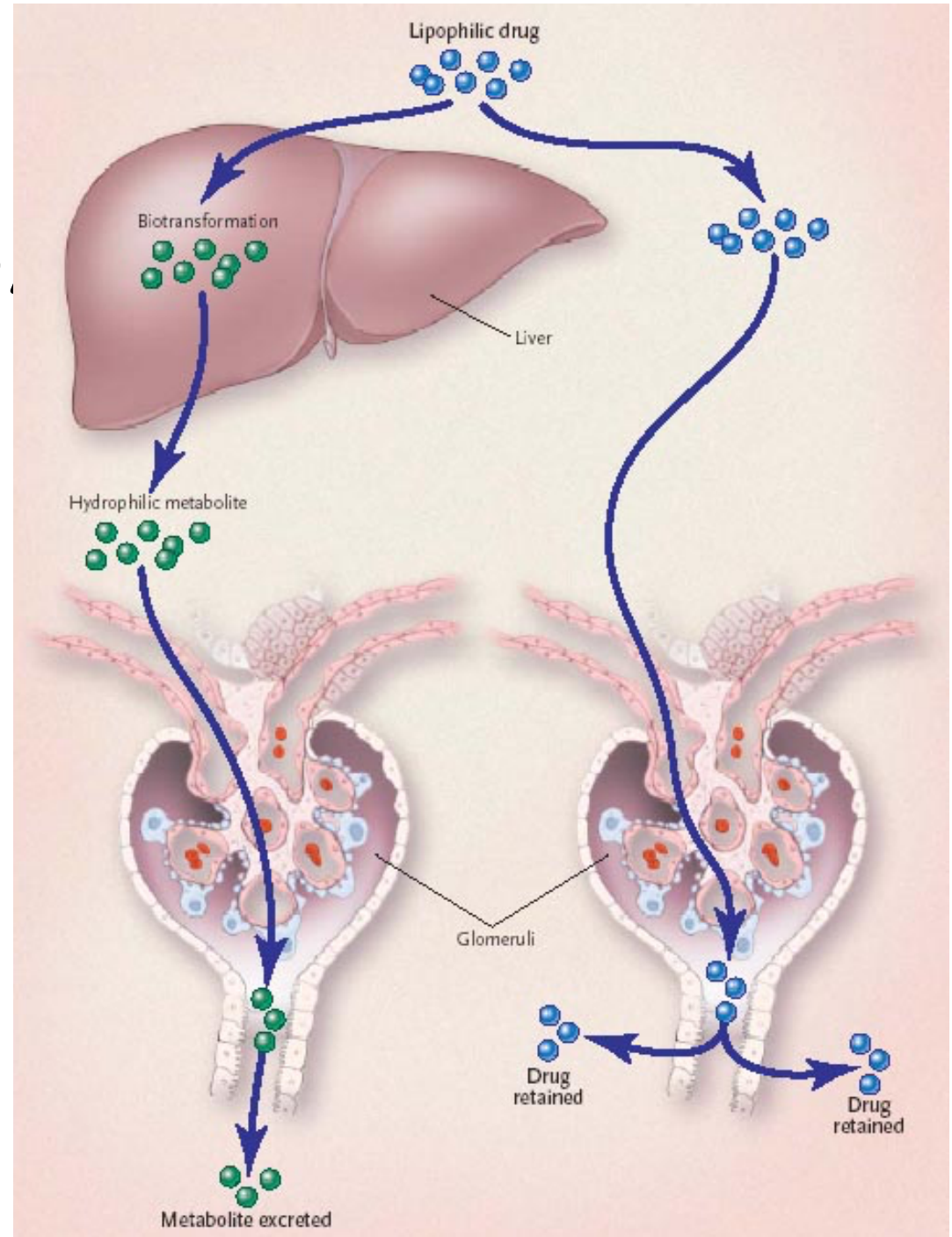


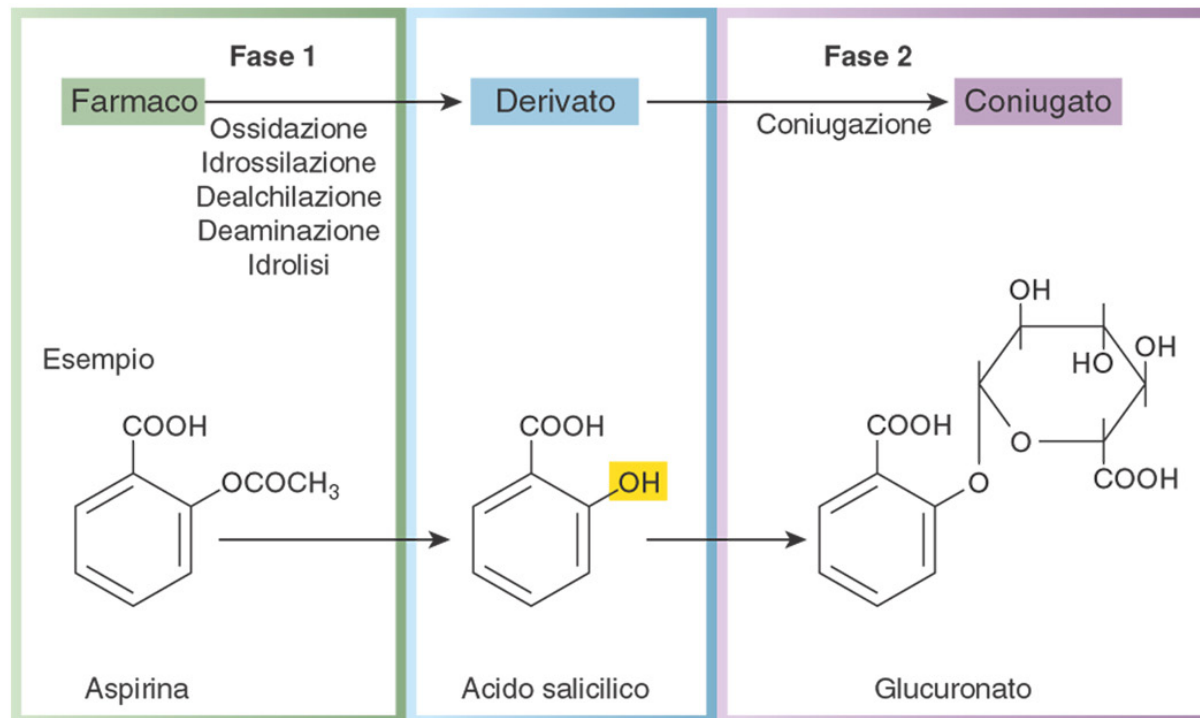
Biotrasformazione

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

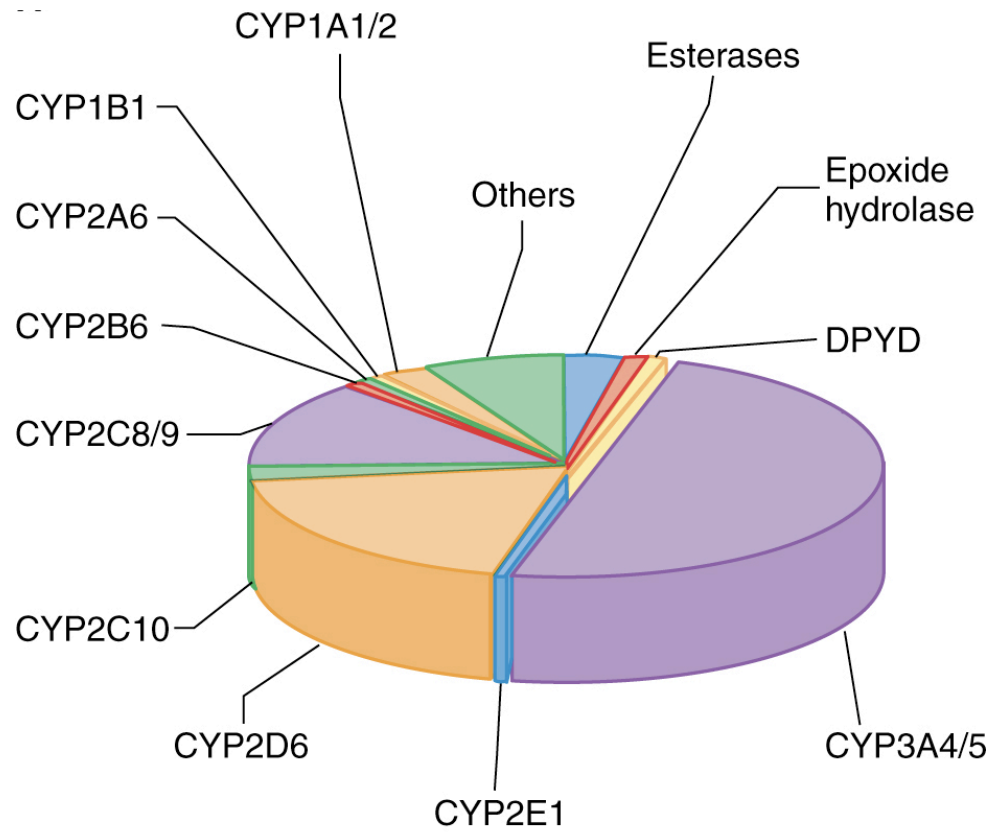


Metabolismo dei farmaci

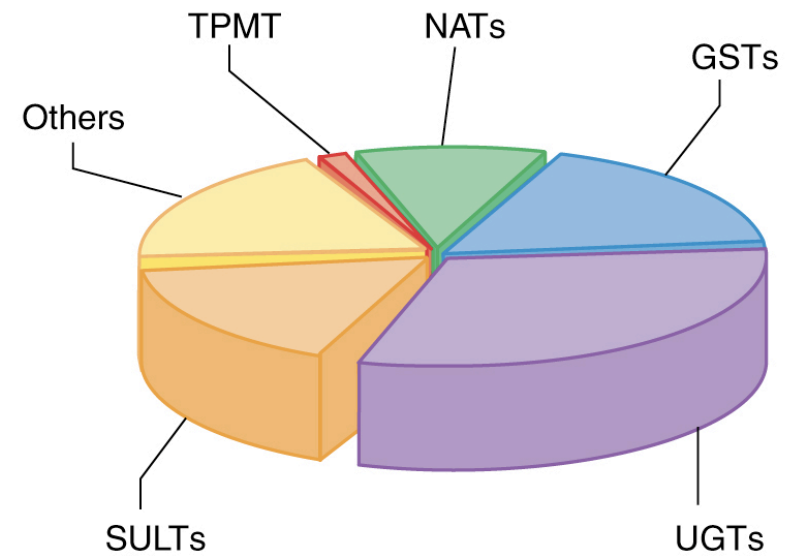
- **Reazioni di fase I o di funzionalizzazione:** hanno la finalità di inserire o mettere in evidenza gruppi funzionali di legame (-OH, -SH, -NH₂, -COOH) per le reazioni di coniugazione. Dal punto di vista chimico sono prevalentemente reazioni di ossidazione, riduzione, idrolisi
- **Reazioni di fase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



Reazioni di fase 1



Reazioni di fase 2



