo argomento con particolare riguardo alle interazioni farmaco-polimero.

Nel terzo anno di ricerca sono stati valutati gli effetti della sterilizzazione mediante radiazioni β sulla struttura e stabilità di microsfele costituite da un polilattide-co-glicolide e contenenti bupivacaina; inoltre, sono stati approfonditi quelli conseguenti all'irraggiamento γ . Successivamente, si è proseguito lo studio degli effetti dell'irraggiamento γ di microsfele costituite da due tipi di polilattide-co-glicolide contenenti ovalbumina come modello di proteine ad alto peso molecolare. Infine, mediante la tecnica di risonanza paramagnetica elettronica (*Electron Paramagnetic Resonance*, EPR) sono stati studiati i meccanismi di radiolisi della ovalbumina e delle relative microsfele.

Studio di stabilità all'irraggiamento

Microsfele contenenti bupivacaina

Sono stati preparati tre tipi di microsfele di Resomer RG503 (Boheringer, G) contenenti concentrazioni di bupivacaina base (BU) pari a 10% m/m (Formulazione 1), 25% m/m (Formulazione 2) e 40% m/m (Formulazione 3). Le microsfele sono state preparate con il

metodo *spray-drying*. In via preliminare è stato indagato lo stato fisico del principio attivo mediante spettrofotometria di assorbimento nell'infrarosso in trasformata di Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR) e calorimetria differenziale a scansione (DSC).

I campioni sono stati irraggiati con raggi γ e con raggi β alla dose di 25kGy (12). Le microsfere non irraggiate e irraggiate sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico e strutturale tramite microscopia a forza atomica (*Atomic Force Microscopy*, AFM), FT-IR e DSC (*Differential Scanning Calorimetry*). La cinetica di rilascio *in vitro* è stata studiata mediante un saggio di dissoluzione messo a punto allo scopo. La stabilità dei sistemi microparticellari è stata valutata immediatamente dopo irraggiamento e, sulla base di studi precedentemente effettuati (13), dopo un periodo di tre mesi approfondendo gli aspetti relativi alle variazioni morfologiche e strutturali.

Risultati

È stata evidenziata l'esistenza di una forma polimorfa della BU non nota in letteratura (polimorfo II: T_f , onset = 98,5 °C, ΔH fusione = 73,3 J/g).

Microsfere non irraggiate

Il caricamento delle microsfere con BU determina in tutti casi un riduzione della T_g (*Glass Transition Temperature*) del polimero dipendente dalla concentrazione del principio attivo; la variazione risulta più evidente per microsfere a minor concentrazione di BU (10% m/m). Dall'analisi termica risulta inoltre che nelle microsfere la BU è presente solo parzialmente in forma cristallina come polimorfo II e che il grado di cristallinità aumenta proporzionalmente al contenuto di principio attivo (Tabella 1).

Tabella 1. Analisi termica delle microsfere placebo e contenenti BU

Formulazione n.	Tg(°C)	Tf,BU (°C)	DH*(J/g)	BU cristallina (%)
1	42,3	96,1	9,4	12,8
2	44,7	91,5	25,9	33,5
3	45,5	97,0	27,5	77,1

I profili di dissoluzione delle microsfere mostrano un andamento della velocità di rilascio della BU coerente con le variazioni di T_g del polimero osservate e con la percentuale di cristallinità del principio attivo contenuto. Infatti per le microsfere a minore concentrazione di BU (10%), che presentano il più basso valore di T_g e la più bassa percentuale di cristallinità, si osserva la maggiore velocità di dissoluzione. Inoltre, la costante di velocità di rilascio decresce all'aumento della percentuale di BU nelle microsfere (Tabella 2).

Tabella 2. Transizione vetrosa (Tg), contenuto (C) e costante di velocità di rilascio (K) di BU dalle microsfere non irraggiate e irraggiate

Form. n.	Microsfere								
	non irraggiate			irraggiate β			irraggiate γ		
	Tg (°C)	C (%m/m)	K ($h^{-1} \times 10^{-2}$)	Tg (°C)	C (%m/m)	K ($h^{-1} \times 10^{-2}$)	Tg (°C)	C (%m/m)	K ($h^{-1} \times 10^{-2}$)
1	42.3	10,5±0,4	4,5±0,1	41,3	10,0±0,1	6,1±0,0	40,9	8,8± 0,2	6,9±0,1
2	44.7	25,5±0,5	4,2±0,1	42,1	25,6 ±0,4	6,0±0,1	40,6	23,6±0,6	6,5±0,2
3	45.5	40.0±0,3	3,2±0,0	42,7	39,5±0,3	4,0±0,1	41,8	38,4±0,7	5,4±0,0

In tutti i casi il contenuto in principio attivo e il profilo di dissoluzione non hanno subito variazioni significative per il periodo considerato.

Microsfere irraggiate

Dal punto di vista morfologico, il trattamento con radiazioni β e γ ha determinato un evidente aumento della rugosità della superficie delle microsfere (Figura 1). Rispetto alle microsfere non irraggiate, dopo irraggiamento si osserva un ulteriore abbassamento della T_g del polimero e una riduzione del grado di cristallinità del principio attivo; entrambi i fenomeni sono di maggiore entità nel caso del trattamento con raggi γ .

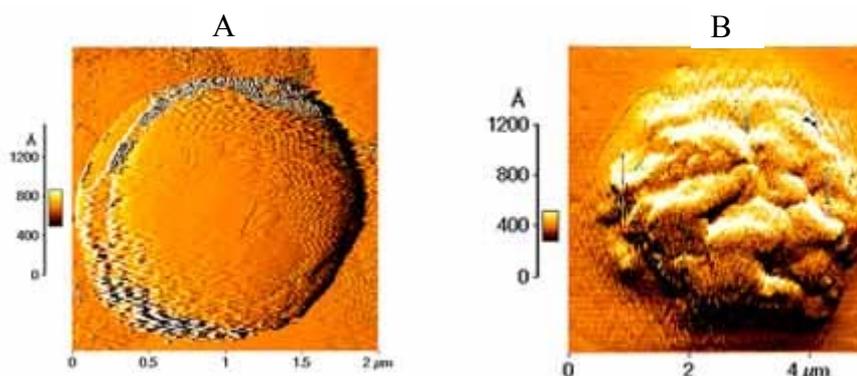


Figura 1. Fotomicrografia AFM delle microsfere contenenti il 10% m/m di BU (A) non irraggiate e (B) irraggiate con raggi γ

L'irraggiamento con raggi γ determina in tutti i casi una immediata e significativa degradazione del principio attivo nelle microsfere (vedi Tabella 2). L'entità della degradazione varia dal 4 al 15% ed è maggiore nelle microsfere contenenti il 10% di BU. Nelle microsfere trattate con i raggi β il contenuto di BU risulta invece stabile (vedi Tabella 2). Si è osservato un aumento della velocità di rilascio della BU dalle microsfere irraggiate rispetto alle non irraggiate che è risultato maggiore in seguito al trattamento con raggi γ (vedi Tabella 2).

La quantità di BU rilasciata in 24 ore dalle microsfere trattate con radiazioni γ aumenta progressivamente nei primi 3 mesi di conservazione, mentre non subisce variazioni nelle microsfere trattate con radiazioni β (Tabella 3).

Tabella 3. Costante di velocità di rilascio (K) di BU dalle microsfere irraggiate determinata immediatamente dopo il trattamento e dopo 90 giorni di conservazione

Form.n.	Microsfere			
	irraggiate β K ($h^{-1} \times 10^{-2}$)		irraggiate γ K ($h^{-1} \times 10^{-2}$)	
	t=0	t=90	t=0	t=90
1	6,1±0,0	5,9±0,1	6,9±0,1	8,1±0,7
2	6,0±0,1	5,9±0,1	6,5±0,2	7,2±0,2
3	4,0±0,1	3,9±0,1	5,4±0,0	6,2±0,3

Microsfere contenenti ovalbumina

La caratterizzazione delle microsfere di Resomer RG503 contenenti ovalbumina (OVA) preparate con il metodo della doppia emulsione nella precedente fase operativa aveva evidenziato che il 6% della proteina contenuta era adsorbita sulla superficie. È stata quindi effettuata un'indagine preliminare rivolta all'individuazione della formulazione e del metodo di preparazione idonei per ottenere la completa incapsulazione dell'OVA all'interno delle microsfere. A questo scopo le microsfere sono state preparate con il metodo *spray-drying* a partire da tre diverse formulazioni. Le percentuali di OVA adsorbite sulla superficie, comprese tra il 92% e il 65%, sono risultate eccessivamente elevate. Si è ritenuto pertanto opportuno ricorrere al metodo della emulsione singola con evaporazione del solvente e successivamente al metodo della emulsione doppia con evaporazione del solvente (14). Quest'ultimo metodo è stato infine applicato alla preparazione di microsfere di Medisorb 5050 2A, un polilattide-co-glicolide 50:50 con PM 12000 e gruppi carbossilici terminali prevalentemente liberi. Queste caratteristiche rendono il copolimero più idrofilo e quindi maggiormente idoneo alla incapsulazione di principi attivi proteici rispetto al Resomer RG 503 con PM 34000 nel quale i gruppi terminali liberi sono prevalentemente esterificati con gruppi etilici.

Le microsfere costituite dal copolimero Medisorb 5050 2A preparate con il metodo dell'emulsione doppia con evaporazione del solvente modificato per aggiunta di PEG (*Polythylene Glycol*) nella fase acquosa interna della prima emulsione, ove è solubilizzata l'OVA, e NaCl nella fase acquosa disperdente (lotto W6). I risultati ottenuti hanno evidenziato che la percentuale di proteina adsorbita sulla superficie era inferiore allo 0,1%.

Queste microsfere sono state sottoposte ad irraggiamento γ a 25 kGy. L'irraggiamento non ha evidenziato variazioni morfologiche rilevabili mediante microscopia elettronica.

I risultati del test di dissoluzione *in vitro* condotti sulle microsfere del lotto W6 prima e dopo irraggiamento sono riportati in Figura 2. Il trattamento con raggi γ ha modificato notevolmente il profilo di dissoluzione delle microsfere di OVA: la quantità di proteina ceduta nel tempo dalle microsfere non irraggiate è significativamente ridotta rispetto a quella ceduta dalle microsfere non irraggiate.

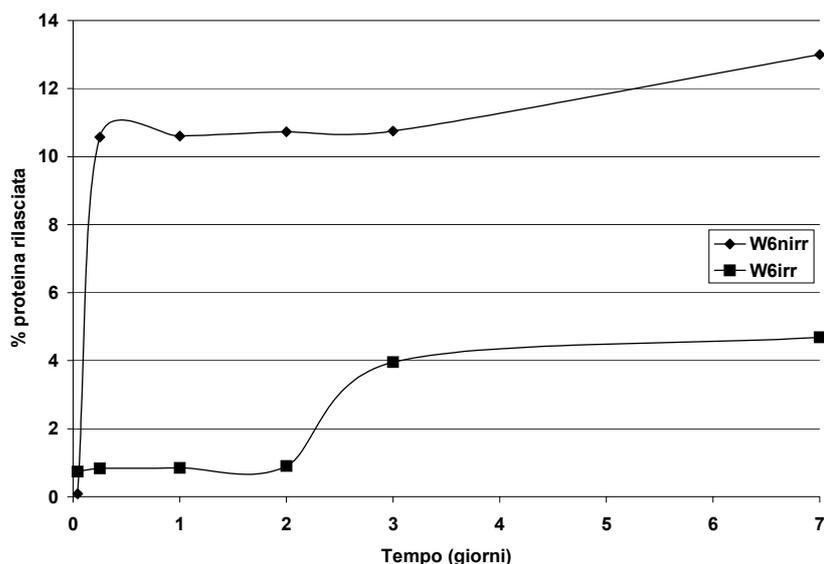


Figura 2. Profili di dissoluzione dell' ovalbumina dalle microsfere del lotto W6 prima (W6nirr) e dopo irraggiamento (W6irr)

Studio EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*)

Sono stati studiati i meccanismi di degradazione e la presenza di radicali liberi della ovalbumina pura (OVA) e di sistemi microparticellari costituiti da Resomer RG 503 e caricati con questa molecola. I campioni di principio attivo e di microsfele sono stati sigillati sotto alto vuoto in provette di quarzo e irradiati con radiazioni γ a 77 K in un *dewar* contenente azoto liquido. La registrazione degli spettri è stata effettuata con spettrometri Bruker EMX/12 e Varian E-109. Gli spettri sono stati analizzati mediante simulazione al computer con un Hamiltoniano contenente i termini di interazione Zeeman elettronica e nucleare e di interazione iperfina isotropica e anisotropica.

