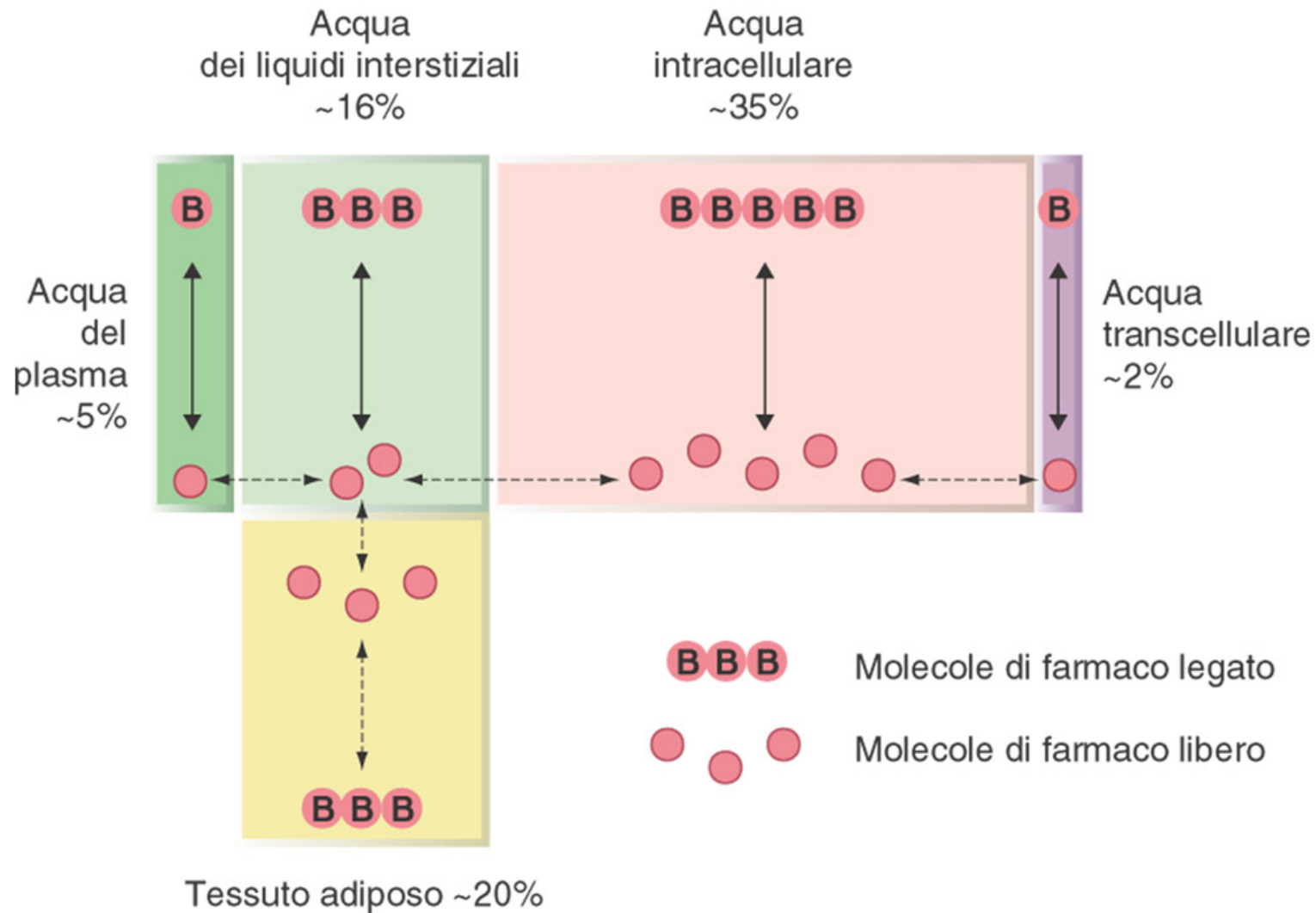


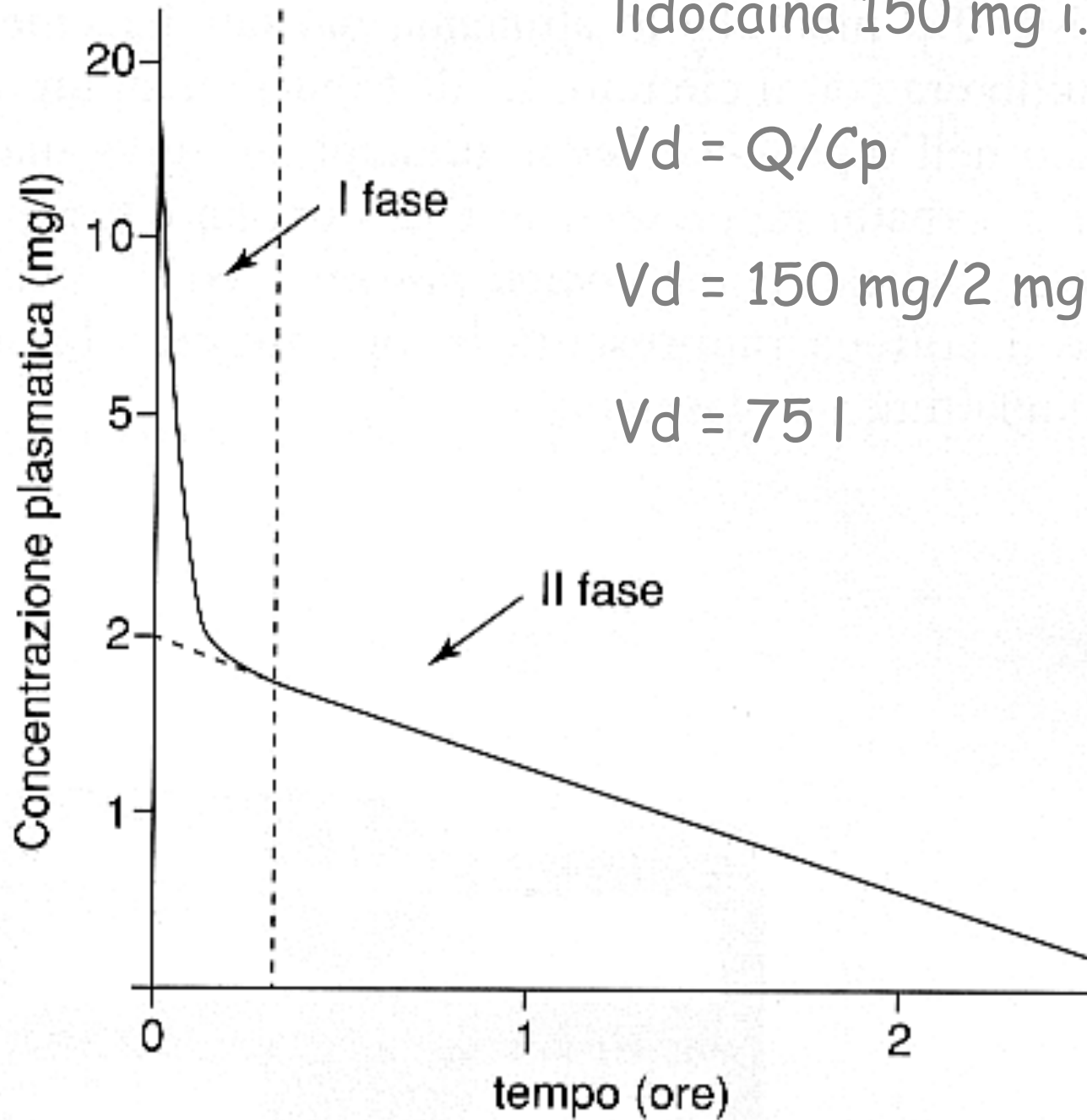
DISTRIBUZIONE DEI FARMACI



DISTRIBUZIONE DEI FARMACI

- Il volume di distribuzione (V_d) viene definito come il volume di liquido che conterrebbe la quantità totale di farmaco nell'organismo se questo avesse in quel volume una concentrazione uguale a quella plasmatica

$$V_d = Q/C_p$$



lidocaina 150 mg i.v.

$$Vd = Q/Cp$$

$$Vd = 150 \text{ mg} / 2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$Vd = 75 \text{ l}$$

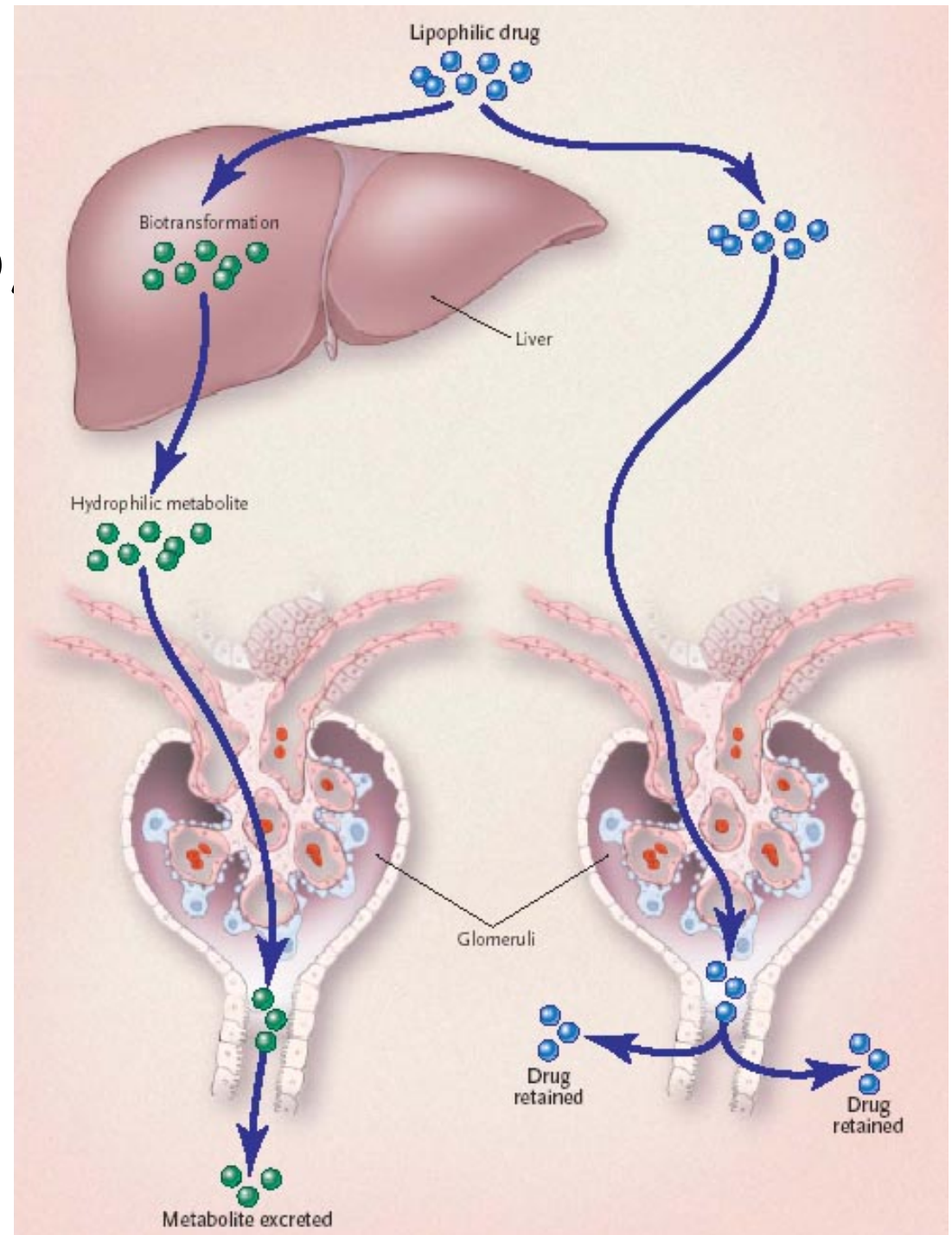
Distribuzione dei farmaci proteici e peptidici