Eliminazione

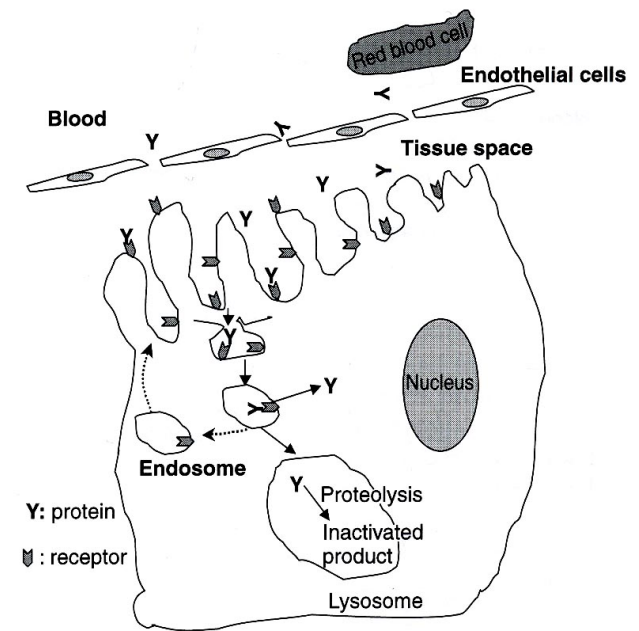
| Molecular weight | Elimination site | Predominant elimination mechanisms | Major determinant |
|------------------|------------------|---|--------------------------------|
| < 500 | Blood, liver | Extracellular hydrolysis Passive lipid diffusion | Structure, lipophilicity |
| 500–1,000 | Liver | Carrier-mediated 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

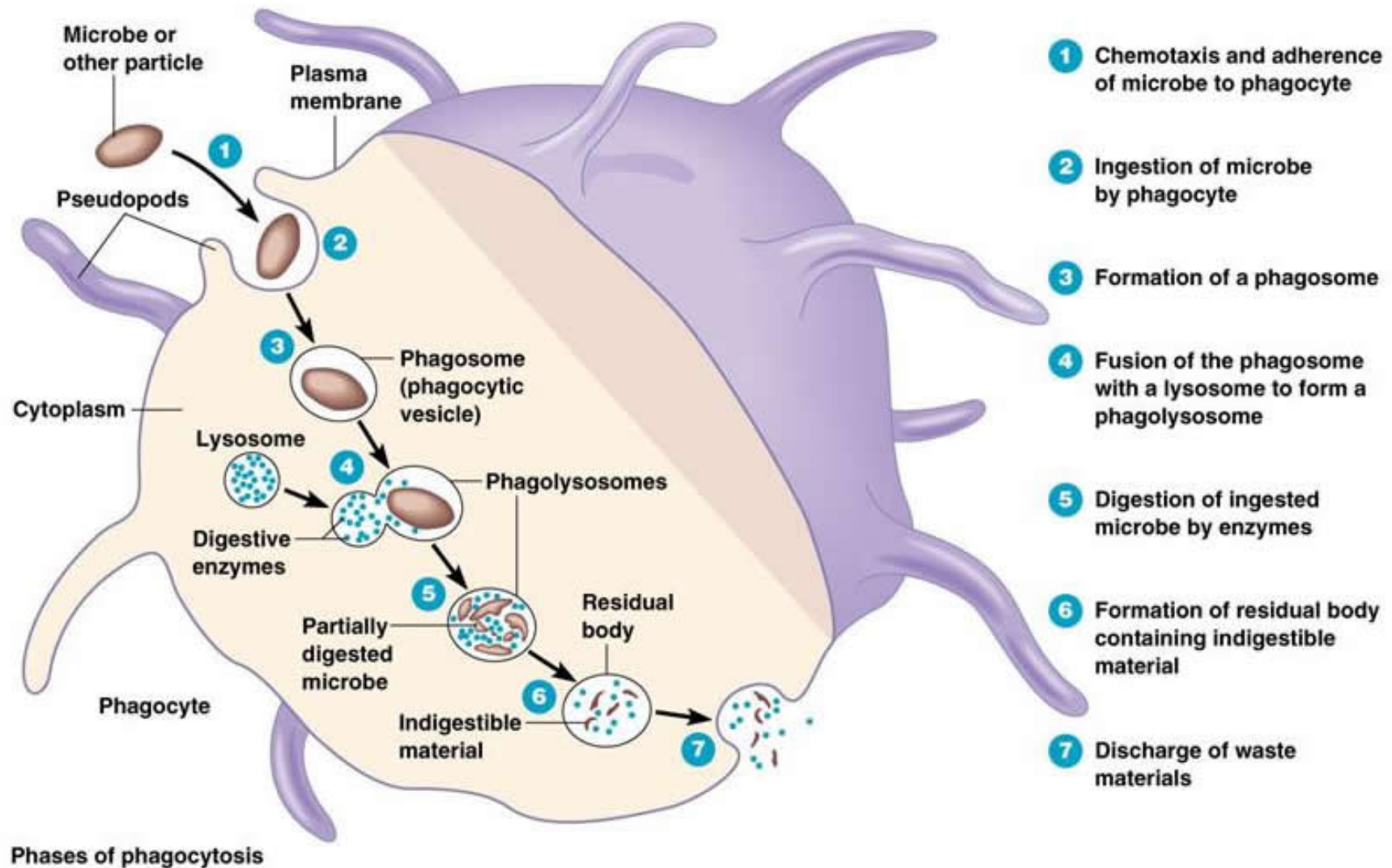
- Entrano negli epatociti per endocitosi mediata da recettore (insulina, epidermal growth factor, glicoproteine)
- Vengono metabolizzate all'interno degli epatociti nei lisosomi (endopeptidasi poi esopeptidasi)