Ovalbumina

Gli spettri EPR si possono ricondurre alla comparsa di due nuove componenti iperfini A e B aventi le seguenti caratteristiche:

– *Componente A*

Inizia a formarsi sopra $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; la struttura è caratterizzata da un g rombico con valori principali $g_1 = 2,057$, $g_2 = 2,026$, $g_3 = 2,003$ e una struttura iperfina costituita da un doppietto di 7 G particolarmente risolta nella posizione g_2 ; presenta scarsa tendenza alla saturazione di potenza.

– *Componente B*

Doppietto isotropico con splitting di 18,3 G, centrato a $g = 2,003$; ha una tendenza alla saturazione maggiore della componente A.

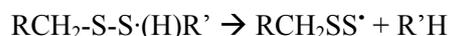
L'intensità relativa della componente A aumenta con il tempo di conservazione del campione a temperatura ambiente tanto da poterla osservare allo stato quasi puro nello spettro registrato a 20 mW dopo circa 400 h a temperatura ambiente. Dalla simulazione di questo segnale si sono ottenuti i parametri iperfini e di g riportati in precedenza. La componente B è ben evidente nel segnale registrato a bassa potenza (60 nW).

La componente A è riconducibile a radicali di tipo tiiranilico o pertiilico caratterizzati dalla presenza di una frazione significativa della densità di spin sugli atomi di zolfo. Se, come sembra ragionevole, questi radicali si formano a partire dalle unità cisteiniche, si possono prevedere i seguenti radicali tutti compatibili con i parametri EPR determinati sperimentalmente:

- $\text{RCH}_2\text{-S-S}^*(\text{H})\text{R}'$; $\text{RCH}_2\text{S}^*(\text{H})\text{-R}'$ (*radicali tiiranilici*)
- $\text{RCH}_2\text{S-S}^*$ (*radicali pertiilici*)

I radicali tiiranilici neutri si possono formare per addizione ai gruppi $-\text{SH}$ di radicali precursori tiilici RS^* o al carbonio. In questi radicali l'elettrone spaiato è localizzato prevalentemente sul legame S-S e pertanto i valori principali del tensore g sono diretti lungo il legame, perpendicolarmente a questo e perpendicolarmente al piano individuato dai primi due; inoltre il doppietto di 7 G evidenzia l'interazione magnetica dell'elettrone spaiato con un protone. In base a calcoli di orbitali molecolari semiempirici al livello MNDO-PM3, il protone interagente non può essere quello legato allo zolfo ma piuttosto a uno dei due idrogeni del

gruppo metilenico adiacente allo zolfo trivalente la cui interazione è favorita in modo selettivo rispetto all'altro dalla particolare orientazione del legame C-H rispetto all'orbitale dell'elettrone spaiato. Radicali pertiilici si possono formare per disproporzionamento da specie $\text{RCH}_2\text{-S-S}^*(\text{H})\text{R}'$:



Tuttavia la loro presenza è ritenuta poco probabile per l'endotermicità della reazione e per la costante di accoppiamento del protone che è molto superiore a quella prevista per questo radicale da metodi di OM (Orbitali Molecolari). Anche la possibilità di radicali anioni $(\text{R-S-S-R}')^{\cdot-}$ viene scartata in base al comportamento alla saturazione. La componente B, spesso osservata negli spettri EPR delle proteine irraggiate (15), può essere ragionevolmente attribuita a radicali derivanti dalla rottura di legami C-H in unità gliciniche nella catena proteica:



Lo spettro EPR dei radicali tiilici non può essere di norma osservato nella sua interezza a causa della degenerazione orbitalica che incrementa l'anisotropia del tensore g. Rimane tuttavia visibile la componente a $g = 2,003$ che si presenta come un picco non strutturato in forma di derivata. Un segnale di questo genere è compatibile con gli spettri osservati nell'ambito di temperature tra -160 e -50 °C. Si ritiene pertanto che radicali tiilici del tipo:



derivanti dalla rottura di legami S-H e S-S siano presenti tra le specie primarie intrappolate a -196 °C. Lo sviluppo del segnale A all'aumentare della temperatura sopra -15 °C si può collegare all'aggiunta dei radicali tiilici ai ponti disolfuro contigui con formazione di radicali tiiranilici.

La formazione dei radicali della glicina sembra essere favorita da una particolare reattività del gruppo metilenico verso l'estrazione di idrogeno da parte di altre specie radicaliche. Contribuisce a questa reattività la facilità con la quale può essere raggiunta la configurazione planare del centro radicalico che è invece parzialmente impedita dalla presenza di sostituenti.

Se si escludono i radicali tiilici, poichè l'estrazione di idrogeno sarebbe in tal caso fortemente endotermica, è ragionevole presumere che i precursori dei radicali della glicina siano i radicali provenienti da scissioni di catena o da rotture di legami C-H sulle catene laterali della proteina.

Il decadimento del segnale della glicina osservato sopra -10 °C in concomitanza con l'incremento del segnale della specie allo zolfo, suggerisce reazioni di addizione ai gruppi tiilici e disolfuro con formazione di altri radicali tiiranilici.

Gli eventi di rottura dei ponti disolfuro e le reazioni di addizione dei radicali tiilici e dei radicali glicinici ai ponti disolfuro comportano la riorganizzazione parziale della struttura secondaria e terziaria della proteina.

L'apertura dei campioni all'aria accentua la velocità di decadimento delle specie radicaliche a temperatura ambiente (la concentrazione si riduce a circa 1/3 dopo 400 h) e causa la conversione a radicali perossidici dei radicali al carbonio. I radicali perossidici raggiungono la massima concentrazione dopo circa 5 h e poi decadono. La presenza dell'ossigeno causa anche lo sviluppo di un singoletto, centrato a $g = 2,00$, che a bassa temperatura mostra modificazioni di forma riconducibili ad una anisotropia del fattore g di entità inferiore a quella dei radicali

perossidici. Queste caratteristiche suggeriscono la presenza di radicali solfinilici o solfonilici provenienti probabilmente da reazioni dei radicali perossidici con gruppi tiolici:



Microsfere contenenti ovalbumina

Il segnale EPR ottenuto dai campioni di microsfere contenenti 13,1% m/m di OVA è sostanzialmente quello del polimero puro generato da radicali di scissione di catena e di estrazione di idrogeno $-CH_2^*$, $-CH^*CH_3$, $-CH^*$, $-C^*(CH_3)^*$. I radicali da scissione di catena decadono a temperatura ambiente generando altre specie riconducibili alla rottura di legami C-H nelle catene del copolimero. A causa della bassa concentrazione relativa, stimata dalle rese radiolitiche <5% , non è stato possibile identificare i radicali dell'OVA.

Le rese radiolitiche dei radicali generati negli irraggiamenti a 77 K sono state determinate per doppia integrazione degli spettri EPR attraverso il confronto con standard di DPPH (difenilpicrilidrazile) a concentrazione di *spin* nota. Le rese radicaliche per i campioni di OVA nelle microsfere corrispondono a quelle calcolate dalle rese radiolitiche dei componenti puri applicando la legge dell'additività.

Tabella 6. Rese radiolitiche dei radicali a 77 K (μ J)

Campione	Resa radiolitica
OVA	0,14
Microsfere placebo	0,27
Microsfere contenenti OVA	0,23

Questo dato è indicativo di assenza di interazioni tra polimero e principio attivo nel meccanismo del processo radiolitico.

Conclusioni

Studio di stabilità all'irraggiamento

Tutti i tipi di microsfere contenenti BU sono risultati più stabili all'irraggiamento β che all'irraggiamento γ effettuati entrambi a 25 kGy e in presenza di ossigeno. La quantità di principio attivo contenuto non ha infatti subito variazioni nelle microsfere trattate con radiazioni β , mentre è diminuita di valori compresi tra il 4% e il 15% in quelle trattate con raggi γ . Inoltre, mentre l'effetto delle radiazioni β si è esaurito immediatamente dopo l'irraggiamento, l'azione destabilizzante delle radiazioni γ si è prolungata per il periodo di tre mesi.

Nel caso delle microsfere contenenti OVA, il trattamento con raggi γ alla stessa dose ha invece diminuito notevolmente la quantità di proteina ceduta dalle microsfere per dissoluzione *in vitro*.

Gli studi condotti su sistemi microparticellari contenenti BU e OVA, scelta come modello di molecole di natura proteica, hanno indicato che la sterilizzazione con radiazioni ionizzanti γ e β di sistemi microparticellari costituiti da polilattidi-co-glicolidi può causare variazioni non trascurabili e imprevedibili sia della quantità che della cinetica di rilascio del principio attivo

contenuto. Inoltre, a parità di dose di irraggiamento, l'entità delle variazioni dei parametri rilevanti dal punto di vista biofarmaceutico può dipendere dalla natura delle radiazioni utilizzate.

Appare interessante l'applicazione della microscopia a forza atomica che nel caso dei sistemi microparticellari contenenti BU, ha evidenziato modificazioni morfologiche della superficie in seguito a trattamento con radiazioni γ e b. L'aumento della rugosità della superficie osservato può essere quantificato e si può considerare come un indicatore dell'avvenuto irraggiamento.

Studio EPR

L'analisi degli spettri EPR dell'OVA è compatibile con l'ipotesi della formazione di radicali tiolici RS \cdot (rottura di ponti disolfuro o di legami S-H) e di radicali della glicina R-CH \cdot C(=O)- tra le specie "primarie" della radiolisi a 77 K. In prossimità della temperatura ambiente questi radicali reagiscono con gruppi tiolici RSH o disolfuro RS-SR dando radicali tiiranilici R-S--S(R')(R''). Le reazioni di rottura di ponti disolfuro e di addizione radicalica allo zolfo con formazione di nuovi *cross-link* possono indurre alterazioni sostanziali nella struttura terziaria della proteina. Sono state misurate le rese radiolitiche dei radicali per i campioni di microsfeere contenenti OVA: la formazione dei radicali nelle microsfeere segue la legge dell'additività e pertanto le interazioni polimero-farmaco (trasferimento di energia, di cariche, reazioni radicaliche) sono da considerare trascurabili.

Bibliografia

1. Hausberger AG, Kenley RA, De Luca PP. Gamma irradiation effects on molecular weight and in vitro degradation of poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *Pharm Res* 1995;12:233-42.
2. Sintzel MB, Merkli A, Tabatabay C, Gurny R. Influence of irradiation sterilization on polymers used as a drug carriers – a review. *Drug Dev Ind Pharm* 1997;23(9):857-79.
3. Montanari L, Costantini M, Ciranni-Signoretti E, Valvo V, Santucci M, Barolomei M, Fattibene P, Onori S, Faucitano A, Conti B, Genta I. Gamma irradiation effects on poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release* 1998;56:219-29.
4. Rothen-Weinhold A, Besseghir K, Gurny R. Analysis of the influence of polymer characteristics and core loading on the in vivo release of a somatostatin analogue. *Eur J Pharm Sci* 1997;5:303-13.
5. Volland C, Wolff M, Kissel T. The influence of terminal gamma-sterilization on captopril containing poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Control Release* 1994;31:293-305.
6. Yoshoka S, Aso Y, Otsuka T, Kojima S. The effect of γ -irradiation on drug release from poly(lactide) microspheres. *Rad Phys Chem* 1995;46:281-5.
7. Mohr D, Wolff M, Kissel T. Gamma irradiation for terminal sterilization of 17 β -estradiol loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles. *J Control Release* 1999;61:203-17.
8. Delgado A, Evora C, Llabres M. Degradation of DL-PLA methadone microspheres during *in vitro* release. *Int J Pharm* 1996;140:219-27.
9. Cha Y, Pitt CG. The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester microspheres. *J Control Release* 1989;8:259-65.
10. Bittner B, Mader K, Kroll C, Borchert HH, Kissel T. Tetracycline-HCl-loaded poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a spray drying technique: influence of gamma-irradiation on radical formation and polymer degradation. *J Control Release* 1999;59:23-32.