- Il volume di distribuzione apparente è di solito relativamente piccolo
- Per i farmaci somministrati per via endovenosa è di solito uguale o appena maggiore del volume totale del plasma

Proteina	Peso molecolare (kDa)	Vd (l)
Eritropoietina	30,4	2,8 - 3,5
Anticorpi monoclonali	150	5,6

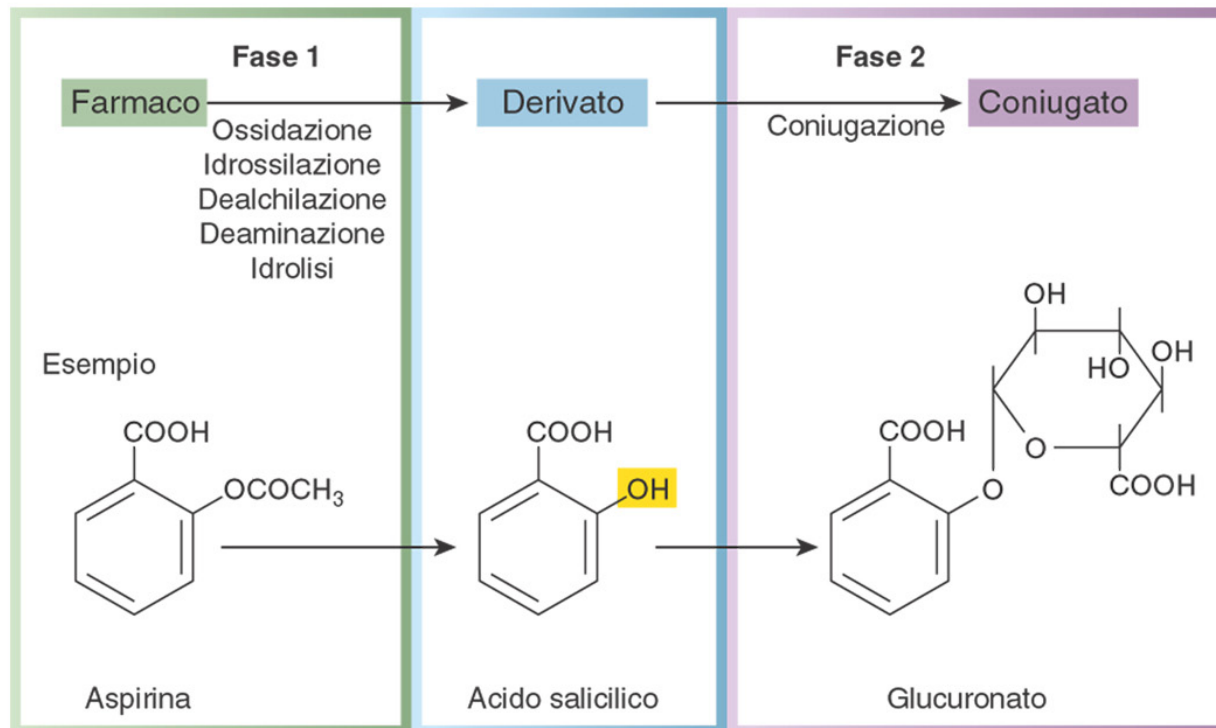
Biotrasformazione

- Avviene soprattutto ma non solo, nel fegato
- Rende i farmaci più polari, meno liposolubili e quindi più facilmente eliminabili dal rene

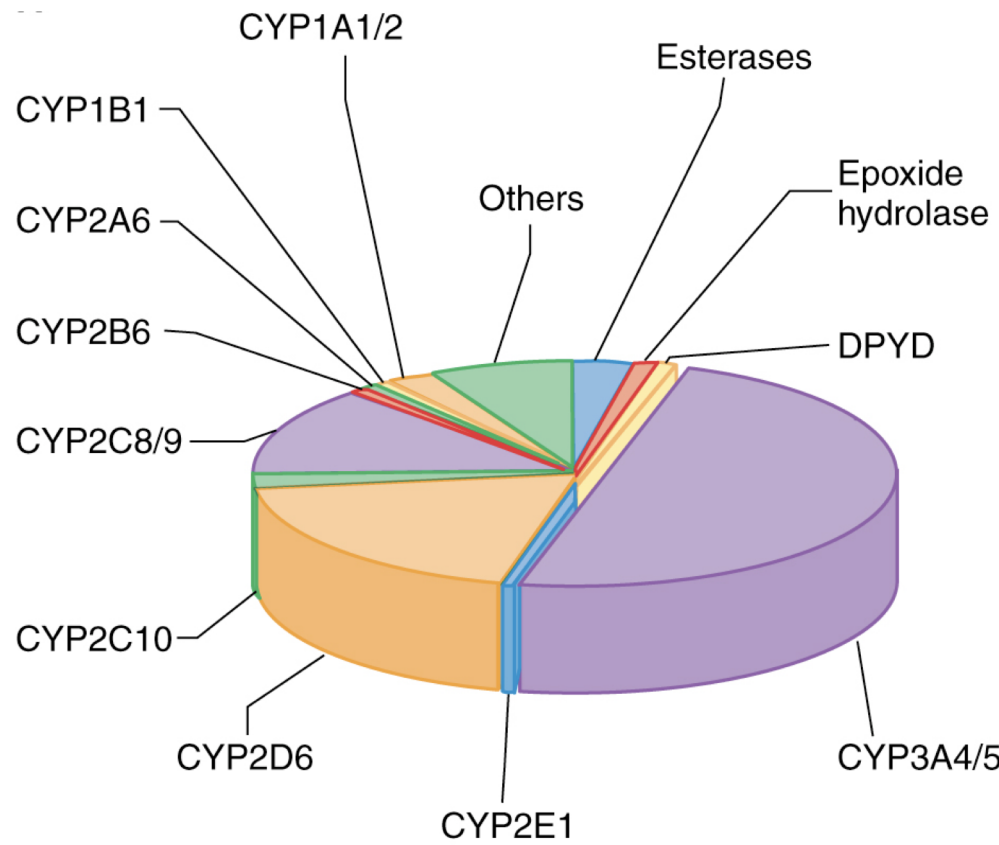


Metabolismo dei farmaci

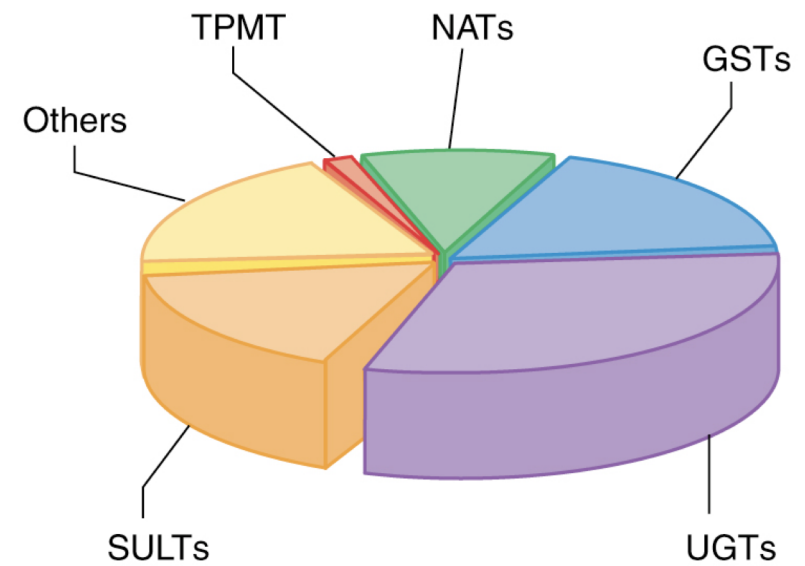
- **Reazioni di fase I o di funzionalizzazione:** hanno la finalità di inserire o mettere in evidenza gruppi funzionali di legame (-OH, -SH, -NH₂, -COOH) per le reazioni di coniugazione. Dal punto di vista chimico sono prevalentemente reazioni di ossidazione, riduzione, idrolisi
- **Reazioni di fase II o di coniugazione:** glicuroconiugazione, solfatazione, metilazione, acetilazione, coniugazione con aminoacidi, con glutazione....



Reazioni di fase 1



Reazioni di fase 2



Eliminazione

Molecular weight	Elimination site	Predominant elimination mechanisms	Major determinant
< 500	Blood, liver	Extracellular hydrolysis Passive lipid diffusion	Structure, lipophilicity
500–1,000	Liver	Carrier-mediated uptake Passive lipid diffusion	Structure, lipophilicity
1,000–50,000	Kidney	Glomerular filtration and subsequent degradation processes (see Fig. 4)	Molecular weight
50,000–200,000	Kidney, liver	Receptor-mediated endocytosis	Sugar, charge
200,000–400,000		Opsonization	α_2 -macroglobulin, IgG
> 400,000		Phagocytosis	Particle aggregation

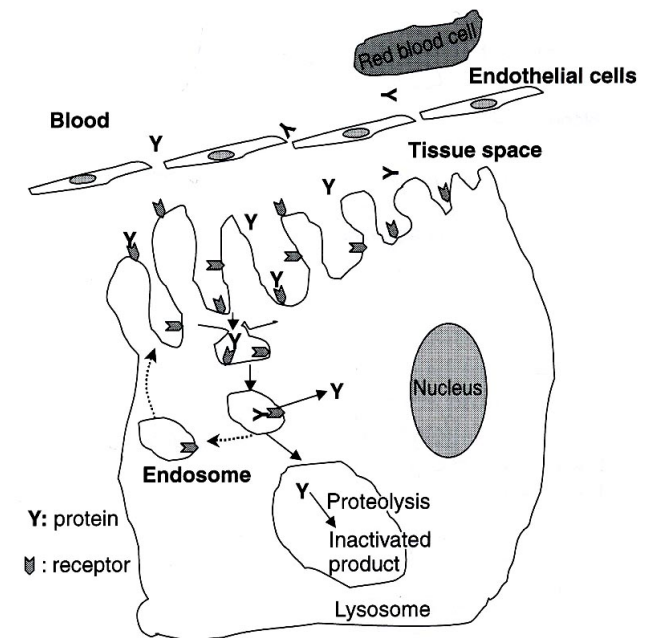
Note: Other determining factors are size, charge, lipophilicity, functional groups, sugar recognition, vulnerability for proteases, aggregation to particles, formation of complexes with opsonization factors, etc. Mechanisms may overlap and endocytosis may occur at any molecular weight range.