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

Fagocitosi



OPSONIZATION

COMPLEMENT-MEDIATED PHAGOCYTOSIS

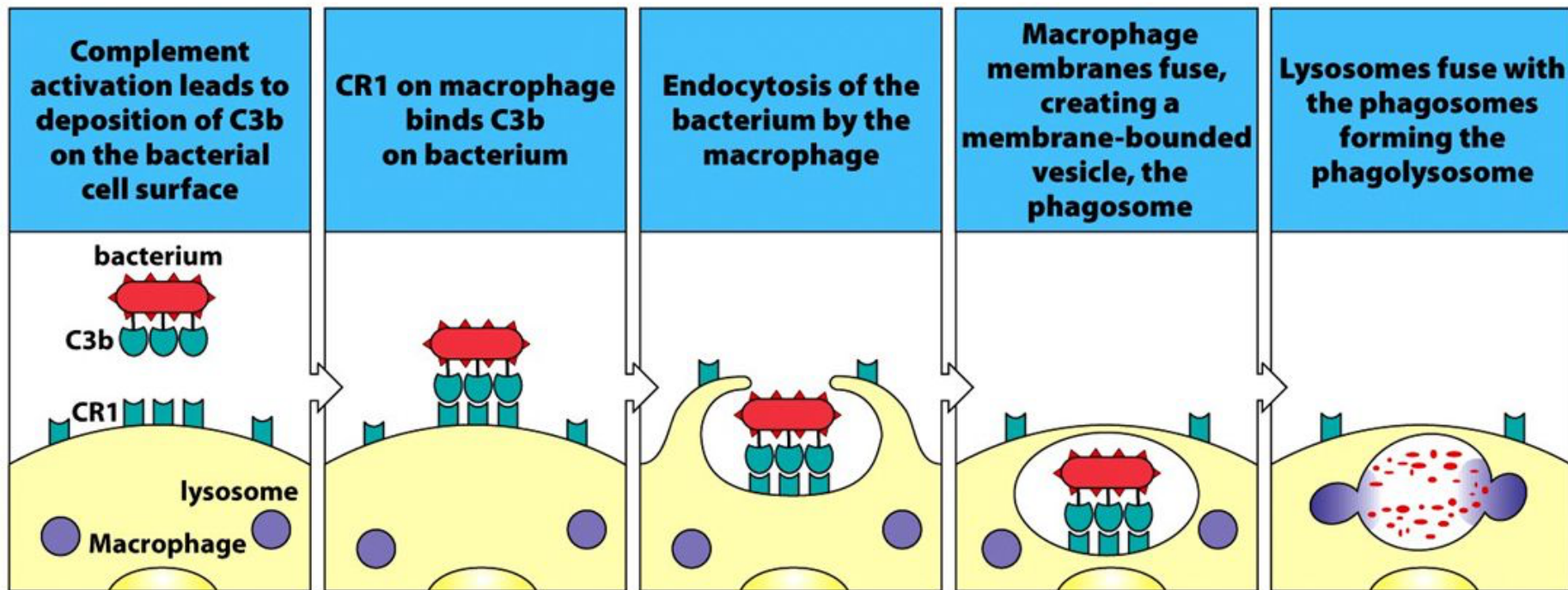
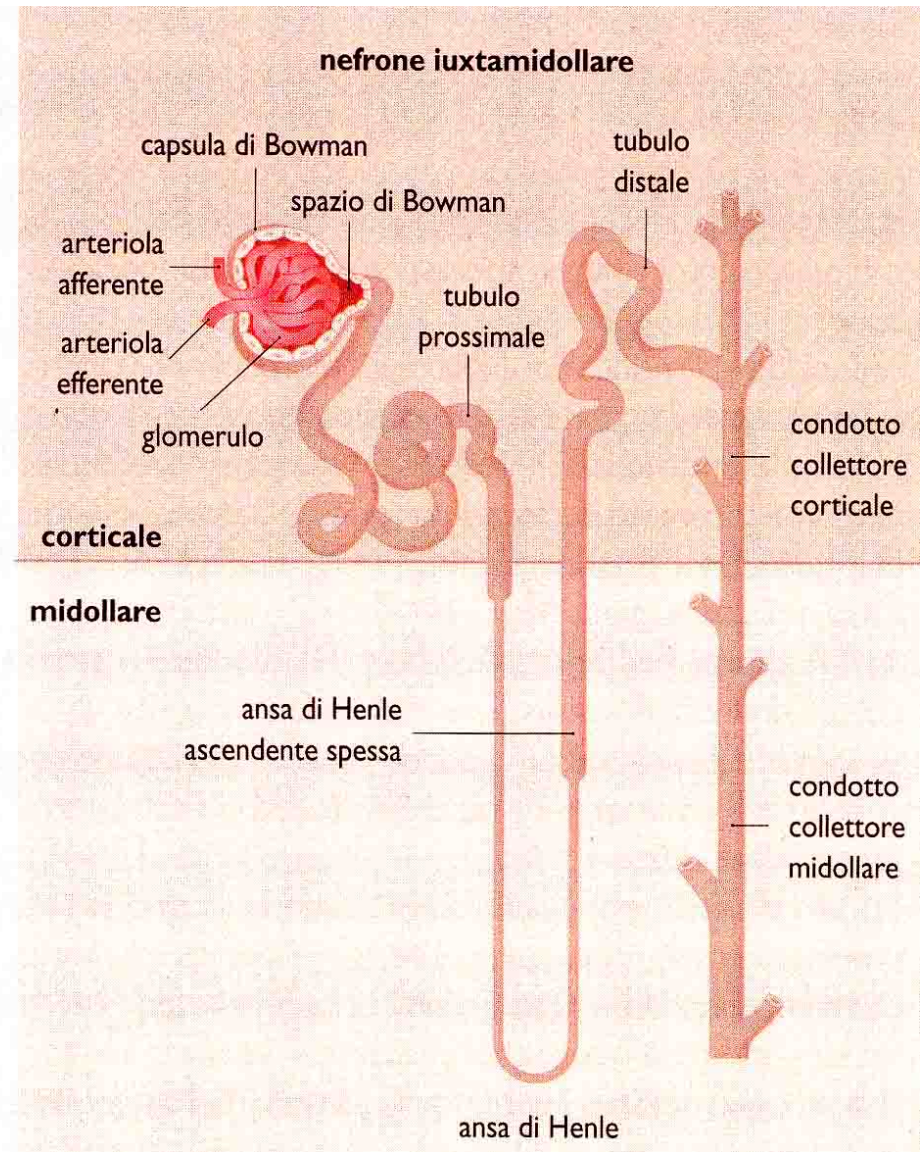
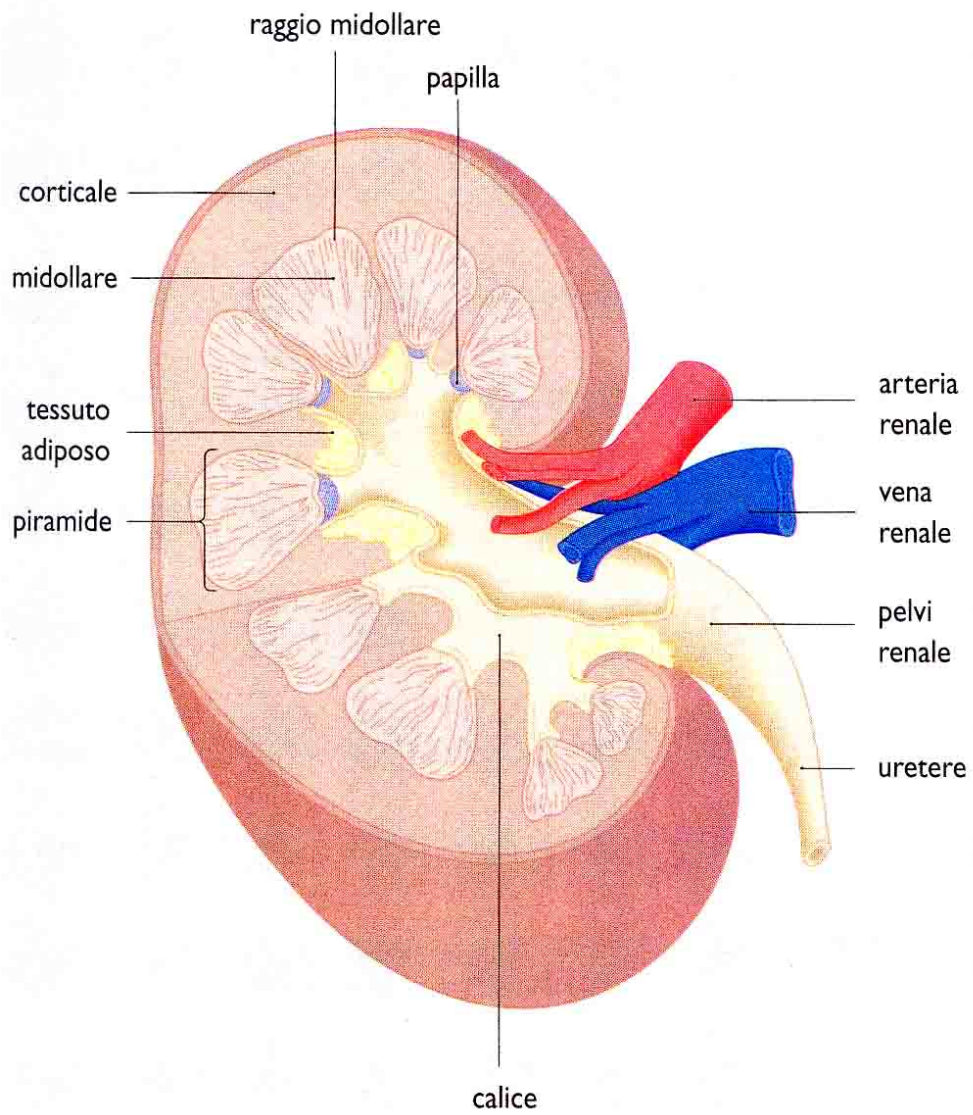