11. Montanari L, Cilurzo F, Valvo L, Faucitano A, Buttafava A, Groppo A, Genta I, Conti B. Gamma irradiation effects on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing clonazepam. *J Control Release* 2001;75:317-30.
12. European Guideline 3AQ4a The use of Ionizing Radiation in the Manufacture of Medicinal Products (6/1992) Official Publications of the European Communities.
13. Montanari L, Cilurzo F, Conti B, Genta I, Groppo A, Valvo A, Faucitano A, Buttafava A. Gamma irradiation effects on stability of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine. *II Farmaco* 2002;57:427-33.
14. Conti B, Groppo A, Genta I, Dacarro C, Valvo A, Cilurzo F, Montanari L. Comparison among different preparation methods of ovalbumin loaded PLGA microspheres, Proceedings of the International Symposium. *Control Rel Bioact Mat* 2000;27: # 8050.
15. Henriksen T, Melo TB, Saxebol G. Free radicals in proteins and protection from radiation damage. In: Pryor WA (Ed). *Free radicals in biology*. Vol II. London: Academic Press; 1976. p. 213.

SOTTOPROGETTO 2
Farmaci e loro metaboliti in campioni biologici

LINEA DI RICERCA B.1
Fattori di variabilità in farmacocinetica

MONITORAGGIO TERAPEUTICO DELLA NETILMICINA NEL NEONATO PRETERMINE

Vincenzo Basile (a), Gennaro Vetrano (b), Antonio Gentile (a), Stefano Zappelli (b), Lucio D'Aiello (b), Giuseppe Palmiero (a), Fulvio Veneri (a), Domenico Capone (a)

(a) *Dipartimento di Neuroscienze e Scienze del Comportamento, Sezione di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università "Federico II", Napoli*

(b) *Divisione di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale, Azienda Ospedaliera "A. Cardarelli," Napoli*

Sintesi dell'attività svolta e dei principali risultati

L'utilità del monitoraggio terapeutico degli aminoglicosidi è ormai riconosciuta. L'indicazione al monitoraggio terapeutico di questa classe di farmaci è duplice: migliorare l'efficacia della terapia farmacologica ed evitare l'insorgenza di effetti collaterali, rendendo più sicura l'azione dei farmaci. Questi farmaci presentano un'ampia variabilità farmacocinetica e pertanto risulta difficile stabilire un dosaggio ottimale. Molto spesso la posologia di questi farmaci è stabilita in modo empirico facendo riferimento al peso corporeo, alla funzionalità renale o alla gravità dell'infezione. Infatti questi farmaci sono spesso utilizzati in situazioni di urgenza, quali patologie sostenute da batteri gram-negativi difficili o in malattie che minacciano la vita del paziente. Sulla base di queste considerazioni il ricorso al monitoraggio terapeutico, vale a dire l'aggiustamento della posologia sulla base dei livelli ematici del farmaco, trova una sua valida giustificazione.

È noto, altresì, che per quasi tutti i farmaci esiste una variabilità farmacocinetica in relazione all'età del soggetto. Anche per gli aminoglicosidi è stata riscontrata una differente cinetica nel bambino, nell'adulto e nell'anziano. Negli ultimi tempi l'attenzione si è soprattutto focalizzata sulle condizioni di prematurità, anche alla luce dei migliorati indici di sopravvivenza di tale fascia della popolazione neonatale.

Nel neonato pretermine esistono particolari capacità metaboliche ed escretive dei farmaci le quali possono essere responsabili di una modificazione della loro cinetica; pertanto il monitoraggio terapeutico dei farmaci, e in particolare modo degli aminoglicosidi, può essere di valido ausilio nell'impostazione di una corretta e ottimale terapia. In una nostra precedente ricerca, condotta su neonati pretermine e a termine, le concentrazioni sieriche (*trough level*) di netilmicina riscontrate nei neonati immaturi sono risultate essere notevolmente superiori al range terapeutico atteso; al contrario, i neonati a termine presentavano livelli sierici di netilmicina compresi nel range terapeutico atteso. Tali studi sono stati oggetto di specifico finanziamento da parte dell'Istituto Superiore di Sanità nell'ambito del "II Progetto di ricerca sulle proprietà chimico-fisiche dei medicamenti e loro sicurezza d'uso (1997)".

Scopo del presente progetto è, pertanto, la prosecuzione dello studio di tale problematica allo scopo di confermare i preliminari risultati ottenuti nel corso del monitoraggio terapeutico di questo aminoglicoside in neonati pretermine e a termine, attraverso l'ampliamento della sperimentazione ad un maggior numero di pazienti. Lo studio è stato effettuato in collaborazione con la Divisione di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale dell'Azienda Ospedaliera "A. Cardarelli" di Napoli.

Schema sperimentale e metodologia

Il numero complessivo di neonati reclutati è stato 34; essi sono stati suddivisi in base all'età gestazionale nei seguenti due gruppi:

- Neonati pretermine di età gestazionale ≤ 36 settimane:
 - 26 soggetti
 - età gestazionale media \pm ES: $30,7 \pm 0,7$ settimane
 - peso medio \pm ES: $1606,9 \pm 126,3$ g.
- Neonati a termine di età gestazionale > 36 settimane:
 - 8 soggetti
 - età gestazionale media \pm ES: $38,0 \pm 0,5$ settimane
 - peso medio \pm ES: $2801,2 \pm 89,2$ g.

Il numero di pazienti reclutati è da porre in relazione al tasso di natalità e di sopravvivenza di neonati pretermine riscontrato presso la suddetta Divisione di Neonatologia.

La somministrazione dell'aminoglicoside netilmicina è avvenuto per via endovenosa, in bolo. Il protocollo terapeutico usato è stato il seguente:

- Neonati di peso < 1200 g:
 - 2,5mg/kg/die
- Neonati di peso > 1200 g:
 - neonati < 1 settimana di vita: 2,5 mg/kg \times 2/die
 - neonati > 1 settimana di vita: 2,5 mg/kg \times 3/die

Il monitoraggio dei livelli sierici di netilmicina, in condizioni di steady-state, è avvenuto ai seguenti tempi:

- immediatamente prima della somministrazione successiva di farmaco per la determinazione della concentrazione minima (*trough level*);
- al tempo di picco per la valutazione della concentrazione massima (C_{max}).

La determinazione dei livelli sierici di netilmicina è stata effettuata in 4^a giornata e in 6^a giornata di trattamento al fine di verificare la ripetitività e la stabilità delle concentrazioni raggiunte. La metodica usata è stata quella dell'immunofluorescenza a luce polarizzata (*Fluorescence ImmunoAssay*, TDx Abbott Analyzer: FPIA, TDx Abbott).

Sono stati anche valutati, prima e durante il trattamento (4^a e 6^a giornata), alcuni parametri di funzionalità renale: azotemia, creatinemia, sodiemia, potassiemia.

I livelli sierici attesi dell'antibiotico in esame erano i seguenti:

- *trough level*: < 2 μ g/ml.
- C_{max} : 5-12 μ g/ml

Per entrambi i livelli sierici considerati (*trough level* e C_{max}) è stato eseguito il confronto dei valori medi ottenuti in 4^a e 6^a giornata applicando il test t di Student, al fine di verificare la stabilità delle concentrazioni raggiunte.

La correlazione tra i valori di *trough level* e C_{max} ottenuti è stata valutata attraverso l'analisi della regressione lineare.

Risultati

L'analisi dei risultati tiene conto di tutti i pazienti arruolati a tutt'oggi nello studio e ciò al fine di ottenere un'elaborazione statistica dei risultati che possa essere significativa per quanto attiene il campionamento.

I valori medi di *trough level* e C_{max} ottenuti nei due differenti gruppi hanno evidenziato che:

- a) Nel gruppo di pazienti immaturi, i valori medi di *trough level* riscontrati erano sensibilmente superiori al range terapeutico atteso ($<2 \mu\text{g/ml}$); al contrario, il gruppo di pazienti di età gestazionale >36 settimane presentava valori di *trough level* compresi nel range terapeutico atteso. L'incremento dei valori medi di *trough level* ottenuti nei neonati immaturi rispetto a quelli riscontrati nei neonati a termine non è risultato statisticamente significativo; molto verosimilmente, però, un aumento del campionamento potrebbe far assumere a tale differenza caratteri di significatività statistica (Tabella 1).
- b) In tutti e due i gruppi di pazienti i valori di C_{max} rilevati erano compresi nell'intervallo terapeutico atteso ($5-12 \mu\text{g/ml}$). Anche in questo caso, i valori medi C_{max} riscontrati nei neonati immaturi erano superiori a quelli dei neonati a termine sebbene tale incremento non è risultato significativo (Tabella 1).

Tabella 1. Valori medi \pm ES delle concentrazioni sieriche della netilmicina in 4^a e 6^a giornata di trattamento nei due gruppi di neonati

Concentrazione sierica	Neonati di età gestazionale ≤ 36 settimane		
	4 ^a giornata	6 ^a giornata	
<i>Trough level</i>	($\mu\text{g/ml}$)	$2,6 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,5$
C_{max}	($\mu\text{g/ml}$)	$9,6 \pm 2,1$	$9,9 \pm 1,8$
Neonati di età gestazionale > 36 settimane			
<i>Trough level</i>	($\mu\text{g/ml}$)	$1,6 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,3$
C_{max}	($\mu\text{g/ml}$)	$4,9 \pm 0,8$	$5,4 \pm 1,9$

- c) Nei due gruppi di pazienti è stato altresì riscontrata la stabilità delle concentrazioni sieriche raggiunte, sia per il *trough level* che per la C_{max} , dal momento che il confronto dei valori ottenuti in 4^a giornata con quelli della 6^a giornata non ha mostrato significative variazioni.
- d) Inoltre, tra i valori di *trough level* e C_{max} ottenuti è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa ($r = 0,520$, $P < 0,01$).
- e) I valori dei parametri di funzionalità renale riscontrati prima e durante il trattamento non hanno evidenziato differenze statisticamente significative (Tabella 2).

Tabella 2. Valori medi \pm s. dei parametri di funzionalità renale prima e durante il trattamento con netilmicina (4^a e 6^a giornata) nei due gruppi di neonati

Parametro di funzionalità renale		Neonati di età gestazionale \leq 36 settimane		
		basale	4 ^a giornata	6 ^a giornata
Azotemia	(mg/dl)	33,8 \pm 4,2	44,5 \pm 6,0	52,3 \pm 8,6
Creatininemia	(mg/dl)	0,9 \pm 0,07	1,0 \pm 0,09	1,0 \pm 0,07
Sodiemia	(mEq/l)	139,4 \pm 1,3	140,6 \pm 1,1	136,2 \pm 1,3
Potassiemia	(mEq/l)	4,7 \pm 0,2	4,7 \pm 0,2	5,0 \pm 0,3
		Neonati di età gestazionale $>$ 36 settimane		
Azotemia	(mg/dl)	34,4 \pm 4,3	32,8 \pm 7,3	39,0 \pm 13,0
Creatininemia	(mg/dl)	0,9 \pm 0,13	0,70 \pm 0,17	0,60 \pm 0,15
Sodiemia	(mEq/l)	135,6 \pm 3,1	134,6 \pm 3,0	131,7 \pm 1,9
Potassiemia	(mEq/l)	4,0 \pm 0,3	4,8 \pm 0,3	4,5 \pm 0,2

Conclusioni

L'analisi dei risultati ottenuti conferma nostre precedenti conclusioni e avvalorata l'ipotesi dell'esistenza di un diverso comportamento farmacocinetico della netilmicina nei pazienti immaturi rispetto a quelli a termine. Infatti, solo in quest'ultimi la posologia adottata ha determinato delle concentrazioni sieriche concordanti con quelle del range terapeutico atteso, mentre nel gruppo di neonati immaturi i valori medi di *trough level* sono risultati essere sempre superiori al limite massimo atteso.