Source: After Meijer and Ziegler, 1993.

Table 1 ■ Molecular weight as major determinant of the elimination mechanisms of peptides and proteins.

Metabolismo epatico dei farmaci proteici e peptidici

- Entrano negli epatociti per endocitosi mediata da recettore (insulina, epidermal growth factor, glicoproteine)
- Vengono metabolizzate all'interno degli epatociti nei lisosomi (endopeptidasi poi esopeptidasi)



Eliminazione recettore mediata ad opera di altre cellule

- Per alcune molecole proteiche (> 200 kDa) è importante la fagocitosi mediata da recettore da parte di cellule specializzate, seguita dal catabolismo intracellulare
 - M-CSF (fattore di stimolazione delle colonie di macrofagi) e G-CSF (fattore di stimolazione delle colonie di granulociti) vengono captati dal midollo osseo tramite un processo recettore mediato e soggetto a saturazione

OPSONIZATION

COMPLEMENT-MEDIATED PHAGOCYTOSIS

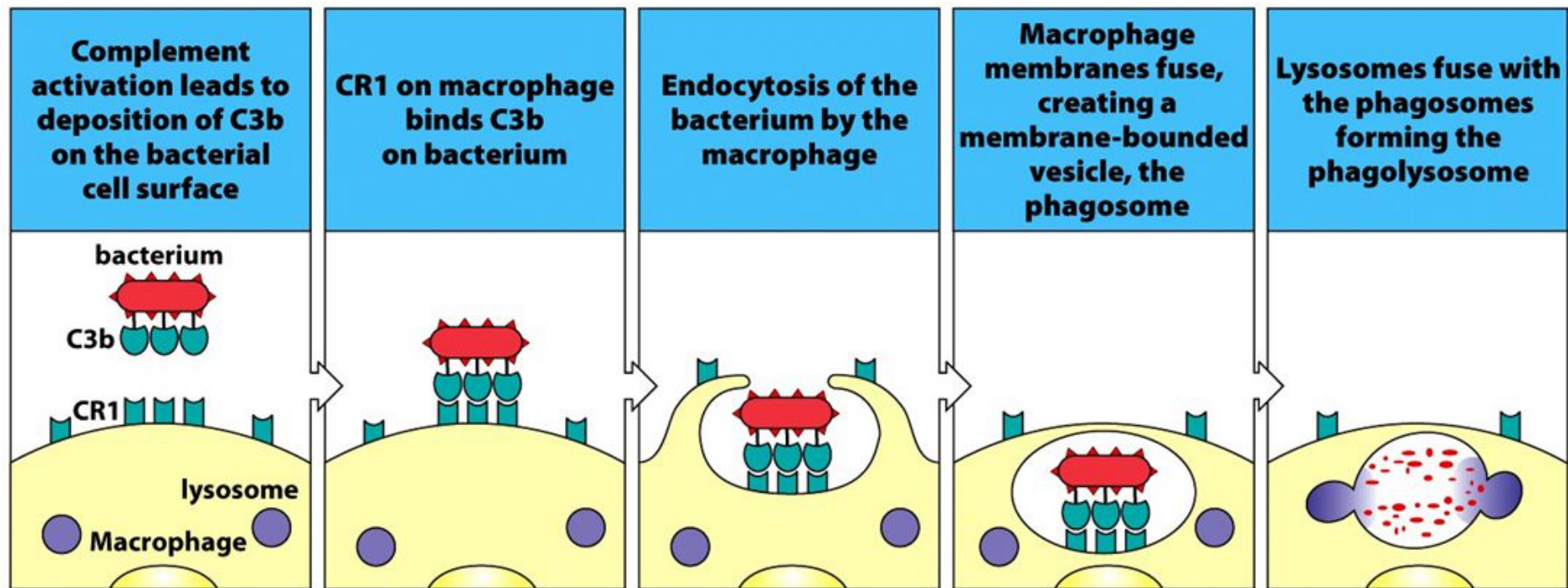
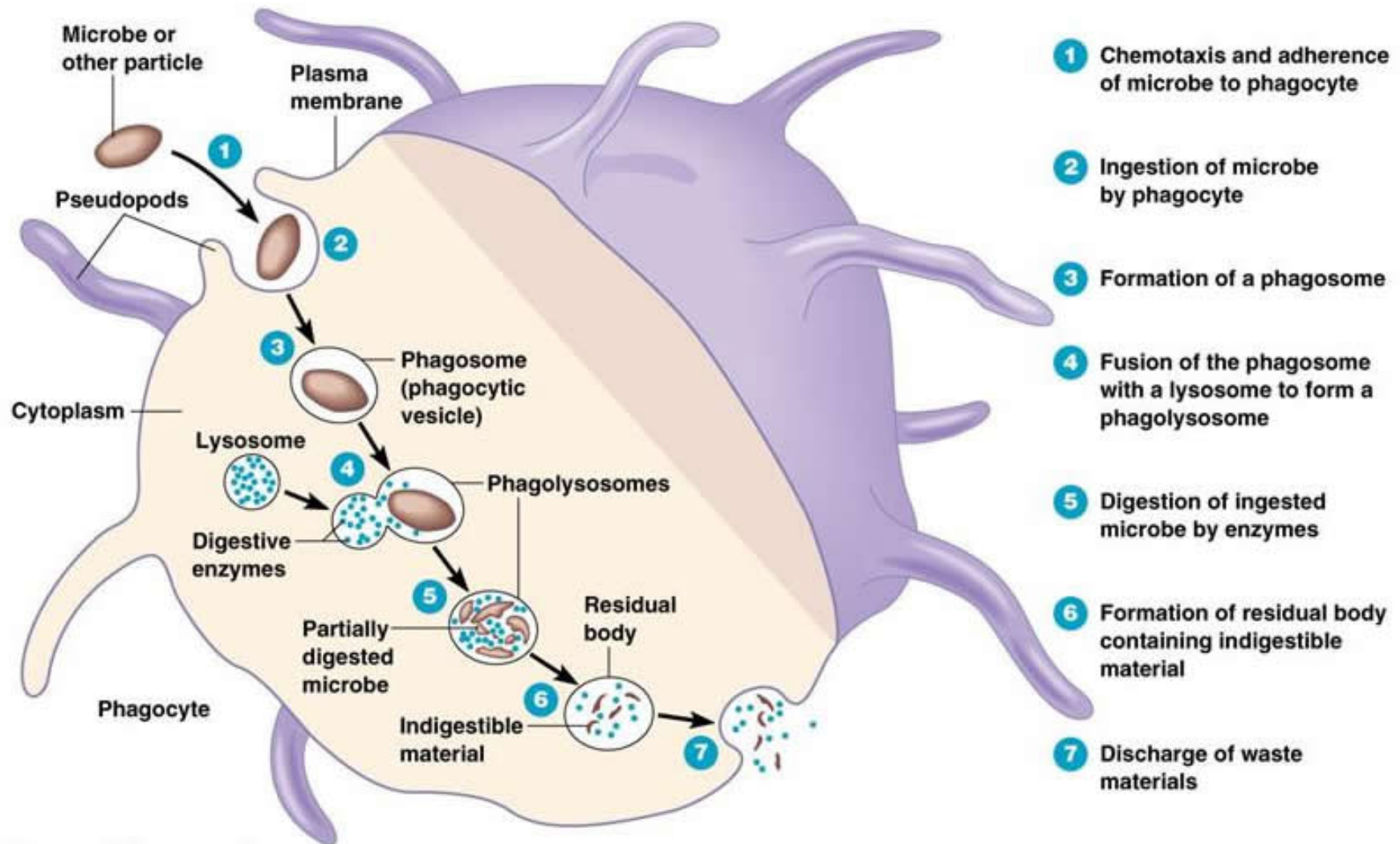
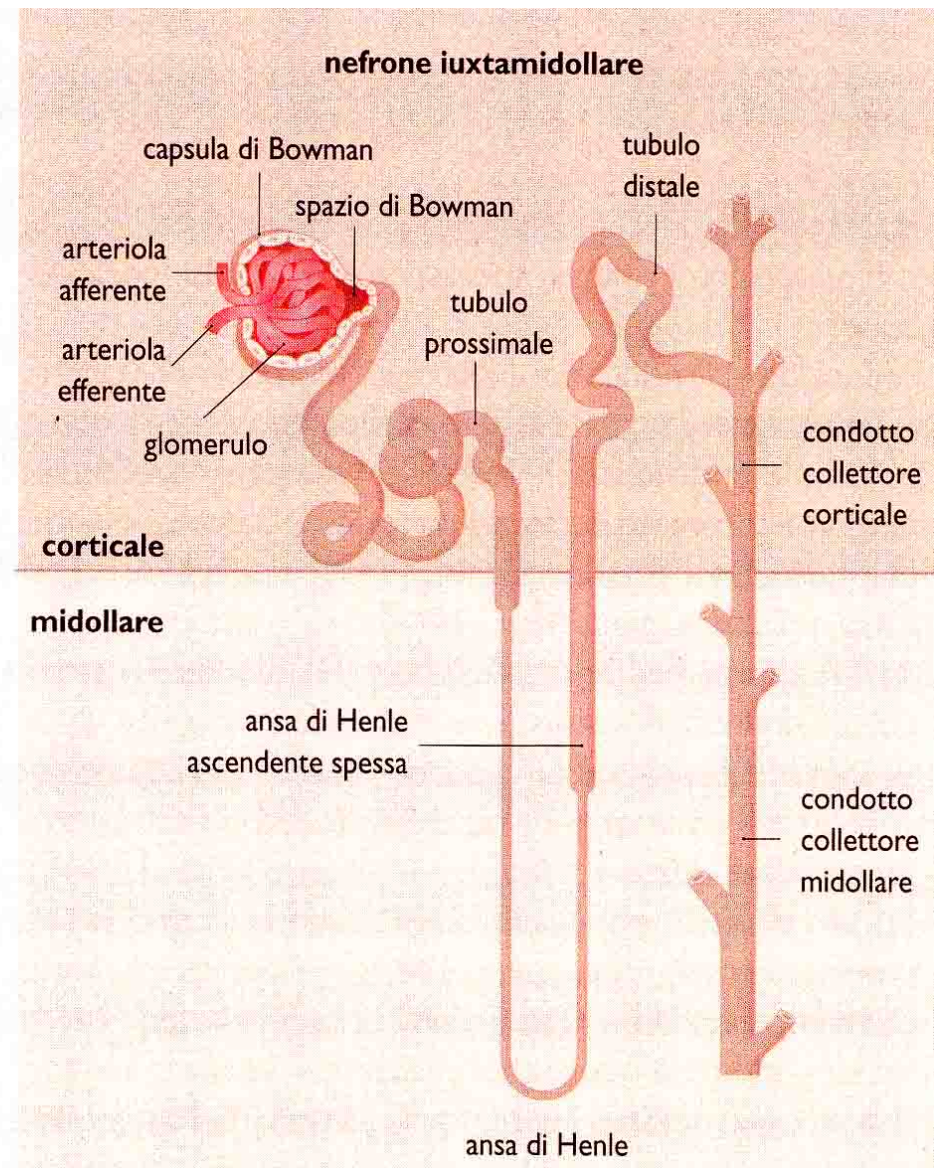
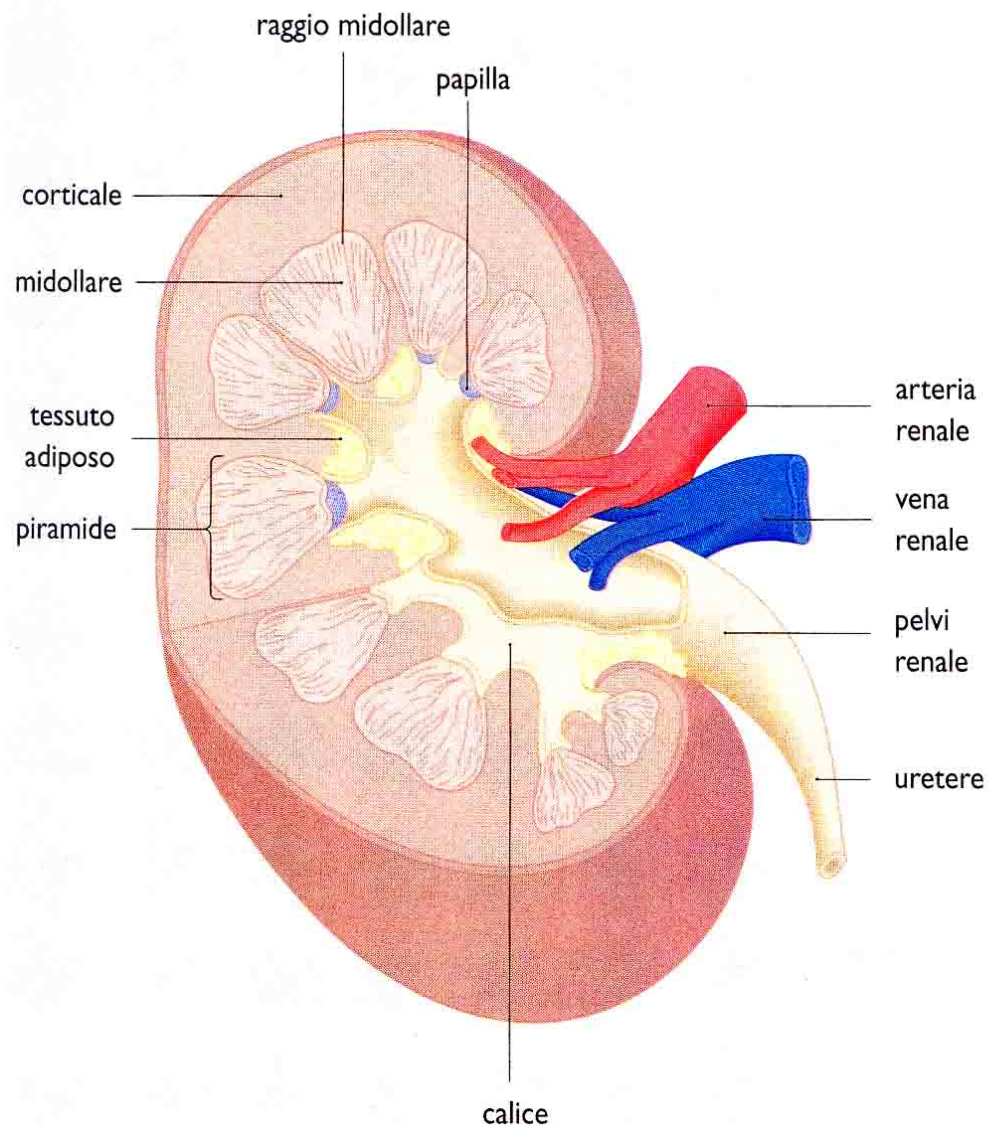