Figure 2.10 The Immune System, 3ed. (© Garland Science 2009)



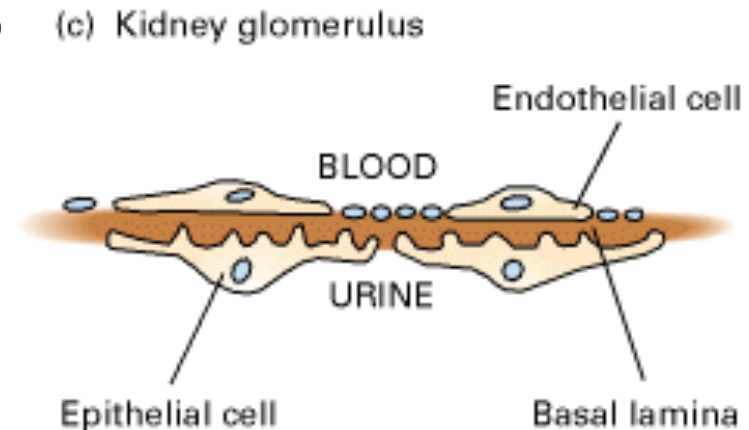
Escrezione renale: filtrazione

- 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

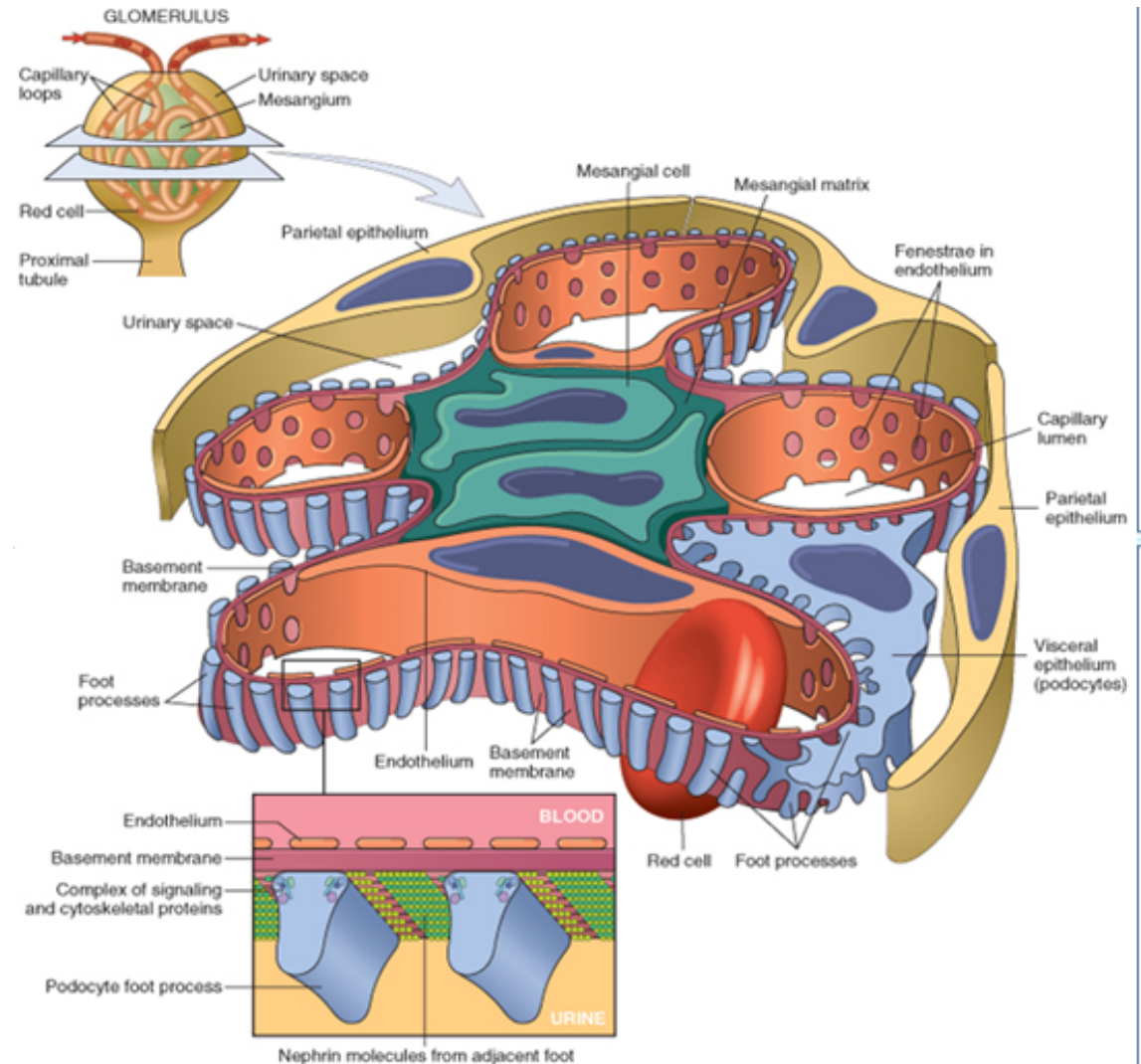
Il filtro glomerulare è costituito da tre strati che separano il lume dei capillari dallo spazio nella capsula di Bowman

- 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



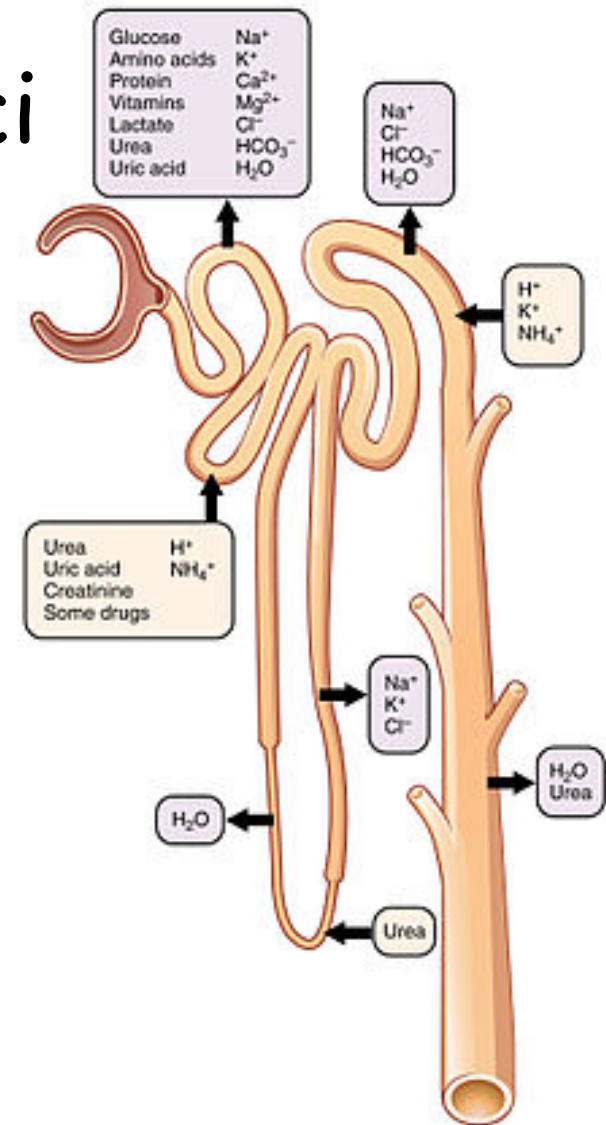
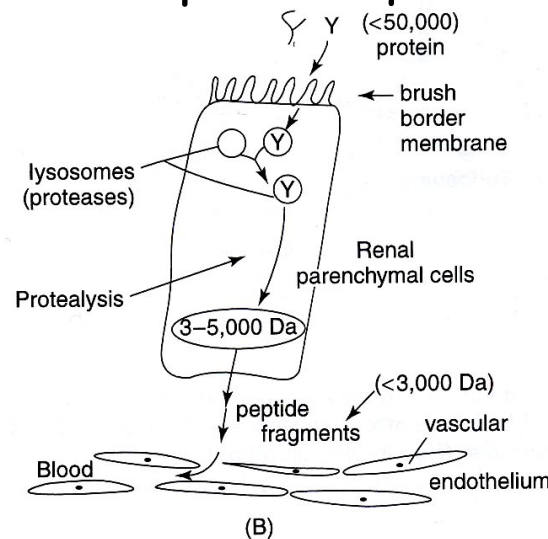
Escrezione renale dei farmaci proteici e peptidici

- 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 degradati all'interno della cellula a piccoli peptidi e aminoacidi
- metabolizzati dalle esopeptidasi intraluminali nel tubulo prossimale; i frammenti sono 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].