In tutti e due i gruppi di pazienti le concentrazioni sieriche ottenute in 4^a e 6^a giornata di trattamento, sia per il *trough level* che per la *Cmax*, sono risultate essere sovrapponibili. Tali risultati ci consentono di poter affermare che nel corso del monitoraggio della netilmicina può essere sufficiente l'esecuzione di una unica determinazione con evidenti benefici per il paziente e per il Sistema Sanitario Nazionale.

Bibliografia

1. Kenyon CF, Knoppert DC, Lee SK, Vandenberghe HM, Chance GW. Amikacin pharmacokinetics and suggested dosage modifications for the preterm infant. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:265-8.
2. McCormack JP, Jewesson PJ. A critical reevaluation of the therapeutic range of aminoglycosides. *Clin Inf Dis* 1992;14:320-39.
3. Aronson JK, Reynolds DJM. Aminoglycoside antibiotics. *Br Med J* 1992;305:1421-4.
4. Nightindale CH. Impact of nosocomial infections on hospital costs. *Hosp Formul* 1993;28:51-4.
5. Padovani EM, Pistolesi C, Fanos V, Messori A, Martini N. Pharmacokinetics of amikacin in neonates. *Dev Pharmacol Ther* 1993;20:167-73
6. Bates RD, Nahata MC. Once-daily administration of aminoglycosides. *Ann Pharmacother* 1994;28:757-66.
7. Wagner BP, Pfenninger J. Once daily dosing of netilmicin in neonatal and pediatric intensive care. *Intensive Care Med* 1994;20:365-7.

8. Giapros VI, Andronikou S, Cholevas VI, Papadopoulou ZL. Renal function in premature infants during aminoglycoside therapy. *Pediatr Nephrol* 1995;9:163-6.
9. Galloe AM, Graudal N, Christensen HR, Kampmann JP. Aminoglycosides: single or multiple daily dosing. *Eur J Clin Pharmacol* 1995;48:39-43.
10. Rodvold KA, Gentry CA, Plank GS, Kraus DM, Nickel E, Gross JR. Bayesian forecasting of serum vancomycin concentrations in neonates and infants. *Ther Drug Monit* 1995;239-46.
11. Bucci G, Medicini M. *Prontuario farmaceutico neonatale. 189 Farmaci per il neonato*. Cis Editore. Edizione 1995-1996.
12. Andronikou S, Giapros VI, Papadopoulou ZL. Effect of aminoglycoside therapy on renal function in full-term infants. *Pediatr Nephrol* 1996;10:766-8.
13. Falcao AC, Rocha MJ, Almeida AM, Leitao F, Santos J, Caramona MM. Gentamicin kinetic profile in very low birth weight newborns. *Ther Drug Monit* 1999;21:454.
14. Capone D, Vetrano G, Gentile A, Zappelli S, D'Ajello L, Carcano G, Palmiero G, Basile V. Monitoraggio terapeutico della netilmicina nel neonato pretermine. In: *Atti Giornate Scientifiche della Falcotà di Medicina e Chirurgia, Farmacia, Medicina Veterinaria e Agraria*. Napoli, 17-19 Maggio 2000. P.320-1.
15. Basile V, Vetrano G, Gentile A, Zappelli S, D'Ajello L, Carcano G, Palmiero G, Capone D. Monitoraggio terapeutico della netilmicina nel neonato pretermine. In: Ciranni E (Ed.). *Secondo Progetto di ricerca: Proprietà chimico-fisiche dei medicinali e loro sicurezza d'uso*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2000. p. 97-102. (Rapporti ISTISAN. 00/18).

VARIABILITÀ DELLA FARMACOCINETICA DEGLI ENANTIOMERI DI FLUOXETINA E NORFLUOXETINA: RUOLO DI FATTORI GENETICI E CORRELAZIONI CON LA RISPOSTA CLINICA

Emilio Perucca (a), Giuliana Gatti (a), Giovanna Jannuzzi (a), Cinzia Fattore (a), Piergiorgio Zuccaro (b), Roberta Pacifici (b), Maria Gabriella Scordo (c), Edoardo Spina (c)

(a) *Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Sezione di Farmacologia Clinica e Sperimentale, Università di Pavia, Pavia*

(b) *Laboratorio di Biochimica Clinica, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento Clinico Sperimentale di Medicina e Farmacologia, Sezione di Farmacologia, Università di Messina, Messina*

Sintesi dell'attività svolta e dei principali risultati

Sebbene la fluoxetina, un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina, sia in commercio da circa 10-15 anni e continui ad essere utilizzata in misura crescente non solo nel trattamento della depressione maggiore ma anche in numerose altre affezioni neuropsichiatriche, i fattori che ne condizionano l'efficacia e la sicurezza non sono stati ancora adeguatamente caratterizzati (1, 2). L'elevata variabilità farmacocinetica sembra svolgere un ruolo importante (3), ma lo studio della correlazione tra livelli plasmatici di fluoxetina e/o del metabolita attivo norfluoxetina e risposta clinica è stato reso difficile per molti anni dalla mancanza di un metodo di dosaggio adeguato, che consentisse di discriminare tra i rispettivi enantiomeri, che mostrano spiccate differenze di attività farmacologica. In particolare, mentre i due enantiomeri del farmaco madre sono pressoché equipotenti nel bloccare la ricaptazione della serotonina, l'enantiomero S della norfluoxetina è 20 volte più potente dell'enantiomero R in modelli farmacologici sia in vitro che in vivo (4-6).

Nell'ambito del programma di ricerca a cui fa riferimento questa comunicazione, è stata messa a punto dal nostro gruppo una specifica metodica in HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), che permette di separare in un'unica corsa cromatografica gli enantiomeri sia di fluoxetina che di norfluoxetina, con caratteristiche di prestazione tali da poter essere applicata al monitoraggio di questi analiti nel plasma di pazienti trattati con dosi terapeutiche (7, 8). Risultati preliminari ottenuti utilizzando tale metodica hanno permesso di dimostrare una spiccata variabilità dei livelli plasmatici degli enantiomeri in esame e del rispettivo rapporto enantiomerico in pazienti trattati con la stessa dose di fluoxetina, e di documentare un accumulo preferenziale nel plasma dell'enantiomero S sia per fluoxetina che per il metabolita demetilato (9). L'obiettivo della ricerca qui descritta era di valutare il potenziale contributo di diversi fattori alla variabilità interindividuale della cinetica stereoselettiva di fluoxetina e norfluoxetina, con particolare riferimento alla dose somministrata, ai polimorfismi genetici del citocromo P450 (CYP) e alla concomitante somministrazione di farmaci ad azione inducente o inibitoria su diverse isoforme di tale citocromo. È stata nel contempo esaminata la potenziale correlazione tra livelli plasmatici dei diversi enantiomeri di fluoxetina e norfluoxetina, risposta antidepressiva ed eventuale comparsa di effetti collaterali.

Un resoconto parziale dei risultati qui presentati è stato recentemente sottoposto per la pubblicazione (9).

Metodi

Pazienti e raccolta dei campioni

I pazienti sono stati reclutati in base ai seguenti criteri di inclusione: età non inferiore a 18 anni; trattamento con fluoxetina ad una dose stabile per almeno 5 settimane; assenza di patologie a carico del tratto gastrointestinale, del fegato o del rene; assenza di reperti clinici o anamnestici suggestivi di una scarsa compliance. Campioni di sangue (10 ml) per la determinazione del genotipo per il CYP2D6 e 2C19 e dei livelli plasmatici degli enantiomeri di fluoxetina e norfluoxetina sono stati ottenuti dopo circa 12 ore dall'assunzione della dose precedente. I campioni sono stati tenuti a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sino al momento dell'analisi. Il protocollo dello studio è stato approvato dai Comitati Etici interessati ed è stato ottenuto il consenso informato da parte di ciascun soggetto.

Valutazione clinica

Nei pazienti con sintomatologia depressiva, una valutazione della risposta clinica è stata effettuata nel giorno di prelievo utilizzando la Clinical Global Impression (CGI) Scale. Sono stati definiti *responder* i pazienti con uno score di 2 o 3 (miglioramento buono o eccellente rispetto al basale), e *non-responder* i pazienti con score di 1 o 0 (miglioramento lieve o nessun miglioramento). Eventuali effetti collaterali sono stati rilevati sulla base del reperto anamnestico e di un esame obiettivo.

Determinazioni analitiche

Le concentrazioni plasmatiche di fluoxetina e norfluoxetina sono state determinate mediante metodo HPLC enantioselettivo (7) che incorpora alcune modifiche rispetto alla metodica descritta in precedenza dal nostro gruppo (8). Il limite di quantificazione era di 10 ng/mL per tutti gli analiti (32 nmol/l per fluoxetina e 34 nmol/l per norfluoxetina), mentre la precisione entro e tra giorni era $<$ al 10%.

Determinazione del genotipo CYP2D6 e CYP2C19

Per la determinazione del genotipo per il CYP2C19 e CYP2D6 si è proceduto all'estrazione del DNA leucocitario con metodo Qiagen©. La presenza delle varianti alleliche difettive del CYP2D6 e del CYP2C19 è stata determinata con tecniche di PCR allele-specifica, seguita da analisi con enzimi di restrizione (10-12). Gli alleli in cui non è stata individuata la presenza di alcuna variante difettiva sono stati classificati come alleli Wild Type (wt). Tutti i portatori di alleli wt sono stati classificati come metabolizzatori rapidi (Extensive Metabolizers, EM), con differenziazioni tra metabolizzatori rapidi omozigoti (wt) e metabolizzatori rapidi eterozigoti (ht) (10).

La presenza di mutazioni comportanti carenze funzionali del prodotto dei geni CYP2D6 e CYP2C19 in entrambi gli alleli sono stati associati con il fenotipo metabolizzatore lento (Poor Metabolizer, PM).

Tutti i campioni sono stati successivamente analizzati mediante long-PCR per valutare la presenza di alleli CYP2D6 caratterizzati dalla presenza di un gene duplicato/multiduplicato

(13,14). In caso di positività a tale test, il paziente veniva classificato come metabolizzatore ultrarapido (UM).

Analisi farmacocinetica e statistica

L'influenza di diverse variabili quali posologia, età, sesso, peso corporeo e farmaci associati sui livelli plasmatici degli enantiomeri di fluoxetina e norfluoxetina è stata valutata mediante analisi di regressione multipla utilizzando una procedura iterativa basata sull'Akaike Information Criterion (15). Tutti i dati di concentrazione sono stati sottoposti a trasformazione logaritmica prima dell'analisi farmacocinetica e statistica. La compatibilità dei dati con una distribuzione normale è stata valutata con il test di Kolmogorov-Smirnov. In presenza di distribuzioni normali, confronti sono stati eseguiti mediante test t di Student o analisi della varianza. Il test U di Mann-Whitney è stato utilizzato per il confronto di dati con distribuzione non normale. Per studi di correlazione è stato utilizzato il test non parametrico di Spearman. Correlazioni con la risposta clinica sono state inoltre valutate mediante *receiver-operating analysis* (16).