Figure 2.10 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)

Fagocitosi



Phases of phagocytosis



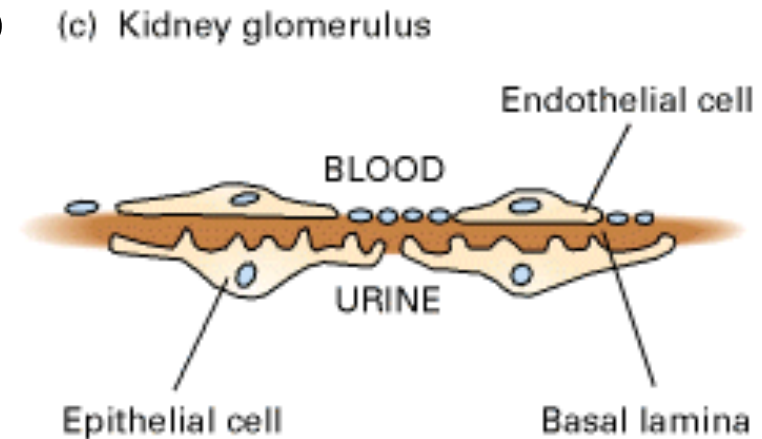
Escrezione renale: filtrazione

- Ogni giorno attraverso i reni passano circa 850 l di sangue (50 volte il volume dei liquidi extracellulari, 17 l)
- Circa il 20% del plasma che circola attraverso i reni viene filtrato
- il volume di preurina prodotto in 24 ore è di circa 170 l (20% di 850 l)
- il 65% viene riassorbito nel tubulo contorto prossimale, il 15% lungo la branca discendente dell'ansa di Henle, il 19% in parti uguali nel tubulo contorto distale e nel dotto collettore
- l' 1% dell' ultrafiltrato viene escreto nelle urine (1.7 l)

Filtrazione glomerulare

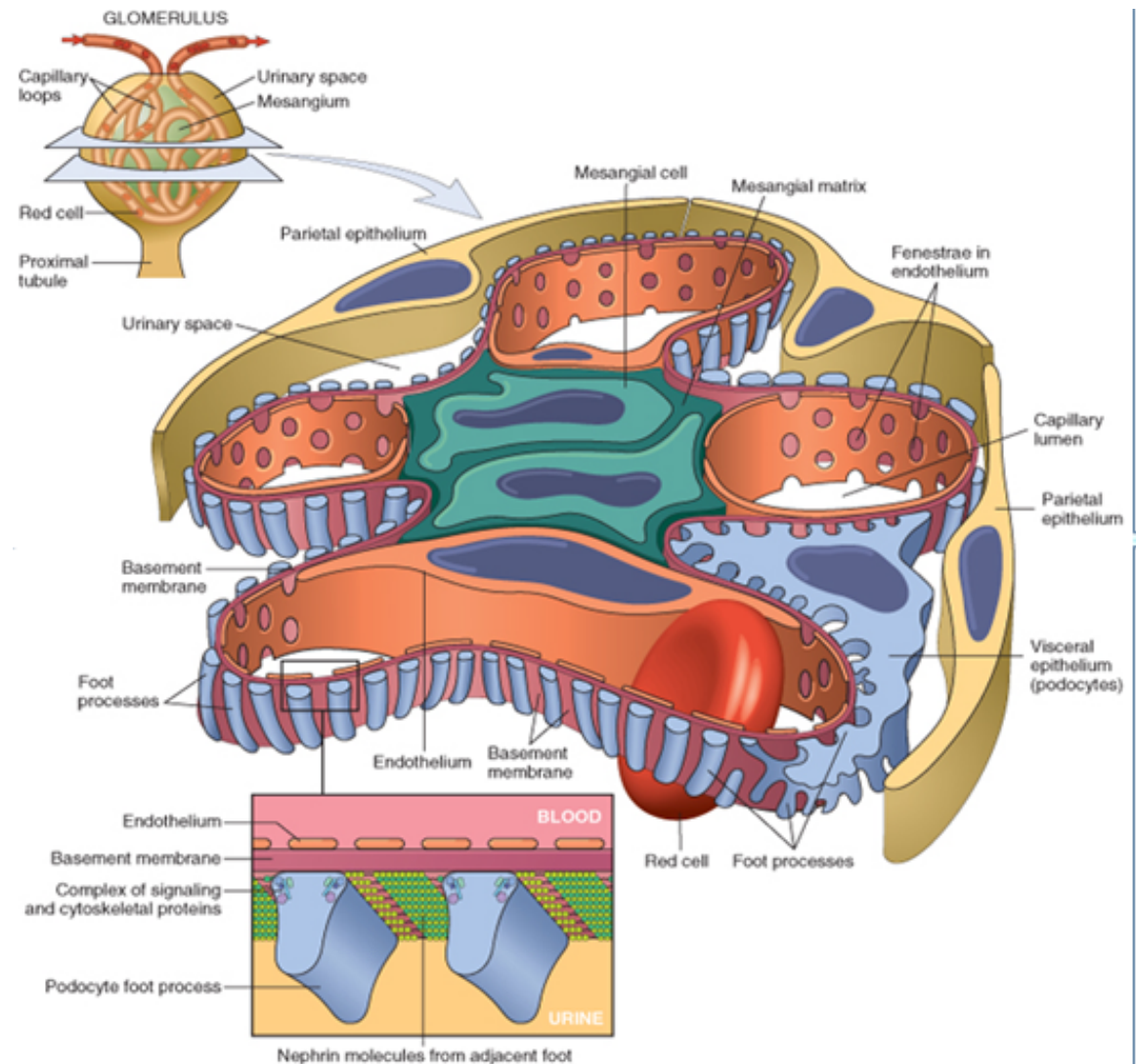
Il filtro glomerulare è costituito da tre strati che separano il lume dei capillari dallo spazio nella capsula di Bowman