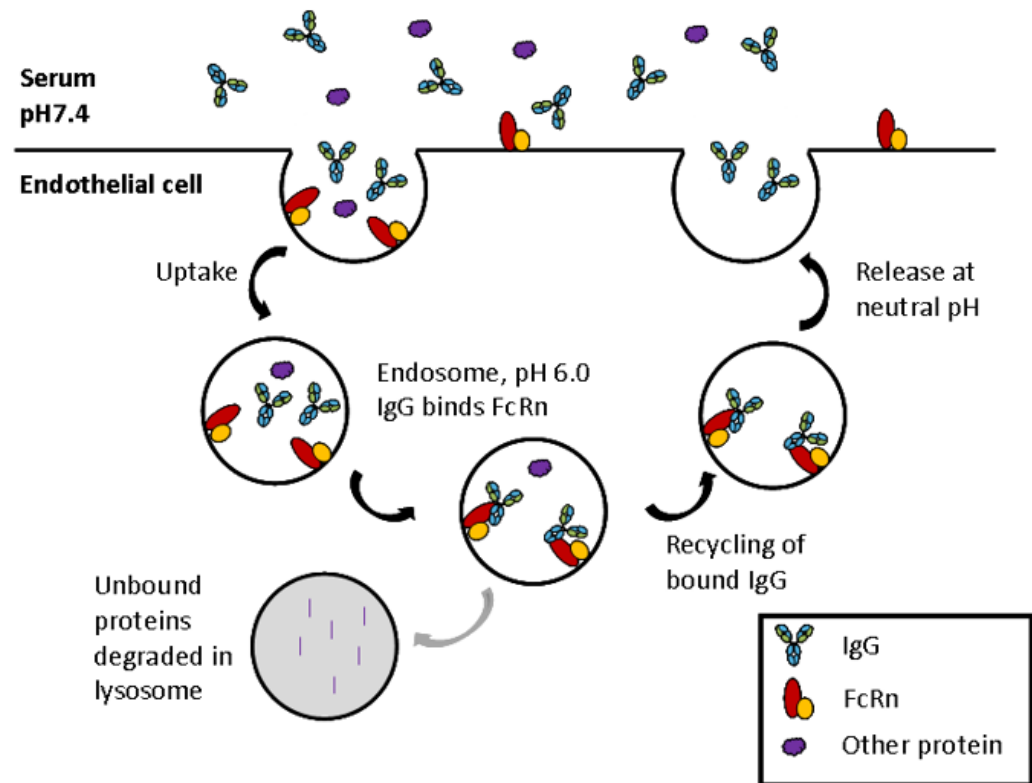
Note: NA, Not available.

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.

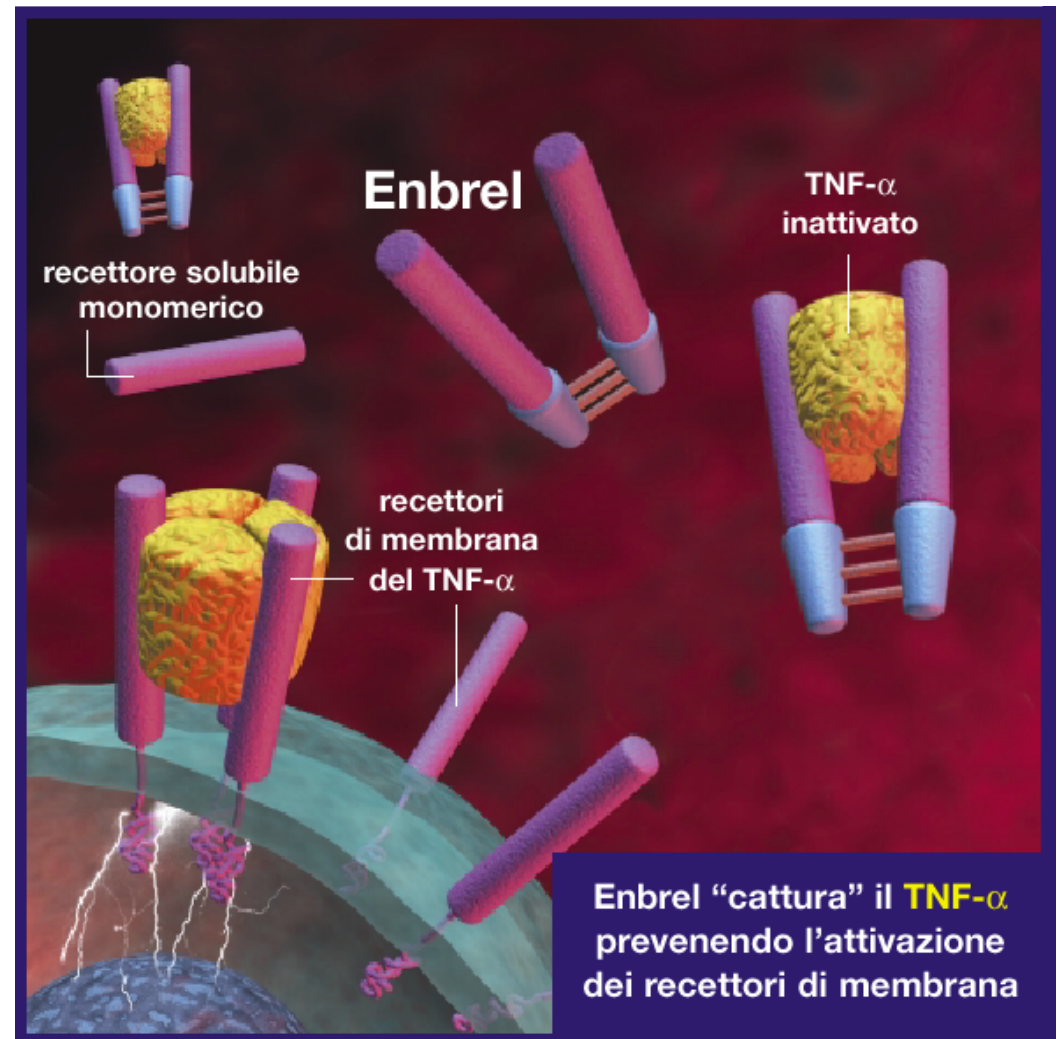
L'emivita delle IgG è relativamente lunga

- 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.

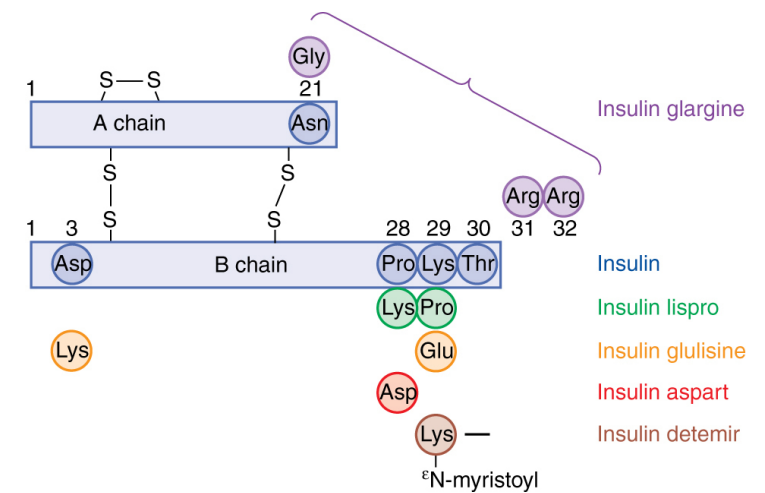


Utilizzo della porzione Fc per stabilizzare proteine ingegnerizzate: l'etanercept