Risultati

Caratteristiche della casistica e distribuzione delle concentrazioni degli enantiomeri in esame

Sono stati valutati complessivamente 131 pazienti (50 uomini, 81 donne) di età compresa tra 18 e 75 anni, trattati con dosi di fluoxetina comprese tra 10 e 60 mg/die (media + SD) (SD: Standard Deviation): 24 + 10 mg/die). Oltre la metà dei pazienti (69%) assumeva una politerapia che comprendeva, nel 6% dei casi, farmaci ad azione inibitoria sul citocromo 2D6 (fenotiazine, paroxetina) e, nell'8% dei casi, farmaci ad attività inducente su altri citocromi (barbiturici, carbamazepina o fenitoina). Le concentrazioni plasmatiche dei singoli enantiomeri (medie geometriche e limiti fiduciali al 95%) nella casistica *in toto* sono risultate pari a 186 (156-223) nmol/l per S-fluoxetina, 67 (58-77) nmol/l per R-fluoxetina, 247 (212-287) nmol/l per S-norfluoxetina e 118 (102-137) nmol/l per R-norfluoxetina. Le differenze tra le concentrazioni dei rispettivi enantiomeri R e S sono risultate statisticamente significative ($p < 0,0001$) sia per il farmaco madre che per il metabolita.

Analisi di regressione multipla

Le relazioni tra le concentrazioni misurate di R-fluoxetina (R-Flu), S-Fluoxetina (S-Flu), R-norfluoxetina (R-Nor), S-norfluoxetina (S-Nor), espresse in nmol/l, e le diverse variabili considerate sono rappresentate dalle seguenti equazioni:

- R-Flu = 0,78 [CV 9,4%] (1-Ind) (1-Inh) Age - 8,4e-3 [CV 8,8%] Wt2 + 4,0 [CV 3,5%] D
r = 0,60, SD% = 65%
- S-Flu = 4,5 [CV 3,6%] (1-Ind) (1-Inh) Age - 4,1e-2 [CV 4,0%] (1-Ind) (1-Inh) Wt2 + 11 [CV 2,3%] D
r = 0,50, SD% = 85%
- R-Nor = 6,8 [CV 2,5%] D
r = 0,28, SD% = 115%

$$\begin{aligned} & - S\text{-Nor} = 13 \text{ [CV 1,4\%]} D - 3,8e-5 \text{ [CV 17\%]} G D^4 \\ & r = 0,42, SD\% = 62\% \end{aligned}$$

dove D è la posologia (mg/die), Age è l'età (anni), Ind è la presenza o assenza di co-somministrazione di agenti inducenti (1 se presenti, 0 se assenti), Inh è la presenza (Inh = 1) o assenza (Inh = 0) di co-somministrazione di agenti inibitori sul CYP2D6, Wt è il peso corporeo e G è il sesso (1 = donna, 0 = uomo). Il parametro r rappresenta il coefficiente di correlazione tra i valori misurati e i valori previsti dal modello e SD% è la deviazione standard dei residui espressi come percentuale rispetto alla media. I coefficienti di variazione (CV%) di ciascun parametro sono espressi tra parentesi quadra.

Il contributo delle diverse variabili alla predittività del modello è stata valutata calcolando l'impatto della rimozione di ciascuna variabile sul valore di r. Per tutti gli enantiomeri esaminati, la posologia è risultata essere il principale fattore predittivo della variabilità della concentrazione plasmatica misurata.

Genotipo

Il genotipo CYP2D6 e CYP2C19 è stato determinato in 92 pazienti per i quali erano disponibili campioni di sangue intero. Per il CYP2D6, 85 pazienti sono risultati metabolizzatori rapidi (62 omozigoti e 23 eterozigoti), uno metabolizzatore lento e 6 metabolizzatori ultrarapidi. Per il CYP2C19, 90 pazienti sono risultati metabolizzatori rapidi (70 omozigoti e 20 eterozigoti) e 2 metabolizzatori lenti.

La relazione tra le concentrazioni plasmatiche dei singoli enantiomeri e la posologia giornaliera non ha presentato evidenti deviazioni in relazione ai genotipi CYP2D6 e CYP2C19. Purtroppo il numero di metabolizzatori lenti nella casistica esaminata è risultato inferiore a quello atteso in base ai dati di prevalenza in popolazioni caucasiche (CYP2D6 5-10% e CYP2C19 3-5%), un'osservazione che limita la significatività degli studi di correlazione.

Il possibile contributo dei genotipi CYP2D6 e CYP2C19 alla variabilità cinetica stereoselettiva di fluoxetina e norfluoxetina è stato esaminato più in dettaglio rappresentando i rapporti livello / dose per ciascun enantiomero in funzione del rispettivo genotipo in singoli pazienti non in trattamento con farmaci interferenti sull'attività CYP2D6 e CYP2C19.

Come illustrato in Figura 1, l'unico metabolizzatore lento CYP2D6 si discosta dagli altri genotipi in quanto presenta una concentrazione plasmatica di S-norfluoxetina (normalizzata per la dose) ai limiti inferiori dei valori osservati negli altri gruppi di pazienti. I rapporti tra i livelli plasmatici dei diversi enantiomeri sono stati poi correlati con i rispettivi genotipi CYP2D6 / CYP2C19 in pazienti non in trattamento con farmaci interferenti.

Nessuna relazione evidente è stata riscontrata tra i genotipi e i rapporti delle concentrazioni plasmatiche dei singoli enantiomeri. La sola eccezione è rappresentata dal metabolizzatore lento CYP2D6 nel quale il rapporto S-norfluoxetina / S-fluoxetina risulta estremamente ridotto mentre il rapporto R-norfluoxetina / S-norfluoxetina è molto più elevato rispetto a quelli osservati in tutti gli altri soggetti inclusi nello studio (Figura 1).

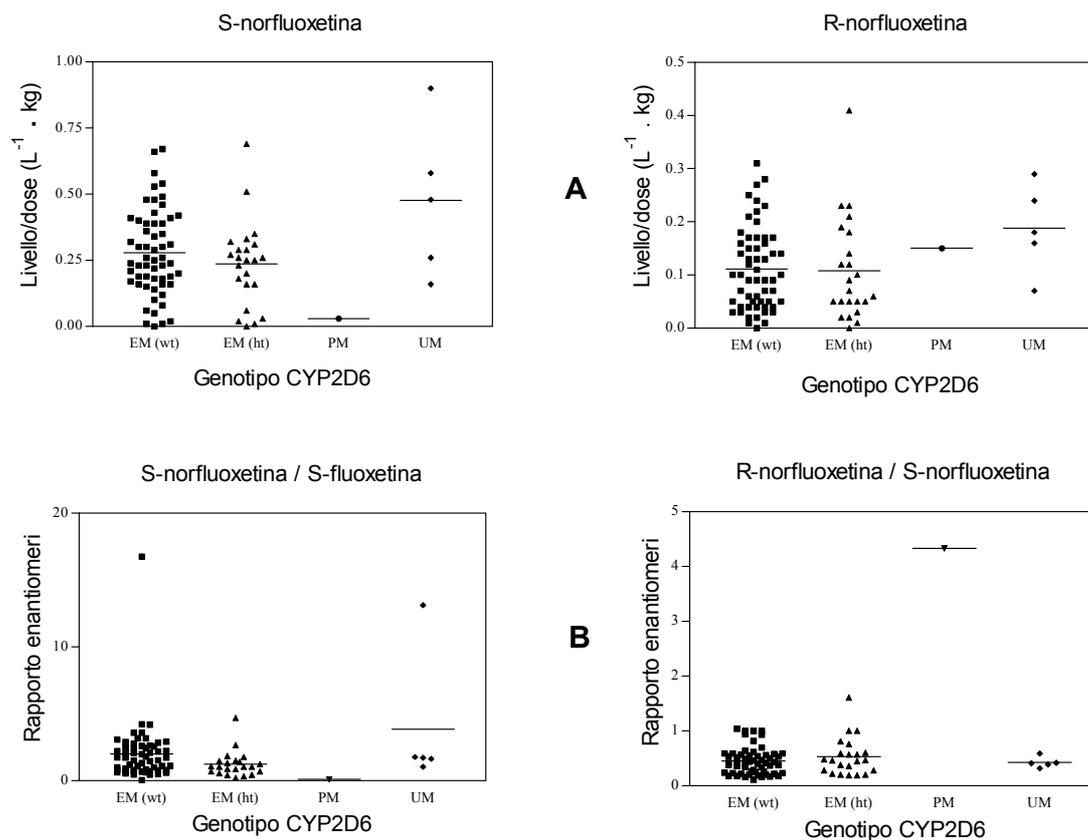


Figura 1. Distribuzione dei livelli plasmatici di S-norfluotexina e R- norfluotexina

Correlazione con la risposta clinica

Una valutazione della relazione tra concentrazione plasmatica degli enantiomeri di fluoxetina e norfluoxetina e risposta terapeutica è stata effettuata in 58 pazienti con sintomatologia depressiva non trattati con altri antidepressivi. I livelli di ciascuno degli enantiomeri esaminati nei 33 (57%) pazienti classificati come *responder* non sono risultati diversi da quelli osservati nei non *responder* (S-fluoxetina: 189 (135-266), vs 166 (103-267) nmol/l; R-fluoxetina: 64 (49-84) vs 68 (48-97) nmol/l; S-norfluoxetina: 240 (183-316) vs 242 (163-357) nmol/l; R-norfluoxetina: 102 (79-131) vs 107 (82-139) nmol/l rispettivamente). Le concentrazioni di active moiety (definite come la somma dei livelli di S-fluoxetina, R-fluoxetina e S-norfluoxetina) sono risultate anch'esse simili nei *responder* e nei non-*responder* (548 (436-689) vs 528 (374-745) nmol/l rispettivamente). La receiver-operating analysis non ha permesso di evidenziare una concentrazione soglia di alcun analita che differenziasse *responder* e non-*responder* con accettabile sensibilità e specificità.

Dei 131 pazienti inclusi nello studio, 32 (24%) hanno riportato almeno un evento avverso attribuibile al trattamento con fluoxetina. Gli effetti avversi più frequentemente segnalati sono stati nausea (n. = 8), ansia (n. = 6), sonnolenza (n. = 6), disfunzioni sessuali (n. = 4), cefalea (n. = 4) e anoressia (n. = 3). Le concentrazioni degli enantiomeri di fluoxetina e norfluoxetina nei pazienti con effetti avversi non sono risultate significativamente diverse da quelle osservate nei

pazienti senza effetti avversi (S-fluoxetina: 161 (110-237) vs 197 (154-252) nmol/l; R-fluoxetina: 60 (46-78) vs 71 (59-86) nmol/l; S-norfluoxetina: 202 (132-310) vs 263 (226-306) nmol/l; R-norfluoxetina: 108 (80-144) vs 104 (87-125) rispettivamente).

Discussione e conclusioni

La quasi totalità degli studi sinora condotti sulla distribuzione dei livelli plasmatici di fluoxetina e norfluoxetina in pazienti in trattamento cronico hanno utilizzato metodi di analisi non-enantioselettivi (17). La presente ricerca, che per la prima volta ha caratterizzato in un'ampia casistica le concentrazioni dei singoli enantiomeri, ha permesso di dimostrare che la variabilità individuale dei livelli plasmatici allo *steady-state* di ciascuno degli analiti in esame è molto spiccata e comparabile a quella descritta per i composti racemi (17).

In accordo con risultati preliminari descritti in casistiche numericamente molto più limitate (18, 19) è stato evidenziato che, in media, le concentrazioni plasmatiche degli enantiomeri S sia di farmaco madre che di metabolita sono notevolmente più elevate di quelle dei rispettivi enantiomeri R. Le basi molecolari della cinetica enantioselettiva della fluoxetina non sono state chiarite.