- endotelio capillare: presenta ampie fenestrature con un diametro di 50-100 nm (non passano le cellule ematiche)
- lamina basale: reticolo tridimensionale di glicoproteine dotate di forte carica polianionica immerso in una matrice omogenea
- podociti dell'epitelio della capsula di Bowman: formano delle fessure di filtrazione di 20-50 nm, ma sono ulteriormente ricoperti dal glicocalice che permette il passaggio di molecole con raggio effettivo $< 1,5$ nm, ed è praticamente impermeabile a molecole con raggio $> 4,5$ nm. In pratica non vengono filtrate molecole con un PM > 60 kDa (passano bene quelle con pM < 20 kDa). Macromolecole polianioniche passano con maggior difficoltà rispetto a molecole neutre o cationiche



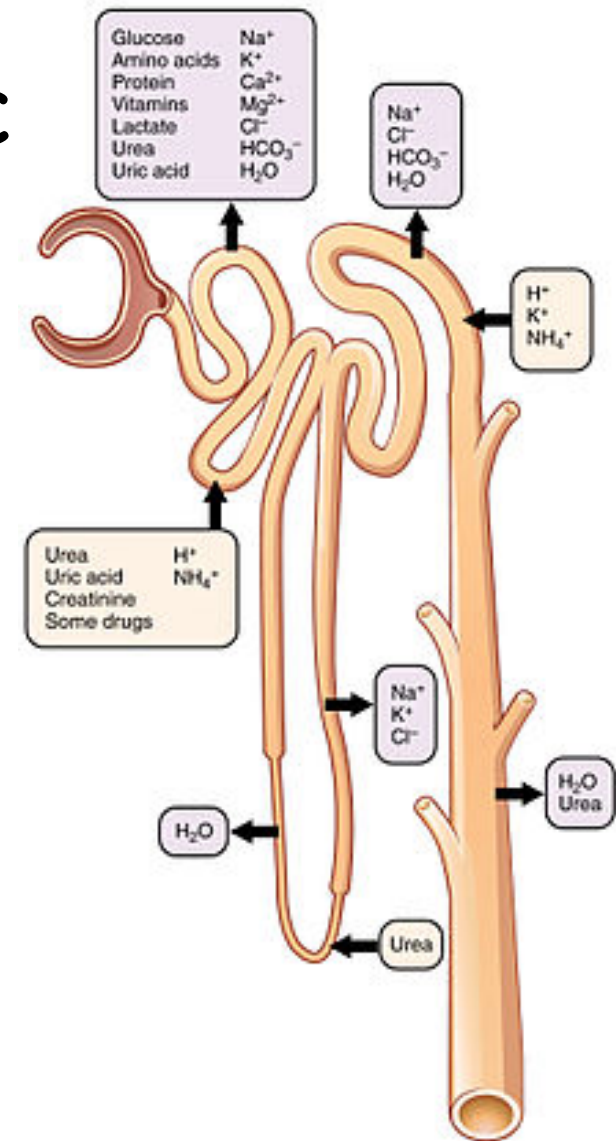
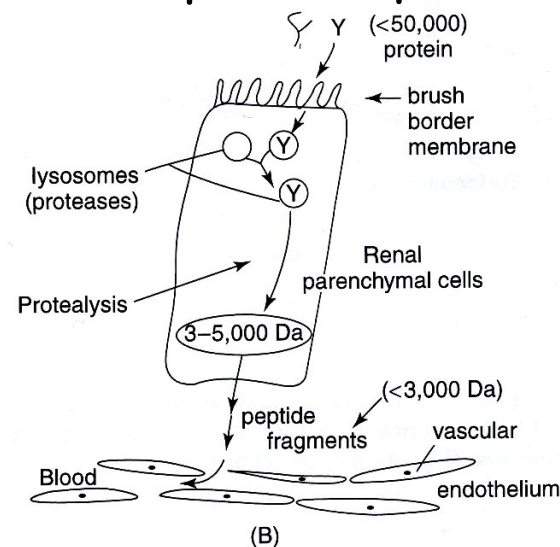
Escrezione renale dei farmaci proteici e peptidici

- Il rene è l'organo più importante nell'eliminazione delle molecole proteiche di piccole dimensioni (< 40 - 50 kDa) che vengono ultrafiltrate dal glomerulo



Escrezione renale dei farmaci proteici e peptidici

- riassorbiti dal tubulo prossimale per endocitosi e quindi degradate all'interno della cellula a piccoli peptidi e amminiacidi
- metabolizzati dalle esopeptidasi intraluminali nel tubulo prossimale; i frammenti riassorbiti da trasportatori di membrana (PEPT2)
- il metabolismo renale è importante per interleuchine, interferoni, TNF α , CSF
- Nell'urina si rilevano solo piccole quantità di proteina intatta



Si può modificare l'emivita dei farmaci biologici?

Immunoglobulin	MW (kDa)	$t_{1/2}$ (days)	Rate of Synthesis	Blood Concentration	Total Pool (/kg)	Rate of Metabolism (% per day)
IgG (IgG ₁ , IgG ₂ , IgG ₄)	150	21	32 mg/kg/d (2.2 g/d)	12 mg/ml	1.06 g	6.3%
IgG ₃	150	7–9	NA	NA	NA	NA
HSA (human serum albumin)	60	15–20	10 g/d	~50 mg/ml	3–4 g	5%
IgM	950	9.6	6.9 mg/kg/d	~1 mg/ml	37 mg	11%
IgA	160	5–6	30 mg/kg/d	~2 mg/ml	~220 mg	25%
IgD	175	3	0.4 mg/kg/d	0.02 mg/ml	1.5 mg	37%
IgE	190	2.5	0.016 mg/kg/d	0.3 mg/ml	~20 ng	NA
Mouse IgG ₂	150	5–10 & <1 ^a	NR	NR	NR	NR

Source: Data partly derived from Waldmann and Strober [44].

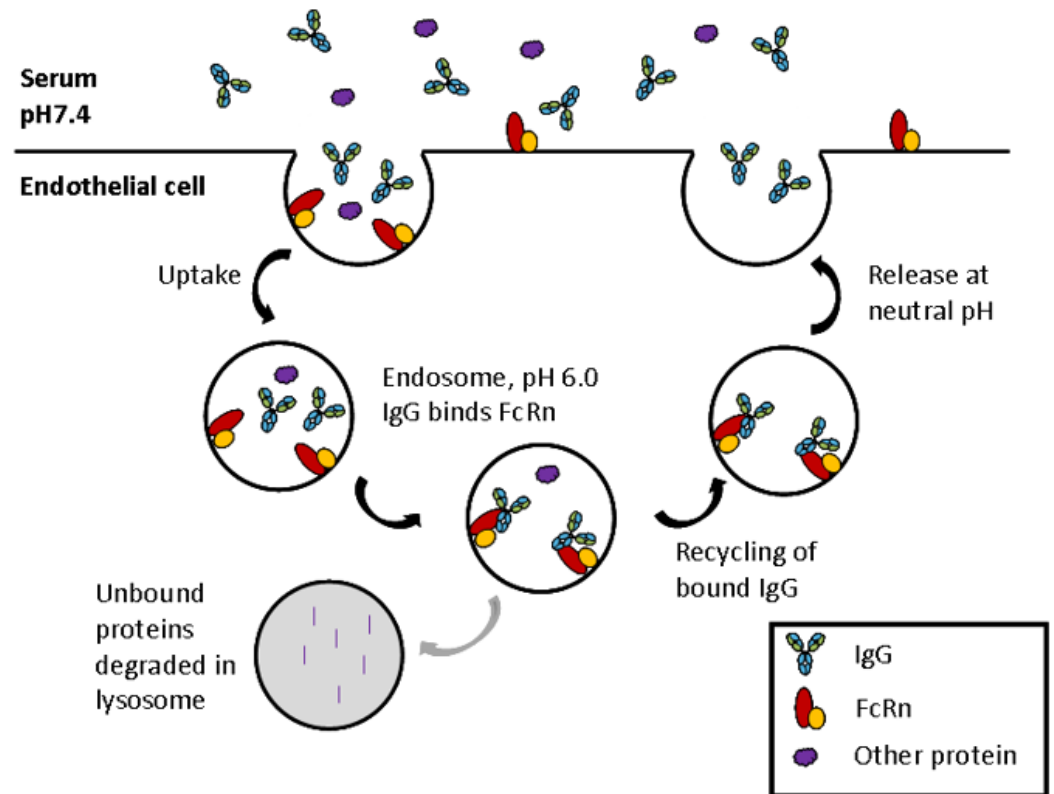
Note: NA, Not available.

NR, Not relevant.

^aHalf-life, $t_{1/2}$ for mouse IgG₂ is 5 to 10 days for the first dose and this value is reduced to less than 1 day after repeated dosing.

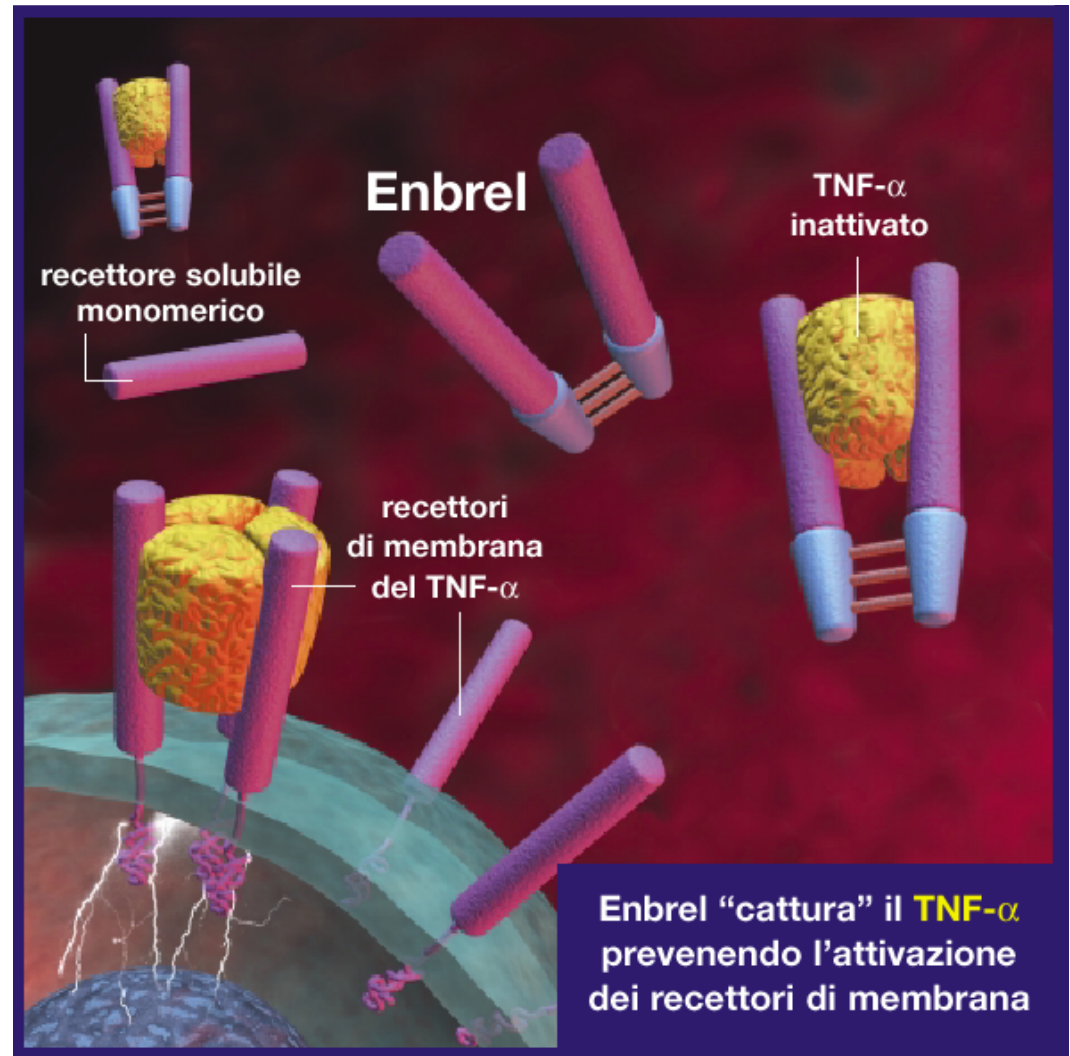
L'emivita delle IgG è relativamente lunga