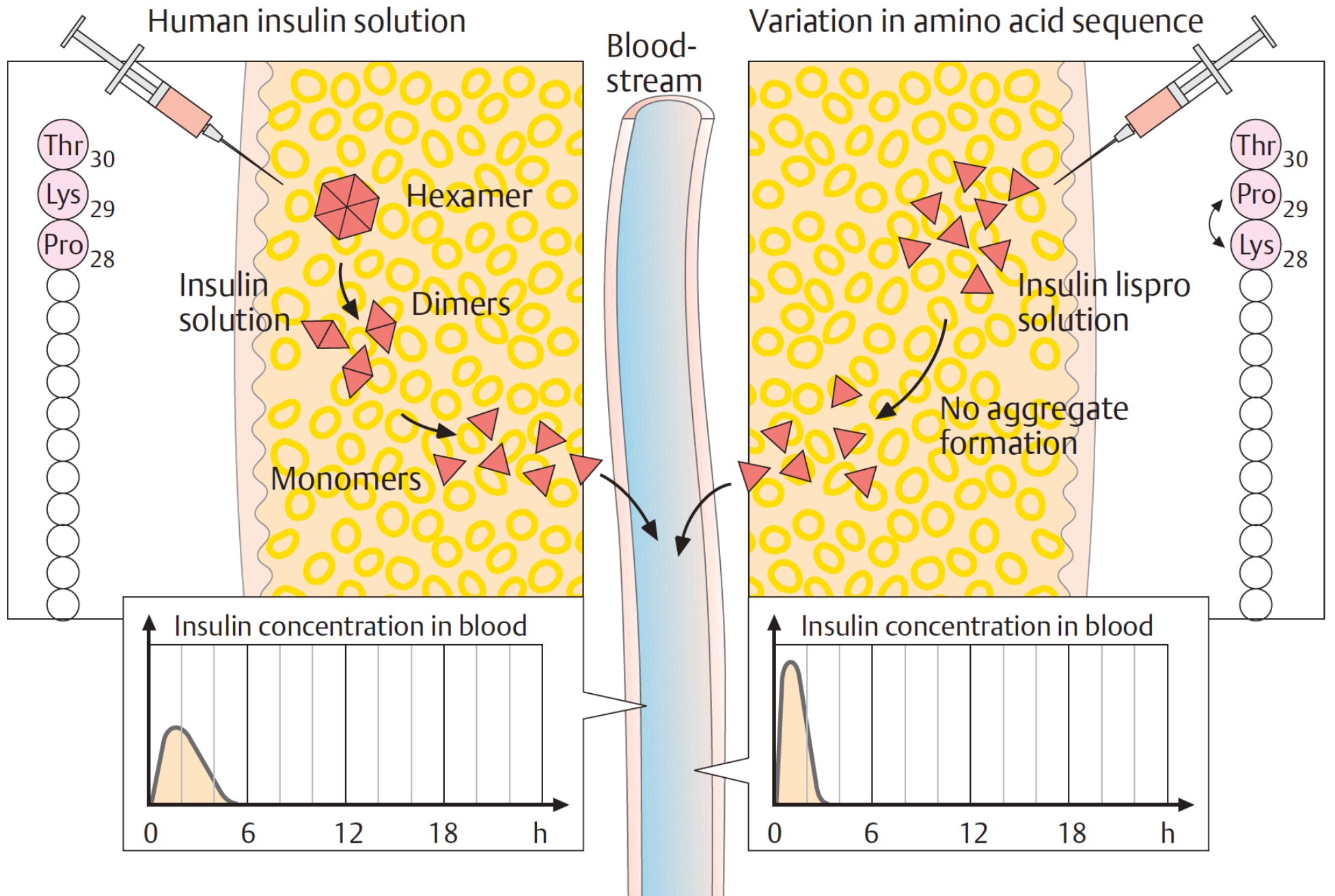
- Questo fenomeno è stato utilizzato per stabilizzare proteine di fusione prodotte a scopo terapeutico.
- Etanercept (Enbrel™), una proteina di fusione ricombinante fra il recettore per TNF α ed il frammento Fc è stata utilizzata con successo nel trattamento dell'artrite reumatoide.
- Efficacia clinica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



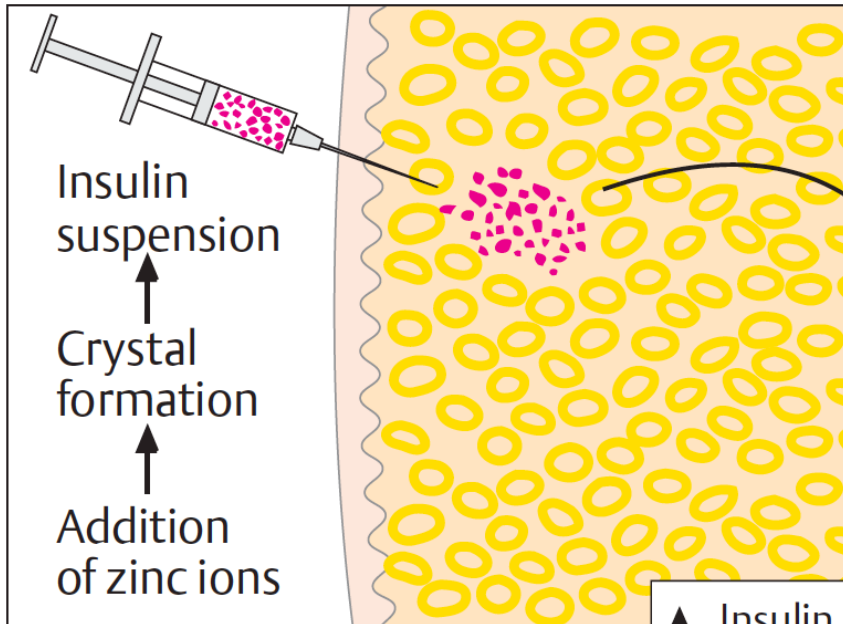
Preparazioni di insulina



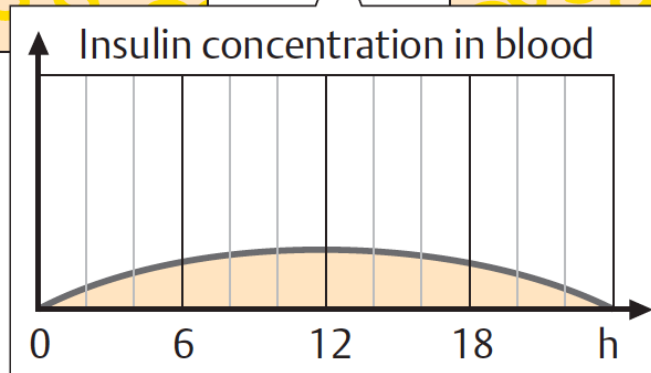
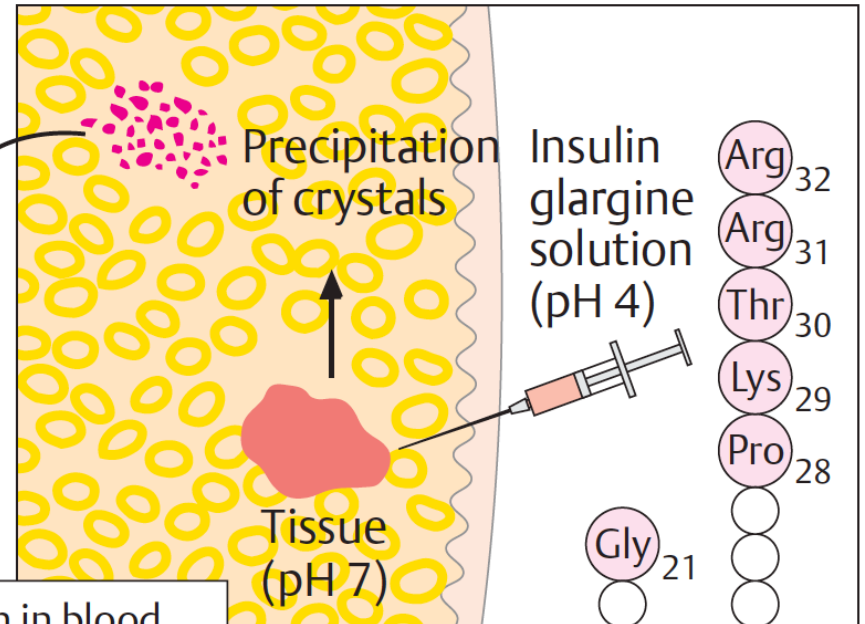
| | | Tempi di azione | | |
|--------------------------------|----------------------------------|-----------------|--|---------------------|
| Preparazione | | Insorgenza, h | Picco massimo, h | Durata effettiva, h |
| A breve durata d'azione | | | | |
| | Aspart (Novorapid®) | <0,25 | 0,5-1,5 | 3-4 |
| | 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