Studi precedenti condotti in vitro e in vivo dopo dosi singole e ripetute di fluoxetina hanno suggerito che il polimorfismo genetico CYP2D6 può condizionare in modo significativo il metabolismo di S-fluoxetina e, possibilmente, anche di R-fluoxetina e S-norfluoxetina (19). Anche se vi è evidenza che diversi altri isoenzimi (CYP2C9, CYP2C19 e CYP3A4, oltre al CYP2D6), possono contribuire al metabolismo dei diversi enantiomeri (9, 20, 21). Un ruolo del CYP2D6 nel metabolismo di S-fluoxetina è suggerito dal reperto che, nella nostra casistica, l'unico soggetto con genotipo CYP2D6 metabolizzatore lento ha presentato livelli ridotti di S-norfluoxetina e un rapporto R-norfluoxetina / S-norfluoxetina molto più elevato rispetto a quelli osservati in tutti gli altri soggetti. Queste osservazioni, tuttavia, vanno interpretate con cautela anche alla luce dell'apparente mancanza, nell'analisi di regressione multipla, di un'importante influenza degli inibitori del CYP2D6 sulle concentrazioni plasmatiche dei vari enantiomeri. Analogamente, non sono state evidenziate modificazioni importanti nella cinetica dei vari enantiomeri da parte del trattamento con farmaci inducenti o del genotipo CYP2C19.

Tra le diverse variabili studiate attraverso il modello della regressione multipla, la posologia è risultata essere il principale fattore predittivo della variabilità nella concentrazione plasmatica negli enantiomeri misurati. In accordo con studi effettuati recentemente sulla concentrazione dei racemati (17), il peso corporeo è risultato avere un basso valore predittivo e neppure l'età è risultata svolgere un ruolo rilevante nel modello della regressione multipla. Quest'ultima osservazione, tuttavia, deve essere interpretata tenendo in considerazione il fatto che solo 21 pazienti avevano più di 65 anni e un solo paziente aveva più di 75 anni.

Uno degli obiettivi della presente ricerca era di valutare potenziali correlazioni con la risposta clinica. Idealmente, tali correlazioni dovrebbero essere ricercate in studi clinici, nei quali i pazienti siano randomizzati a posologie fisse e/o a concentrazioni prestabilite. Nella nostra popolazione, la risposta clinica è stata valutata solo retrospettivamente, con conseguenti importanti fattori di confondimento quali variabile durata del follow-up, differenze nel decorso naturale della malattia, effetti placebo ed effetti delle terapie concomitanti. A causa di queste limitazioni, l'apparente mancanza di importanti differenze nei livelli plasmatici dei singoli enantiomeri, o della *active moiety*, tra *responder* e *non-responder*, o tra pazienti con o senza eventi avversi, deve essere interpretata con cautela.

In conclusione, questa ricerca ha permesso di caratterizzare la distribuzione delle concentrazioni plasmatiche degli enantiomeri R ed S di fluoxetina e norfluoxetina in pazienti in

trattamento cronico e di valutare potenziali fattori responsabili della variabilità farmacocinetica. I risultati dimostrano che la cinetica di fluoxetina è stereoselettiva, con concentrazioni plasmatiche maggiori degli enantiomeri S sia del farmaco madre che del metabolita demetilato. È stata inoltre evidenziata un'elevata variabilità nella concentrazione dei singoli enantiomeri e nel rapporto enantiomerico.

La posologia rappresenta il maggiore elemento predittivo della variabilità delle concentrazioni plasmatiche dei singoli enantiomeri, mentre la valutazione del ruolo dei polimorfismi genetici CYP, con particolare riferimento al genotipo CYP2D6, richiede ulteriori approfondimenti.

Bibliografia

1. Gram LF. Fluoxetine. *New Engl J Med* 1994;331:1354-61.
2. Stokes P and Holtz A. Fluoxetine tenth anniversary update: The progress continues. *Clin Ther* 1997;19:1-86
3. Altamura AC, Moro AR and Percudani M. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin Pharmacokinet* 1994;26:201-14.
4. Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, *et al.* Inhibition of serotonin uptake by optical isomers of fluoxetine. *Drug Dev Res* 1985;6:397-403.
5. Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, *et al.* Norfluoxetine enantiomers as inhibitors of serotonin uptake in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 1993;8:337-44.
6. Fuller RW, Snoddy HD, Rushinski JH, *et al.* Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. *Neuropharmacology* 1992;31:997-1000.
7. Pichini S, Pacifici R, Altieri I, *et al.* Stereoselective determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers in plasma samples by high-performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr Rel Technol* 1996;19:1927-35.
8. Gatti G, Bonomi I, Marchiselli R, *et al.* An improved stereoselective assay for the determination of fluoxetine and norfluoxetine enantiomers by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 2003;784(2):375-83
9. Jannuzzi G, Gatti G, Magni P, Spina E, Pacifici R, Zuccaro PG, Torta R, Guarneri L, Perucca E. Plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine: Sources of variability and preliminary observations on relationship with clinical response. *Ther Drug Monit* 2002;24(5):616-27.
10. deMorais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 1994;46:594-8.
11. Heim M, Meyer UA. Genotyping of poor metabolizers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet* 1990;336:529-32.
12. Saxena R, Shaw GL, Relling MV, Frame JN, Moir DT, Evans WE, Caporaso N, Weiffenbach B. Identification of a new variant CYP2D6 allele with a single base deletion in exon 3 and its association with the poor metabolizer phenotype. *Hum Mol Genet* 1994;3:923-6.
13. Daly AK, Armstrong M, Monkman SC, Idle JR. Genetic and metabolic criteria for the assignment of debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P4502D6) phenotypes. *Pharmacogenetics* 1991;1: 33-41.
14. Johansson I, Lundqvist E, Dahl M-L, Ingelman-Sundberg M (1996) PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. *Pharmacogenetics* 6:351-5.
15. Sakamoto T, Ishiguro M and Kitagawa G (Ed.). *Akaike Information Criterion Statistics*. Dardrecht, Holland: Reidel; 1986

16. Kronig MH., Munne RA., Szymanski S, *et al.* Plasma clozapine levels and clinical response. *Am J Psychiatry* 1995;152(2):179-82.
17. Lundmark J, Reis M and Bengtsson F. Serum concentrations of fluoxetine in the clinical treatment setting. *Ther Drug Monit* 2001;23:139-47.
18. Eap CB, Bondolfi G, Zullino D, *et al.* Concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine after multiple doses of fluoxetine in cytochrome P4502D6 poor and extensive metabolizers. *J Clin Psychopharmacol* 2001;21:330-4.
19. Fjordside L, Jeppesen U, Eap CB, *et al.* The stereoselective metabolism of fluoxetine in poor and extensive metabolizers of sparteine. *Pharmacogenetics* 1999;9:55-60.
20. Margolis JM, O'Donnell JP, Mankowski DC, *et al.* (R)-, (S)-, and racemic fluoxetine N-demethylation by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1187-91.
21. Ring BJ, Eckstein JA, Gillespie JS, *et al.* Identification of the human cytochromes p450 responsible for in vitro formation of R- and S-norfluoxetine. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;297:1044-5.

FATTORI DI VARIABILITÀ FARMACOCINETICA NELL'ANZIANO: PREVISIONE DELL'ANDAMENTO CINETICO DI MOLECOLE CHIRALI E POSSIBILI RAPPORTI FRA VARIABILITÀ CINETICA E DIVERSA RISPOSTA FARMACODINAMICA

Cesare Sirtori (a), Franco Pazzucconi (b)

(a) Centro E. Grossi Paletti, Ospedale Maggiore Riguarda, Milano

(b) Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano, Milano

Sintesi dell'attività svolta e dei principali risultati

Modellistica basata sulla struttura corporea e indagini cliniche riguardanti prodotti chirali con particolare interesse per il soggetto anziano e la patologia cardiovascolare

La formulazione matematico-statistica di modelli di cinetica dei farmaci si basa in generale su parametri fisiologici (peso corporeo, indice di massa corporea, altri) o patologici (funzione epatica, funzione renale) (1-3). Questi modelli, con l'eccezione di quelli che correggono per la funzione renale (4), sono tuttavia di rado applicati nella pratica prescrittiva quotidiana. Una possibile ulteriore eccezione è il caso dell'obesità, nella quale la formulazione di modelli si basa in generale sul peso corporeo ideale (Ideal Body Weight) per i farmaci idrofili (5) e sul peso corporeo totale corretto per la massa grassa, per i farmaci lipofili (6,7).

Questa modellistica quindi di rado soddisfa le esigenze del medico, in particolare per farmaci con un ristretto margine di sicurezza, che richiedono aggiustamenti di dose più esatte. I regimi terapeutici dovrebbero infatti esser programmati in anticipo, al fine di ottenere un risultato ottimale il più spesso possibile, e livelli insufficienti o tossici il meno frequentemente possibile. I dati disponibili dagli studi di farmacocinetica forniscono infatti: l'emivita di eliminazione ($t_{1/2}$), le concentrazioni ematiche massime (C_{max}), la *clearance*, il volume di distribuzione (Vd), e altri che in genere si ottengono da una popolazione di riferimento per lo più sana e possono quindi essere inadeguati per una terapia veramente individualizzata nei malati. Questi dati cinetici dovrebbero quindi essere inseriti in un modello, che tenga conto di una gamma più ampia di caratteristiche biochimiche e fisiche, in modo che il modello possa prevedere il comportamento cinetico di un numero più ampio possibile di soggetti.

Obiettivo principale della ricerca condotta con il finanziamento dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) è stato quindi quello di valutare un modello cinetico, inizialmente su volontari sani giovani, che si avvale di un sistema di rilevamento della struttura corporea con impedenziometria bioelettrica, per poi verificare su di una popolazione anziana la validità del modello ottenuto.

Alla prima fase dello studio, che ha consentito di definire la possibilità di una previsione soddisfacente della cinetica, basandosi sul modello della struttura corporea, è appunto seguita una seconda fase, dove il modello è stato applicato ad un'ampia popolazione anziana, esaminando soltanto la cinetica della digossina. Nell'ambito del programma di ricerca ISS sono state poi svolte indagini con obiettivi diversi; in particolare: terza fase A – partecipazione a

studi sul destino metabolico di molecole chirali (sotalolo) nel giovane e nell'anziano; terza fase B – studi di interazione con farmaci di uso comune in patologie dell'adulto e dell'anziano, come l'interazione macrolide/inibitore della pompa protonica nella terapia dell'ulcera; terza fase C – svolgimento di indagini riguardanti tecniche di valutazione del rischio vascolare, al fine di acquisire altre popolazioni nelle quali esaminare il destino cinetico dei farmaci.

Prima fase

Allo scopo di individuare un possibile modello di previsione del comportamento farmacocinetico e metabolico nell'anziano sono stati caratterizzati, preliminarmente, 10 soggetti giovani e in seguito, come confronto, 20 soggetti anziani, determinando in particolare:

- la composizione della massa corporea con la tecnica dell'impedenzometria elettrica: la resistenza (R) della reattanza (Xc) del corpo del soggetto sono state misurate con tecnica 'Total body' mediante un analizzatore a impedenza PIA -109 (Akern, Firenze) con una corrente elettrica alternata con frequenza di 50 Khz e intensità di di 800/A. I 4 elettrodi sono stati posizionati come descritto da Lukaski *et al.* (8) sul dorso della mano destra nel punto medio e sulla linea metacarpo falangea, e inoltre sul dorso del piede destro, nel punto medio e sulla linea metatarso falangea;
- la funzionalità renale, valutata utilizzando la creatininemia;
- la funzionalità epatica, studiata come parametri misti di *clearance* epatica-microsomiale e non microsomiale, mediante la *clearance* della lidocaina (formazione di MEGX). Il metabolismo della lidocaina sembra essere perfettamente correlato alla funzionalità epatica e potrebbe rappresentare il parametro biochimico di fondamentale importanza nella valutazione del paziente soprattutto se epatopatico;
- il metabolismo microsomiale, mediante lo studio cinetico dell'antipirina, trasformata a livello microsomiale epatico in quattro diversi metaboliti escreti con le urine, e che consente quindi di ottenere una valutazione sia della capacità metabolica del sistema ossidativo epatico, sia della funzionalità renale.