- Il tempo di emivita di un anticorpo nel plasma è molto lungo anche per la proprietà delle IgG di legare delle proteine specifiche per Fc (FcRn o recettore di Brambell). Questa interazione stabilizza le IgG e previene la loro degradazione nel plasma.
- FcRn è un eterodimero di una catena alfa di 50 kDa ed una beta di 18 kDa chiamata beta 2-microglobulina.
- Il meccanismo molecolare con cui il recettore di Brambell protegge gli anticorpi comprende il legame a livello degli endosomi e la conseguente inibizione della degradazione da parte delle peptidasi nel sistema endosoma/lisosoma e le riporta sulla membrana dove vengono riciclati.

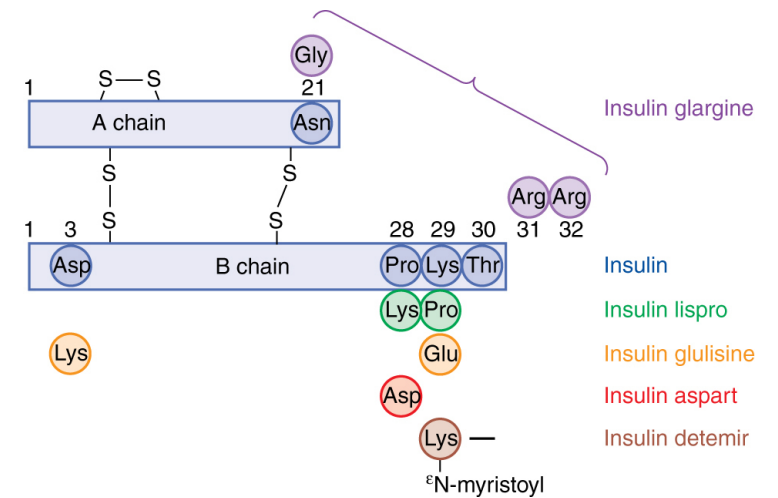


Utilizzo della porzione Fc per stabilizzare proteine ingegnerizzate: l'etanercept

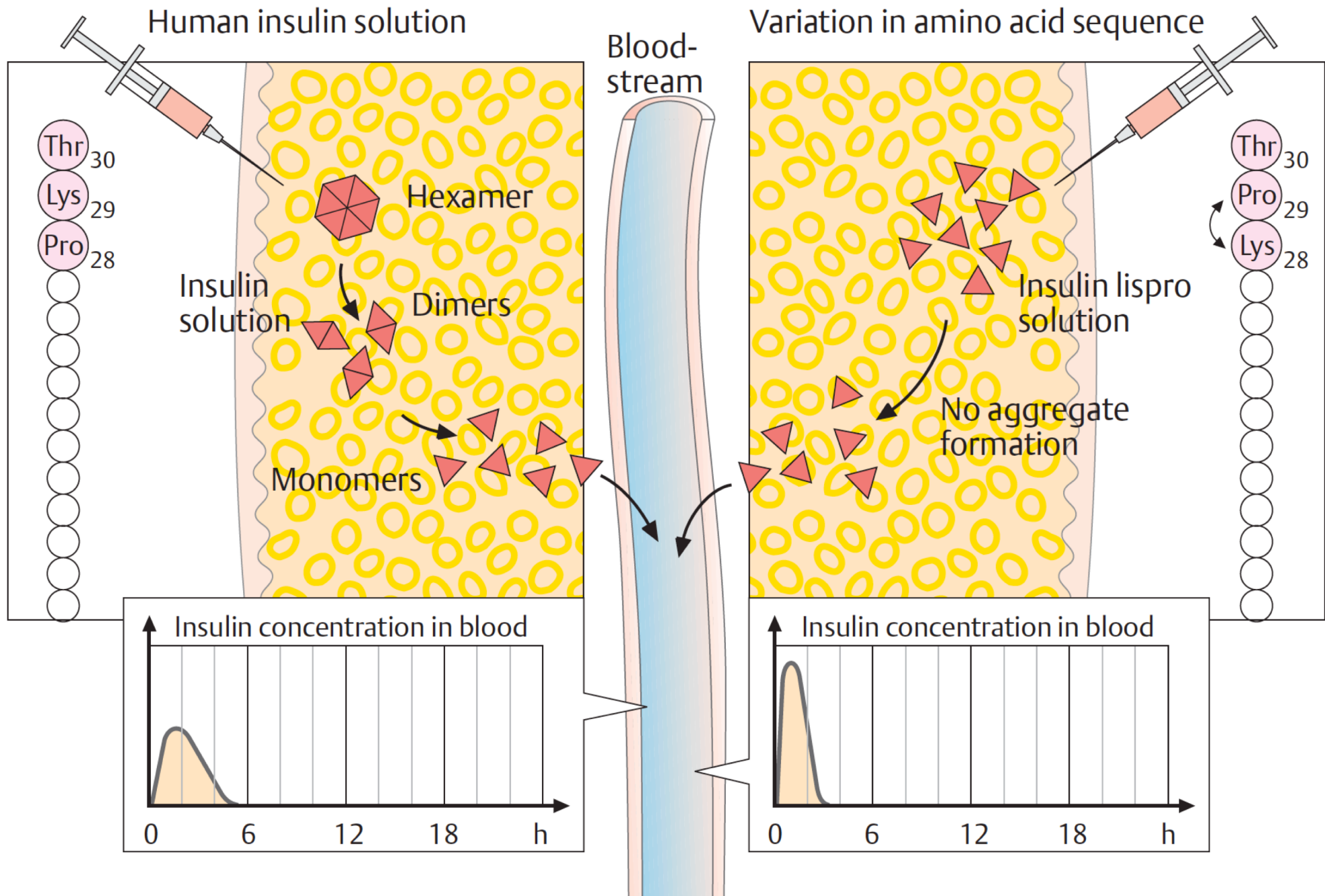
- Questo fenomeno è stato utilizzato per stabilizzare proteine di fusione prodotte a scopo terapeutico.
- Etanercept (Enbrel™), una proteina di fusione ricombinante fra il recettore per TNF α ed il frammento Fc è stata utilizzata con successo nel trattamento dell'artrite reumatoide.
- Efficacia clinica Etanercept legata anche all'aumento del tempo di emivita dovuto all'interazione del frammento Fc con il recettore di Brambell