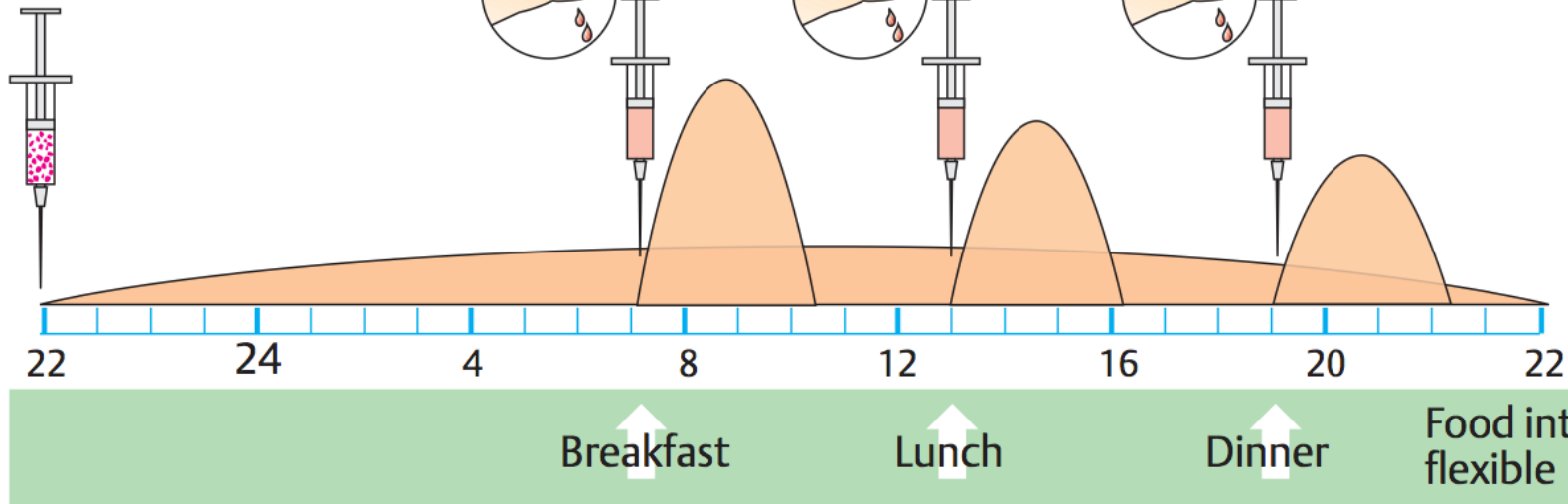


B. Methods of insulin replacement

Extended-action insulin

Blood glucose measurement

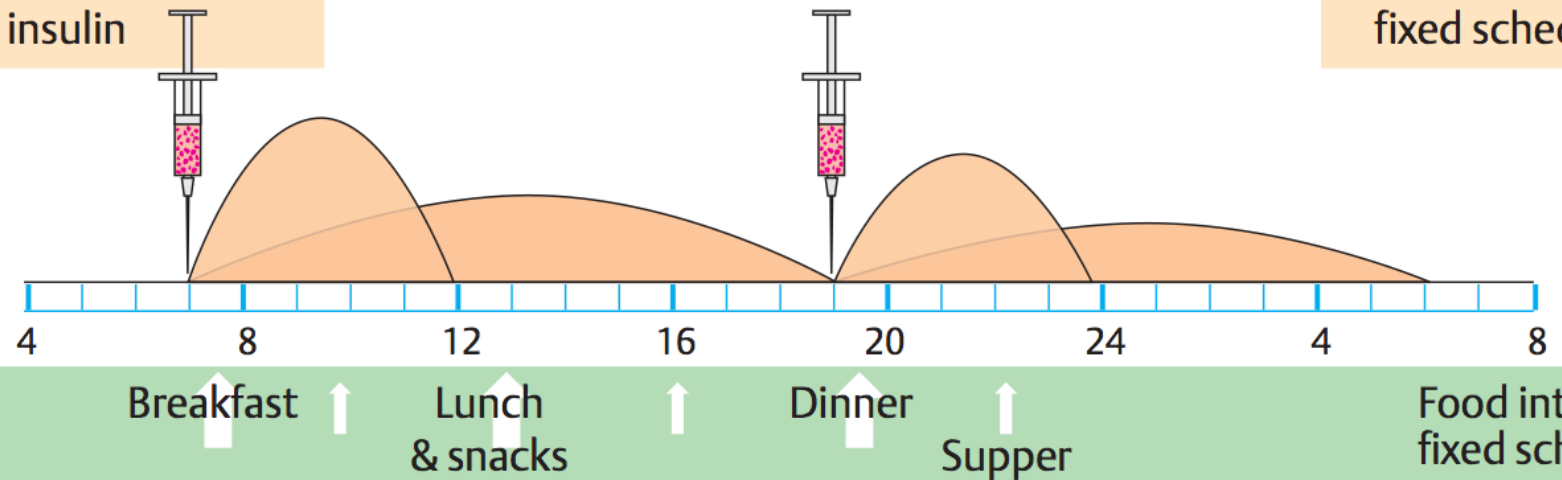
Rapid-acting insulin: flexible time and dose



1. Intensified insulin therapy

Combination insulin

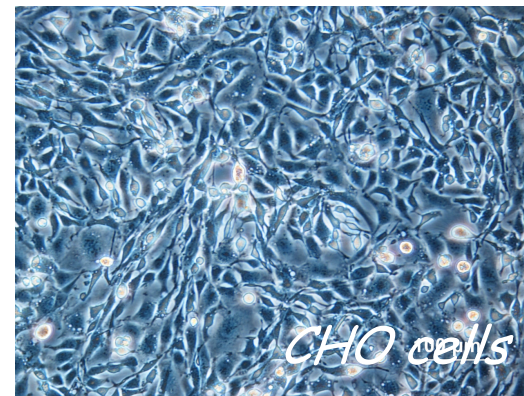
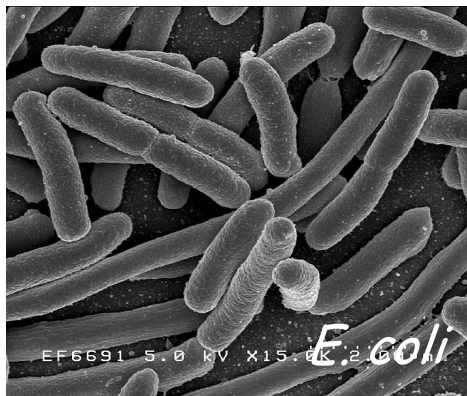
Insulin administration: fixed schedule