La presenza di *poor metabolizer* 2D6 è stata esclusa con il test del destrometorfano.

Una volta caratterizzati secondo tutti i *marker* i soggetti volontari sono stati sottoposti in sequenza a tre diversi trattamenti prescelti allo scopo di costituire un modello per altri farmaci in funzione della disponibilità di metodiche di dosaggio affidabili:

- *amlodipina*: farmaco modello di lunga emivita con metabolismo prevalentemente epatico;
- *digossina*: per la caratterizzazione cinetico/metabolica di un farmaco ad emivita lunga con eliminazione mista (intestinale, epatica e renale);
- *tobramicina*: antibiotico altamente polare e non soggetto a secrezione tubulare, modello di farmaco a eliminazione prevalentemente renale.

Lo studio è stato dapprima condotto sui giovani volontari sani per ottenere i modelli da applicare in seguito ai 20 soggetti di ambo i sessi di età superiore ai 70 anni. Dai dati ottenuti nel gruppo dei giovani, le cui caratteristiche sono riassunte in Tabella 1, sono stati quindi calcolate le variabili farmacocinetiche di interesse:

- Volume di distribuzione (Vd),
- Area sotto la curva (AUC),
- Tempo di dimezzamento (T/2),
- Concentrazione massima (C_{max}),
- e *Clearance* totale (Cl),

riguardanti digossina, tobramicina, antipirina e amlodipina.

Tabella 1. Caratteristiche dei giovani volontari sani studiati

Caratteristica	Femmine	Maschi
Numero (n.)	5	5
Età (range, in anni)	21-28	21-31
Peso (kg± ES)	56,3±9,2	74,7±6,7
Altezza (cm ± ES)	168,0±7,0	180,9±4,6
BMI (kg/m ² ± ES)	19,9±2,7	22,7±3,4

Le variabili farmacocinetiche sono state poi analizzate con il *Pearson moment correlation test* per evidenziarne le possibili correlazioni con gli altri dati ottenuti dallo studio.

Diversi parametri analizzati dallo studio sono risultati significativamente correlati alle variabili farmacocinetiche di interesse. Individuati i parametri predittivi possibili, sono stati ricercati modelli matematici in grado di determinare a priori il comportamento farmacocinetico dei farmaci, basandosi su dati facilmente ottenibili. I modelli sono stati quindi analizzati con la tecnica della regressione multipla lineare. Sono invece state volutamente ignorate tecniche più sofisticate che avrebbero forse permesso di ottenere modelli matematicamente più precisi, ma più complessi e più difficilmente applicabili nella pratica clinica.

I modelli formulati riguardano le costanti farmacocinetiche già elencate, possono essere di estremo interesse per il clinico e devono quindi risultare di semplice e immediata applicazione. Del tutto soddisfacenti appaiono i modelli ottenuti per le variabili farmacocinetiche della digossina in steady state e dell'amlodipina, con indici di correlazione (R²) che variano tra 0,89 e 0,95 (Tabelle 2 e 3).

Tabella 2. Modelli matematici per la previsione delle variabili farmacocinetiche della digossina nella popolazione giovane

Variabile	Modello matematico	R ²	p
AUC	= 1068,1 + (284,5 * BMI) - (164,1 * Peso Massa Grassa) - (96,6 * Massa cellulare) + (380,8 * Scambio Na/K) - (1,91 * Glicemia)	0,946	0,0404
	<i>oppure</i> = 1471,5 + (284,6 * BMI) - (172,7 * Peso Massa Grassa) - (99,6 * Massa cellulare)	0,945	0,0014
Cl tot	= 193,2 - (3,97 * Peso) - (8,79 * Massa cellulare) - (317,7 * Scambio Na/K) + (0,407 * Metabolismo Basale)	0,913	0,00213
Vd	= 1241,1 + (3,09 * Peso) - (13,0 * percentuale H ₂ O corporea) - (15,5 * Peso Massa Grassa) - (293,1 * Scambio Na/K)	0,885	0,0363
T/2	= 5,74 + (1,57 * BMI) - (0,925 * Peso Massa Grassa) - (0,543 * Massa cellulare) + (1,96 * Scambio Na/K)	0,946	0,0085
	<i>oppure</i> = 8,16 + (1,58 * BMI) - (0,957 * Peso Massa Grassa) - (0,553 * Massa cellulare)	0,945	0,0014
C_{max}	= -4,31 - (0,0107 * Peso) + (0,0921 * percentuale H ₂ O corporea) + (0,111 * Peso Massa Grassa) - (0,0142 * Glicemia)	0,896	0,0302

Tabella 3. Modelli matematici per la previsione delle variabili farmacocinetiche dell'amlodipina nella popolazione giovane

Variabile	Modello matematico	R ²	p
Picco	= 31,1 - (1,50 * H ₂ O Totale) + (0,937 * Peso Massa Magra) - (0,245 * Massa cellulare)	0,819	0,0264
AUC	= 14,3 - (0,340 * H ₂ O Totale) + (0,427 * % Massa Grassa) + (0,441 * H ₂ O Extracellulare)	0,862	0,0136
T/2	= 16,6 - (0,393 * H ₂ O Totale) + (0,493 * % Massa Grassa) + (0,510 * H ₂ O Extracellulare)	0,862	0,0136
Cl	= -5,69 - (0,406 * BMI) + (0,237 * H ₂ O %) + (0,132 * Peso Massa Grassa) + (0,106 * % Massa Magra)	0,916	0,0199
Vd	= -1,72 - (0,304 * BMI) + (0,0650 * H ₂ O %) + (0,0181 * Peso Massa Grassa) + (0,184 * % Massa Magra)	0,897	0,0296

Le variabili inserite nei modelli riguardanti i due farmaci sono state per lo più ottenute con lo studio della composizione corporea mediante l'impedenziometria, tecnica del tutto non invasiva, semplice e di rapida esecuzione.

Leggermente meno soddisfacenti dal punto di vista statistico sono risultati i modelli riguardanti le variabili farmacocinetiche della tobramicina con indici di correlazione (R²) che variano tra 0,65 e 0,94 (Tabella 4). La minor precisione è verosimilmente legata al tipo di variabili che risultano correlate e sono assai diverse da soggetto a soggetto e in particolare al fatto che, come del resto atteso, l'eliminazione della tobramicina è in prevalenza regolata dalla funzionalità renale, con un minore influsso della struttura corporea. E' comunque da sottolineare che l'indice di correlazione risulta del tutto soddisfacente per quanto riguarda tre dei cinque modelli studiati, in particolare il modello di previsione della *clearance* totale (R²= 0,74), del volume di distribuzione (R²= 0,94) e della concentrazione massima (R²= 0,88).

Tabella 4. Modelli matematici per la previsione delle variabili farmacocinetiche della tobramicina nella popolazione giovane

Variabile	Modello matematico	R ²	p
AUC	= 8217,5 - (8,84 * Creatinina Clearance) - (18174,6 * Bilirubina esterificata)	0,656	0,0239
Cl	= 6,79 + (0,104 * Creatinina Clearance) - (0,0634 * Clearance dell'antipirina) + (204,9 * Bilirubina esterificata)	0,741	0,0340
Vd	= 0,391 + (0,148 * Creatinina Clearance) - (0,220 * Clearance dell'antipirina) + (155,1 * Bilirubina esterificata) - (0,140 * Peso Massa Magra)	0,940	0,0105
T/2	= 2,60 - (0,00282 * Creatinina Clearance) + (0,00951 * T/2 dell'antipirina) - (5,64 * Bilirubina esterificata)	0,659	0,0446
C_{max}	= -2,18 - (0,0165 * Volume di distribuzione dell'antipirina) + (0,0342 * Glicemia) - (0,00610 * Alfa-amilasi)	0,884	0,0032

Caratterizzati così i modelli di previsione del comportamento farmacocinetico dei tre farmaci, le stesse indagini sono state svolte in un gruppo di venti anziani. Questo secondo gruppo è risultato composto di 12 donne e 8 uomini, di età 70-78 anni (media: 72,85 anni), altezza 154-172 cm (media: 164,2 cm), e peso 52-76 kg (media: 66,35 kg).

Le variabili farmacocinetiche osservate negli anziani sono quindi state confrontate con le previsioni basate sui modelli ottenuti nei giovani, evidenziando differenze, come atteso tra il modello matematico sviluppato nel 1° gruppo e il comportamento farmacocinetico nel 2° gruppo. Le differenze tra i due gruppi sono evidentemente legate soprattutto alla diversa composizione corporea.

Abbiamo quindi verificato la possibilità di modificare i modelli adattandoli ad entrambe le popolazioni (n. = 30). Tale operazione è risultata possibile solo per la digossina, consentendo l'elaborazione di 5 modelli modificati per le relative variabili farmacocinetiche con una ottima affidabilità statistica (Tabella 5).

Tabella 5. Modelli matematici per la previsione delle variabili farmacocinetiche della digossina nell'intero campione di popolazione giovane e anziana (n. = 30)

Variabile	Modello matematico	R ²	p
Vd	= 694,0 + (5,91 * Peso) – (9,19 * H ₂ O %) – (12,3 * Peso Massa Grassa) – (12,2 * H ₂ O Extracellulare)	0,736	< 0,01
T/2	= 54,2 – (0,503 * Peso) – (0,596 * Reattanza) + (0,569 * Peso Massa Grassa) + (3,72 * Angolo di Fase)	0,798	< 0,01
Picco	= 2,16 – (0,0210 * Reattanza) + (0,0754 * Angolo di Fase) – (0,0171 * Massa Cellulare)	0,597	< 0,01
CI	= 30,9 + (2,09 * Peso) – (1,74 * Peso Massa Grassa) – (5,94 * H ₂ O Extracellulare)	0,753	< 0,01
AUC	= 9340,3 – (46,6 * Peso) – (64,3 * Reattanza) + (52,2 * Peso Massa Grassa)	0,734	< 0,01
T48h	= -0,302 + (0,00146 * Altezza) + (0,00917 * % Peso Massa magra) + (0,000228 * Metabolismo Basale) - (0,0205 * H ₂ O intracellulare)	0,618	< 0,05

La difficoltà di trovare parametri predittivi nella costruzione di modelli di previsione di comportamento farmacocinetico è dimostrata dal fatto che, negli ultimi 5 anni, solo una decina di lavori sono stati pubblicati su questo argomento. Non è quindi motivo di stupore se, nonostante i modelli per tobramicina e amlodipina ritrovati nella popolazione giovane fossero statisticamente molto attendibili, non è invece stato possibile adattarli anche alla popolazione anziana.

Seconda fase

Ci si è quindi posti l'obiettivo della verifica dei modelli matematici di previsione del comportamento farmacocinetico della digossina nell'anziano in una popolazione più ampia. A questo scopo sono stati selezionati soggetti anziani (età superiore a 70 anni), senza patologie atte a modificare la farmacocinetica della digossina: insufficienza renale o epatica, patologie croniche o acute intestinali, ipersensibilità o intolleranza alla digossina, neoplasie o processi infettivi acuti o cronici in atto, obesità eccessiva, demenza senile tipo Alzheimer, uso cronico di alcol.

Sono stati inoltre esclusi soggetti che assumessero farmaci in grado di determinare modifiche nell'assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione della digossina, quali antiacidi, diuretici, calcio, ferro, anticoagulanti orali, alcuni antiaritmici, colestiramina.

Allo scopo di ridurre al massimo il numero di soggetti statisticamente necessari alla validazione dei modelli, si è deciso di accentrare l'attenzione sui parametri farmacocinetici di maggiore interesse clinico per valutare la capacità di eliminazione del farmaco: la concentrazione al picco (2 ore dopo l'assunzione) e la concentrazione quella dopo 48 ore.