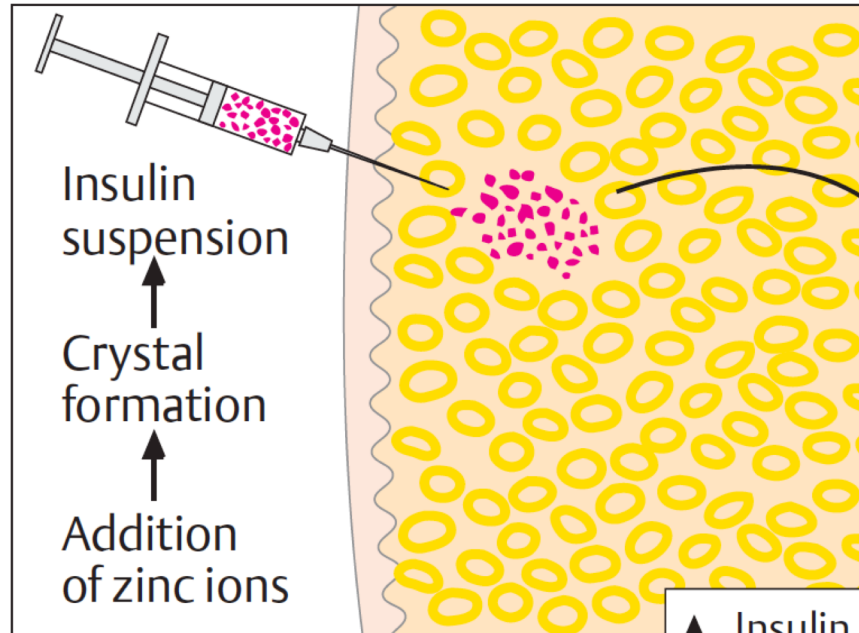
Preparazioni di insulina



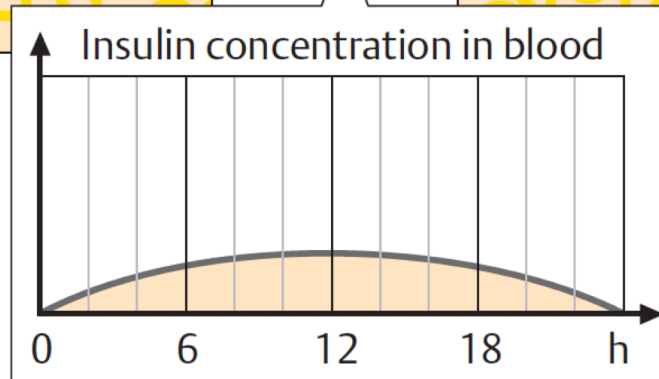
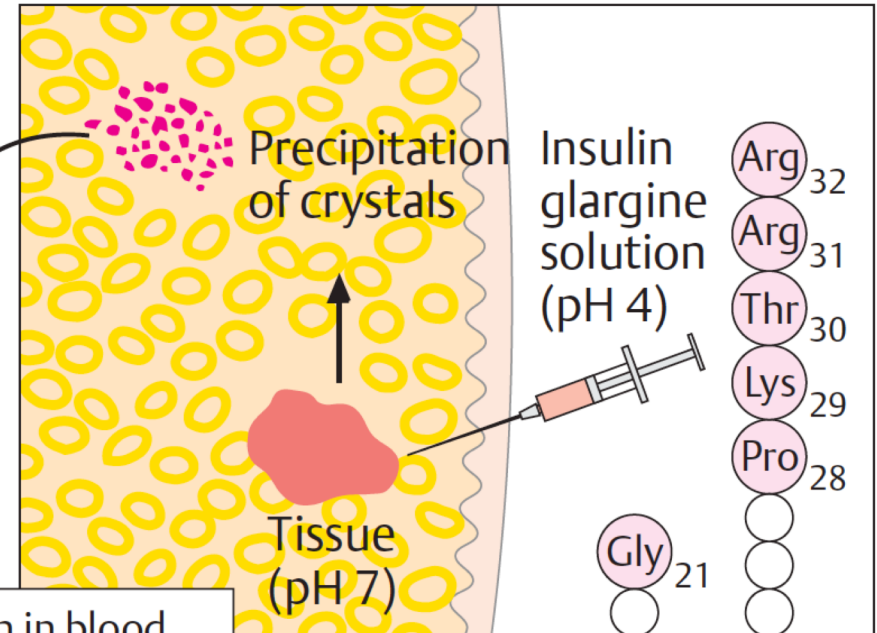
		Tempi di azione		
Preparazione		Insorgenza, h	Picco massimo, h	Durata effettiva, h
A breve durata d'azione				
	Aspart (Novorapid®)	<0,25	0,5-1,5	3-4
	Glulisina (Apidra®)	<0,25	0,5-1,5	3-4
	Lispro (Humalog®)	<0,25	0,5-1,5	3-4
	Regolare (Actrapid®, Insuman®..)	0,5-1,0	2-3	4-6
A lunga durata d'azione				
	Detemir (Levemir®)	1-4	Due picchi, uno dopo 2-3 h, il secondo parecchie ore più tardi	20-24
	Glargina (Lantus®)	1-4		20-24



Variation in formulation



Variation in amino acid sequence

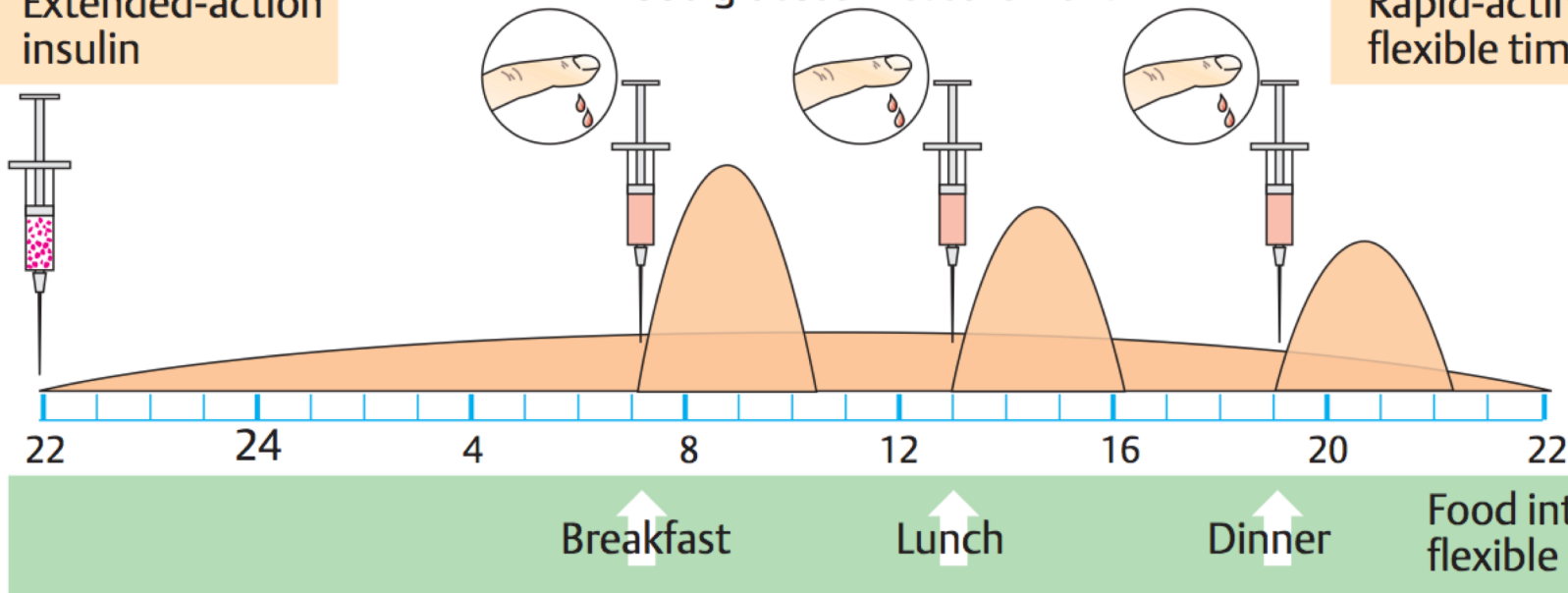


B. Methods of insulin replacement

Extended-action insulin

Blood glucose measurement

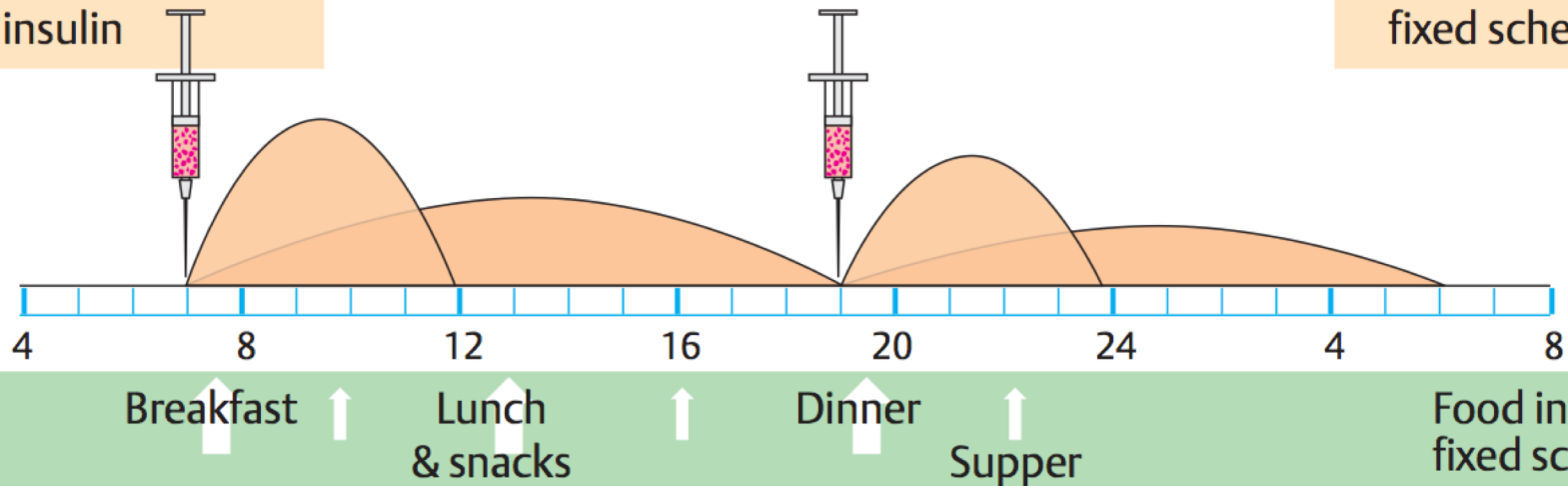
Rapid-acting insulin: flexible time and dose



1. Intensified insulin therapy

Combination insulin

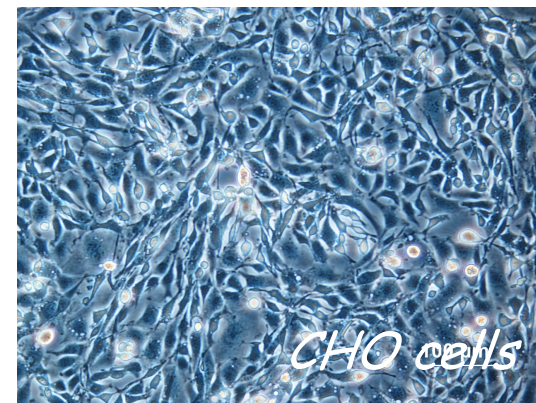
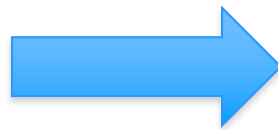
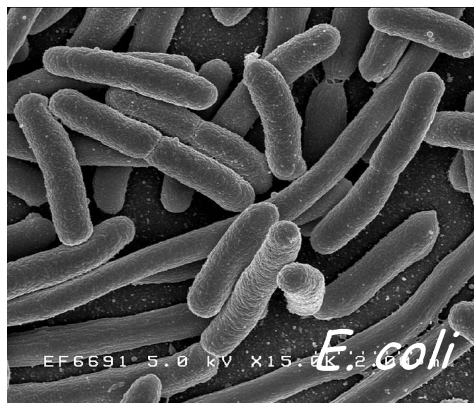
Insulin administration: fixed schedule



2. Conventional insulin therapy

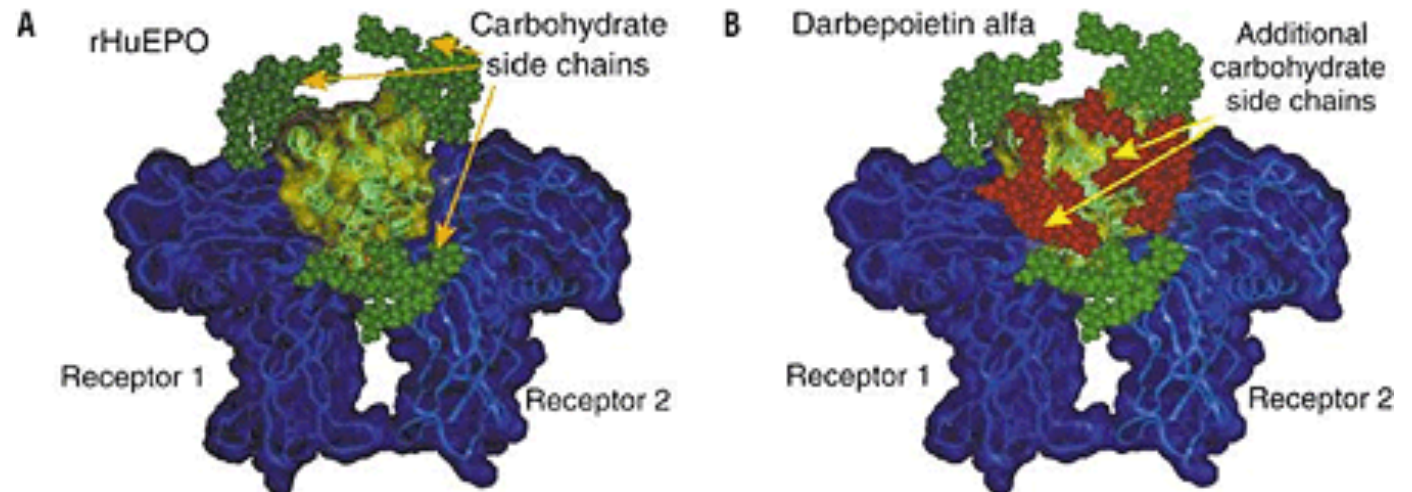
Eritropoietina

- È una proteina di 193 aa, i primi 27 dei quali vengono rimossi durante la secrezione; si ha quindi la rimozione del gruppo aminoacidico C-terminale risultante in una proteina funzionale di 165 aa
- La proteina è glicosilata (4 siti di glicosilazione; gli oligosaccaridi possono avere 0, 2, 3 o 4 residui di acido sialico) ed ha un PM di 30400 Da.
- La glicosilazione è importante per prolungare la vita dell'eritropoietina in circolo; la rimozione dell'acido sialico dalla molecola risulta in una rapida inattivazione a livello epatico e scomparsa dal circolo.