Tutti i volontari sono stati posti in terapia con digossina 0,125 mg per 5 giorni per raggiungere lo *steady-state*, la terapia è quindi stata interrotta per permettere la raccolta di campioni a 2 ore e a 48 dopo l'ultima somministrazione del farmaco. Il dosaggio dei livelli plasmatici di digossina è poi stato svolto con tecnica immunochimica su TDx. Oltre alle determinazioni delle due concentrazioni della digossina in tutti i volontari è stata condotta la determinazione di struttura e composizione corporea mediante impedenziometria.

Sono stati reclutati 72 volontari, un numero da ritenere considerevole, tenendo conto della difficoltà di trovare soggetti di età avanzata che non presentassero alcuna delle patologie rientranti nei criteri di esclusione e che non assumessero alcuno dei farmaci non permessi. Le caratteristiche dei soggetti sono espone in Tabella 6.

Tabella 6. Caratteristiche dei 72 volontari sani anziani studiati

VALORI?????	Sesso	Età (anni)	Altezza (cm)	Peso (kg)	BMI (m ² /kg)
Maschi					
<i>media</i>		75,18	164,55	69,52	25,29
<i>DS</i>		4,18	7,12	10,12	2,69
<i>range</i>		70-90	150-184	48-88	18-30
Femmine					
<i>media</i>		76,38	158,51	59,87	23,73
<i>DS</i>		5,82	6,08	9,67	3,27
<i>range</i>		70-91	146-172	42-78	18-30
Totale					
<i>media (M/F)</i>	33/39	75,83	161,28	64,29	24,59
<i>DS</i>		5,12	7,09	10,66	3,09
<i>range</i>		70-91	146-184	42-88	18-30

Basandosi sui modelli matematici di previsione messi a punto precedentemente, sono quindi state calcolate le concentrazioni di digossina ai tempi 2 ore e 48 ore, tali valori sono quindi stati confrontati con i valori determinati con tecnica immunochimica su TDx (Tabella 7).

Tabella 7. Confronto dei valori misurati e di quelli ottenuti dai modelli per la digossina

	T2h misurato	T2h calcolato	T48h misurato	T48h calcolato
Media	121,6	104,1	47,7	35,2
ES	5,41	1,45	3,59	0,78

I livelli, calcolati direttamente o indirettamente mediante il modello, sono assai vicini. La correlazione è al limite della significatività statistica, con la tecnica della regressione lineare tra valore calcolato/valore misurato. Si nota che una parte (circa il 50%) delle correlazioni ricadono

nel 95% dell'intervallo di confidenza, mentre praticamente tutte ricadono nell'intervallo di confidenza del 50%, solo 4 correlazioni per il tempo 2 ore e 2 per il tempo 48 ore essendo fuori da tale intervallo (Figure 1 e 2, in cui gli *outliers* non sono rappresentati).

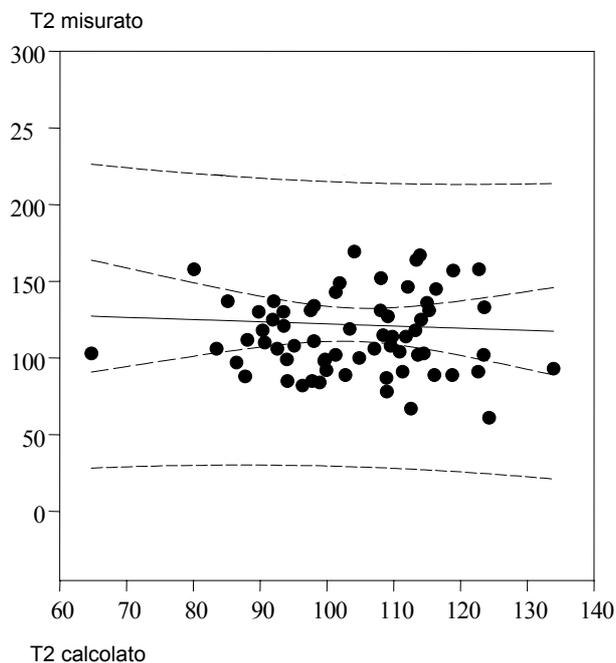


Figura 1. Correlazione tra i valori misurati e calcolati al tempo 2h

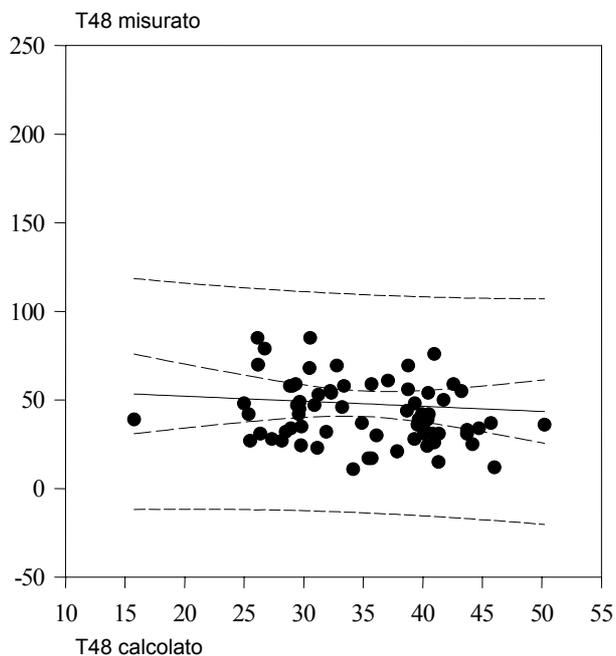


Figura 2. Correlazione tra i valori misurati e calcolati al tempo 48h

La procedura statistica impiegata era da un lato assai conservativa, d'altro lato è in corso di attento esame la popolazione studiata, per esaminare l'eventuale influsso di dati clinici (creatininemia, elettroliti, ecc.) che possono avere influenzato i risultati ottenuti. L'obiettivo finale è quello di poter identificare una popolazione di anziani per i quali la sola conoscenza della struttura corporea (indagine semplice, di basso costo, rimborsata dal Servizio Sanitario Nazionale) possa essere sufficiente alla prescrizione di dosi standard di digossina, e viceversa di definire per quali pazienti, inclusi naturalmente quelli con patologie d'organo, il monitoraggio dei livelli ematici, tecnica farmacologica clinica complessa e di costo elevato, appaia indispensabile.

Terza fase A

Obiettivo di questa fase degli studi è stato quello, in collaborazione con il Dipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia delle Sostanze Biologicamente Attive, Università "La Sapienza" di Roma, di saggiare nuovi approcci per lo studio cinetico di composti chirali. Farmaci sotto forma di miscele racemiche costituiscono oltre il 40% dei composti disponibili e pongono problemi significativi nella valutazione cinetica in terapia diretta, specie nell'anziano. Il composto esaminato è stato il sotalolo, un beta-bloccante di ampio uso con significativa attività antiaritmica. Come presentato dal gruppo di roma nel corso di questa riunione, abbiamo raccolto dati sul volontario sano, sottoposto a somministrazione di sotalolo, dimostrando la possibilità di impiegare una colonna a separazione diretta per la misura dei due enantiomeri, senza derivatizzazione pre-colonna. Questa osservazione, estendibile ad altri prodotti, dimostra la fattibilità di un metodo rapido, assai affidabile, per la risoluzione di problemi non solo cinetici, ma anche di farmacologia clinica pratica in pazienti sottoposti a trattamenti farmacologici diversi.

Terza fase B

In questa fase del progetto è stata saggiata la competenza degli operatori in un programma classico di interazione farmacocinetica. Si è trattato di valutare in volontari sani il comportamento cinetico dell'omeprazolo vs pantoprazolo, un inibitore della pompa protonica apparentemente a minor rischio di interazioni, somministrati in associazione con claritromicina, l'antibiotico di maggior impiego nel trattamento della malattia ulcerosa da *Helicobacter* (9). I dati hanno dimostrato in modo convincente che la claritromicina aumenta del 64% l'AUC dell'omeprazolo e riduce del 42% la conversione al 4-OH metabolita; al contrario, non si è osservata alcuna variazione dei parametri farmacocinetici di pantoprazolo e suoi metaboliti. Questi dati dimostrano un potenziale rischio di interazione e confermano dati recenti che cautelano per l'uso dei macrolidi in terapia clinica, in presenza di altri substrati non solo CYP3A4.

Terza fase C

Nell'ambito del programma ISS sono state inoltre svolte una serie di indagini con l'obiettivo di acquisire nuove casistiche ben caratterizzate per studi riguardanti la variabilità farmacocinetica. Queste indagini sono state svolte in collaborazione con il Centro E. Grossi Paoletti dell'Università di Milano, centro leader nelle ricerche nell'ambito dei fattori di rischio, in particolare metabolici, per l'arteriosclerosi. Un importante studio è stato condotto a Limone sul Garda, una comunità già oggetto di ampi studi genetici. L'indagine ha consentito di definire, con l'impiego di tecniche non invasive, le condizioni cardiovascolari di questi soggetti, caratterizzati da un anomalo profilo lipidico. Le stesse valutazioni sono attualmente in corso in casistiche di pazienti con alterazioni genetiche ben caratterizzate del quadro lipidico/

lipoproteico (ipo-HDL, ipertrigliceridemie) (10). Le indagini oggetto di questa fase hanno infine preso in esame trattamenti non farmacologici, come gli acidi grassi n-3 (11), fino ad ora non oggetto di ricerche su variabili che possano influenzare il destino dei farmaci.

Bibliografia

1. Jelliffe R, Schumitzky A, Bayard D, Milman MM, *et al.* Model-based, goal-oriented, individualised drug therapy. *Clin Pharmacokinet* 1998;34:57-77.
2. Baumgartner RN, Chumlea WC, Roche AF. Bioelectric impedance phase angle and body composition. *Am J Clin Nutr* 1988;48:16-23.
3. Mahmood I. Prediction of *clearance*, Volume of distribution and half-life by allometric scaling and by use of plasma concentrations predicted from pharmacokinetic constants: a comparative study. *J Pharm Pharmacol* 1999;51:905-10.
4. Fliser D, Bischoff I, Hanses A, Block S, Joest M, Ritz E, Mutschler E. Renal handling of drugs in the healthy elderly. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55:205-11.
5. Yurchak AM, Franklin BA. Theophylline disposition in obesity. *Clin Pharmacol Ther* 1978;23:438-44.
6. Abernethy DR, Greenblatt DJ. Drug disposition in obese humans. An update. *Clin Pharmacokinetics* 1986;11:199-213.
7. Abernethy DR, Greenblatt DJ, Divoll M, Harmatz JS, Shader RI. Alterations in drug distribution and *clearance* due to obesity. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;217:681-5.
8. Lukaski HC, Johnson PE, Bolonchuk WW, Lykken GI. Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. *Am J Clin Nutr* 1985;41:810-7.
9. Hunt RH. Eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Med* 1996;100:42S-51S.
10. Sirtori CR, Calabresi L, Franceschini G, Baldassarre D, Amato M, Johansson J, Salvetti M, Monteduro C, Zulli R, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Cardiovascular status of carriers of the apolipoprotein A-IMilano mutant. The Limone sul Garda Study. *Circulation* 2001;103:1949-54.
11. Villa B, Calabresi L, Chiesa G, Risè P, Galli C, Sirtori CR. Omega-3 fatty acids ethyl esters increase heart rate variability in patients with coronary disease. *Pharmacol Res* 2002;45:475-8.

*Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità
e Direttore responsabile: Enrico Garaci*

*Coordinamento redazionale:
Paola De Castro e Sandra Salinetti*

*Stampato dal Servizio per le Attività Editoriali
dell'Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299 - 00161 ROMA*

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

Reg. Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Roma, dicembre 2002 (n. 4) 17° Suppl.

*La responsabilità dei dati scientifici e tecnici
pubblicati nei Rapporti e Congressi ISTISAN è dei singoli autori*