Darbepoetina alfa

- L' emivita dell' eritropoietina dipende dal numero di residui di acido sialico presenti sulla molecola.
- Nella darbepoetina la sequenza aminoacidica è stata modificata in cinque punti in modo da permettere l' aggiunta di due catene oligosaccaridiche, con un aumento dei residui di acido sialico da 14 a 22, senza causare alterazioni della struttura terziaria della proteina o della sua affinità per il recettore, allungando l' emivita della molecola che può quindi essere somministrata una sola volta alla settimana



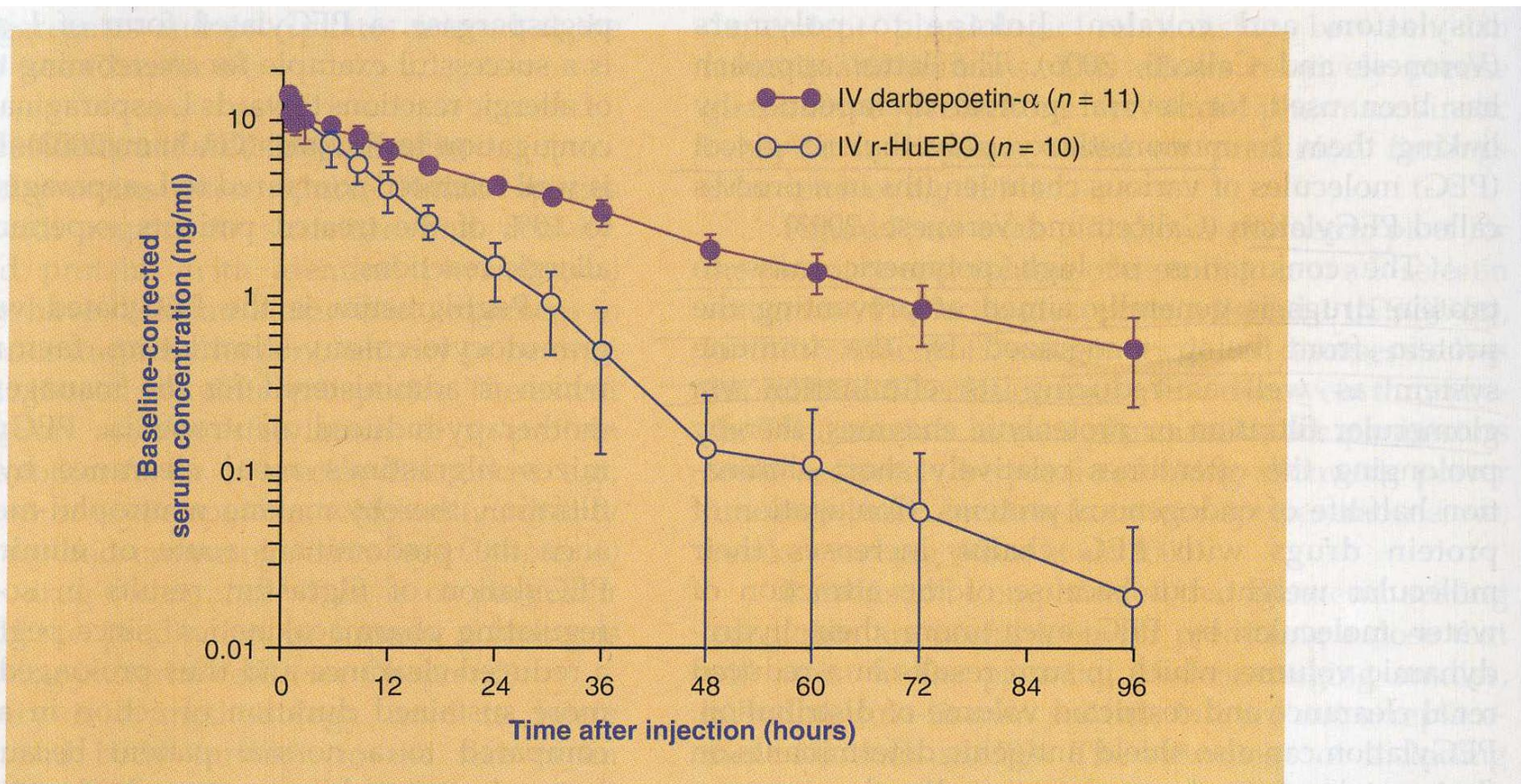


Figure 8 ■ Effect of glycosylation on pharmacokinetics of erythropoietin: Comparison of the mean (\pm SD) concentration–time profiles of darbepoetin- α ($0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 11$) and recombinant human erythropoietin ($100 \text{ U}/\text{kg}$, $n = 10$) after IV administration in patients with endstage renal disease. Darbepoetin- α is a derivative of erythropoietin with modified glycosylation pattern. Serum concentrations were corrected for endogenous erythropoietin concentrations. *Source:* From Macdougall et al., 1999.

PEGilazione

- prolunga il $t_{\frac{1}{2}}$
- riduce l'immunogenicità
- Pegfilgastrim (Neulasta®)
- interferone α 2a pegilato (Pegasys®, PegINTRON®)
- Pegaspargasi (Oncaspar®)

Produzione di Fab' umanizzato: certolizumab pegol (Cimzia®)

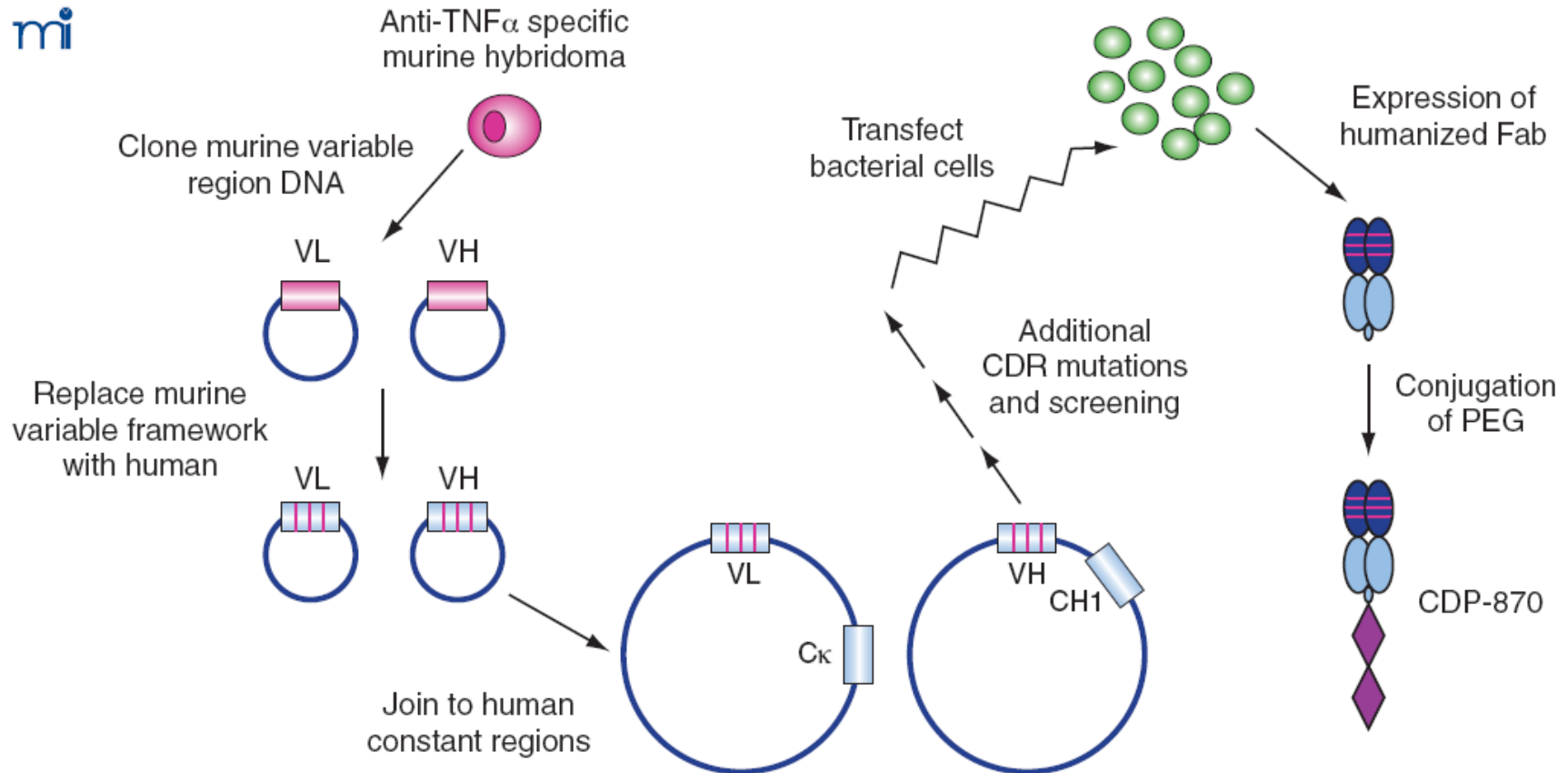


Figure 4. Derivation of CDP870 from a murine TNF α -specific MAB using recombinant DNA technology and protein engineering. The cloned murine variable light and heavy chain cDNAs are modified to insert human framework sequences, and thus only the CDR sequences remain from the original mouse monoclonal antibody. Because this may reduce affinity for the original antigen, additional site-specific mutations may be necessary within the CDR sequences. Because the native Fab is typically not glycosylated, CDP-870 can be expressed in bacterial cells; PEG is conjugated to the purified humanized molecule.