2. Conventional insulin therapy

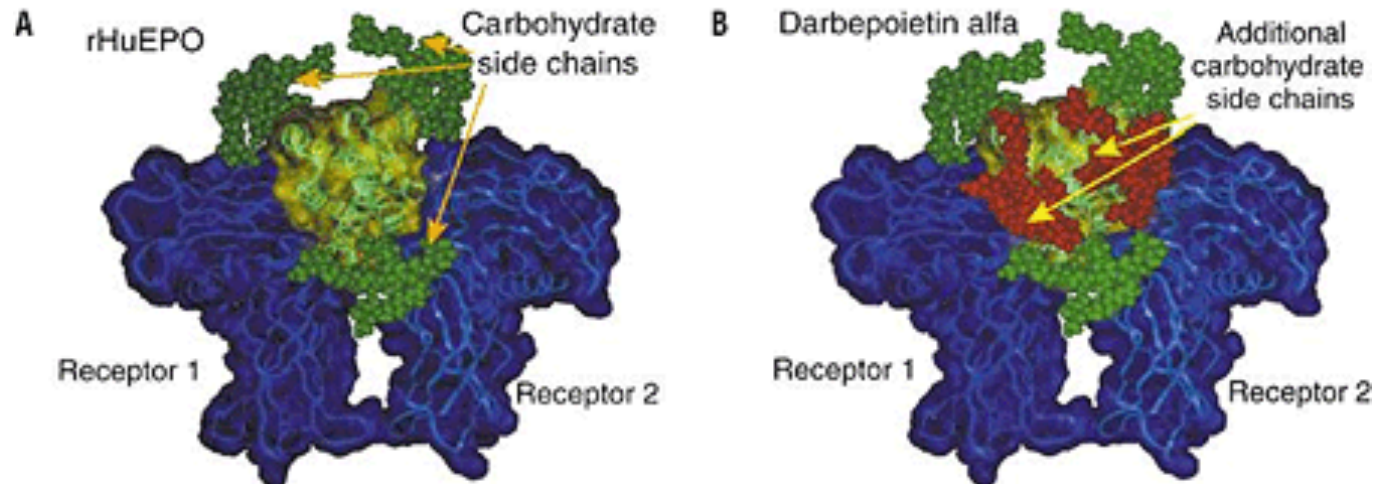
Eritropoietina

- 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



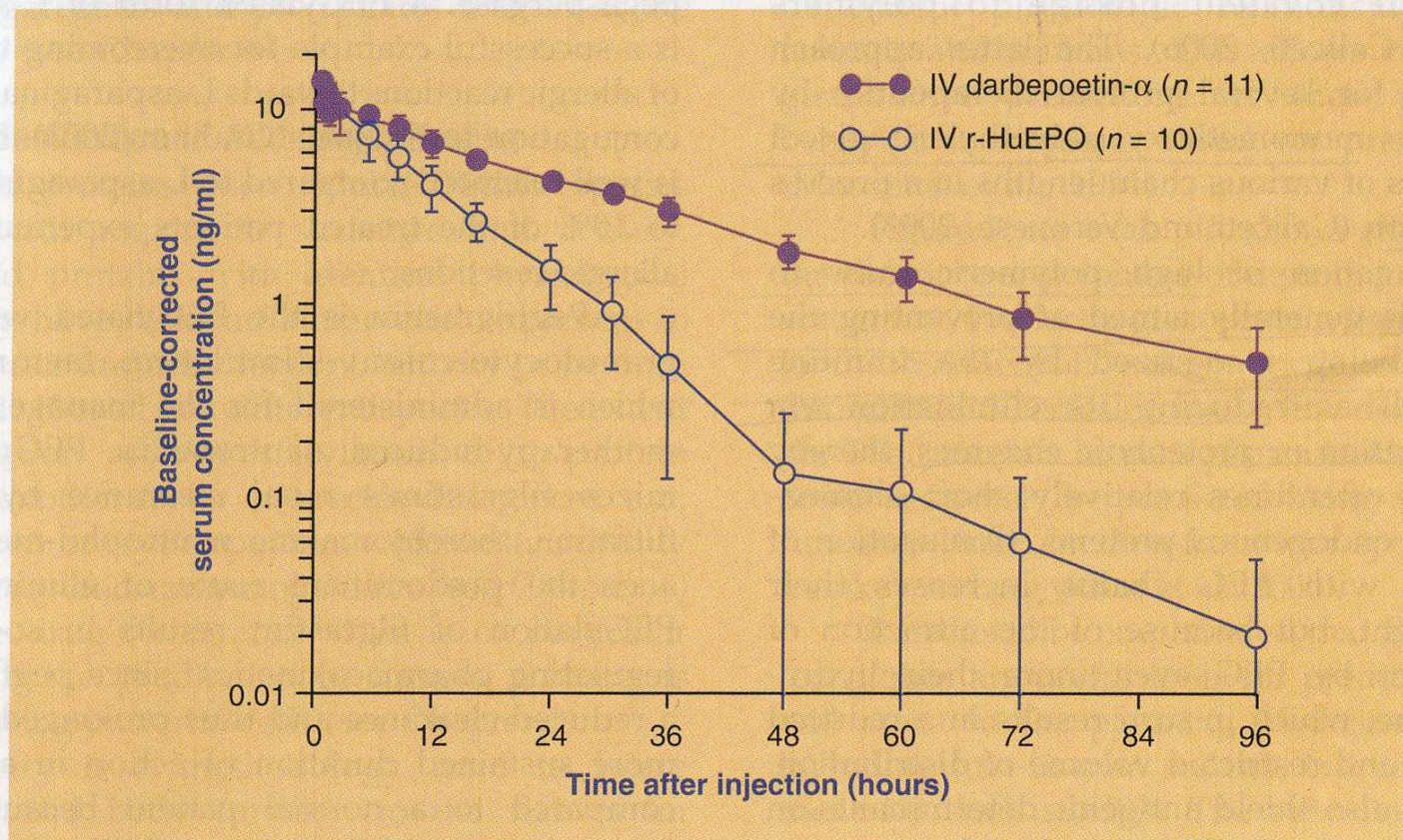


Figure 8 ■ Effect of glycosylation on pharmacokinetics of erythropoietin: Comparison of the mean (\pm SD) concentration–time profiles of darbepoetin- α (0.5 μ g/kg, $n = 11$) and recombinant human erythropoietin (100 U/kg, $n = 10$) after IV administration in patients with endstage renal disease. Darbepoetin- 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®)

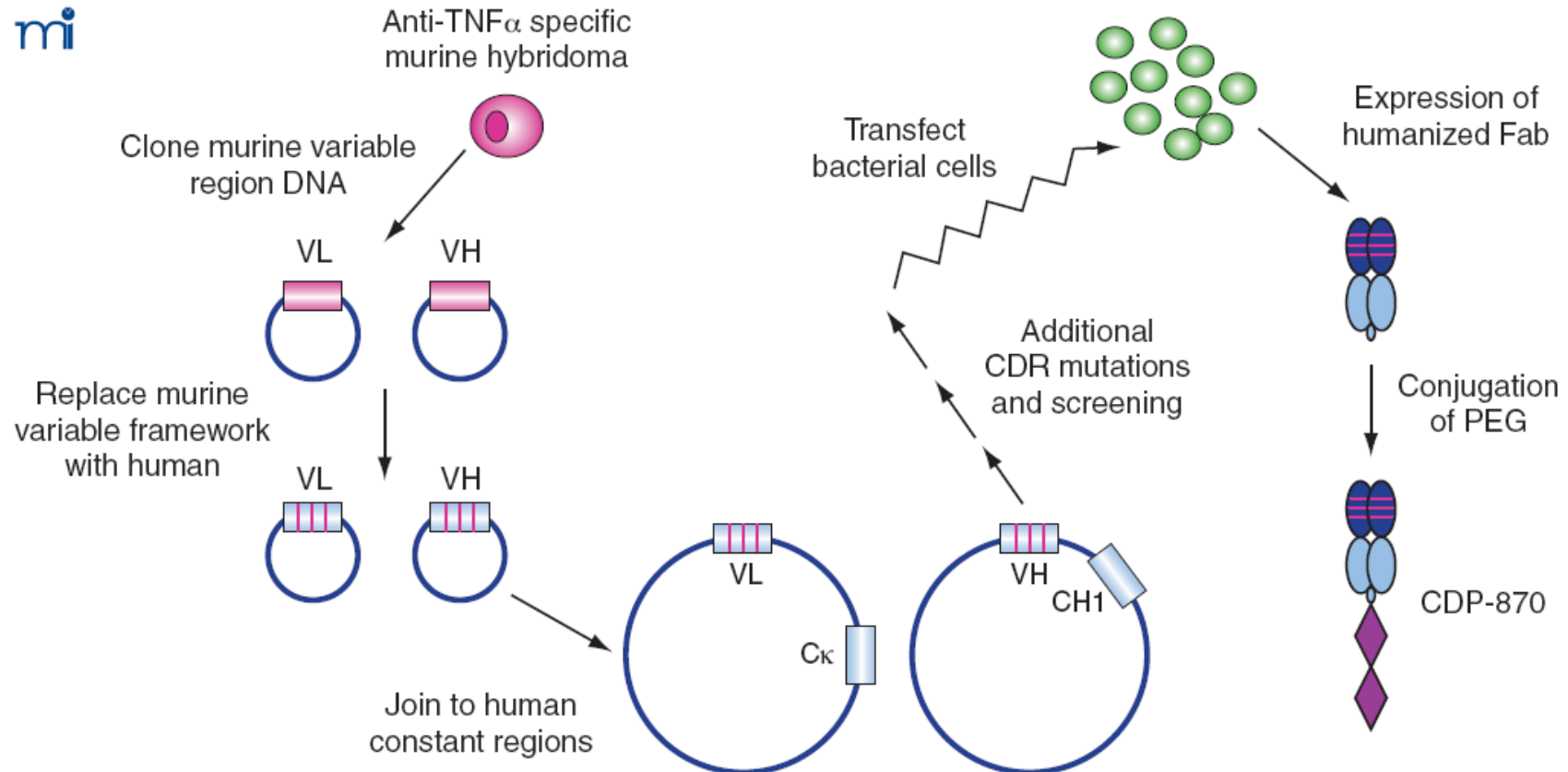


Figure 4. Derivation of CDP870 from a murine TNF α -specific MAb using recombinant DNA technology and protein engineering. The cloned murine variable light and heavy chain cDNAs are modified to insert human framework sequences, and thus only the CDR sequences remain from the original mouse monoclonal 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 bocterial cells; PEG is conjugated to the purified humanized molecule.

Il problema delle interazioni farmacologiche

Che cosa sono le interazioni farmacologiche?

- Alterazioni misurabili dell'effetto di un farmaco come conseguenza della somministrazione contemporanea o precedente di un'altra sostanza.
- L'effetto netto dell'associazione può essere:
 - Sinergismo
 - Antagonismo
 - Alterazione dell'effetto di uno o di più di uno dei farmaci o produzione di effetti idiosincrasici; si osserva un effetto clinico che normalmente non è associato all'impiego di questi farmaci

Nella pratica clinica la maggior parte delle interazioni non sono importanti

.....tuttavia.....

Le interazioni tra farmaci sono responsabili di 1/3 degli effetti avversi in pazienti ospedalizzati e di metà del costo attribuibile agli effetti collaterali.

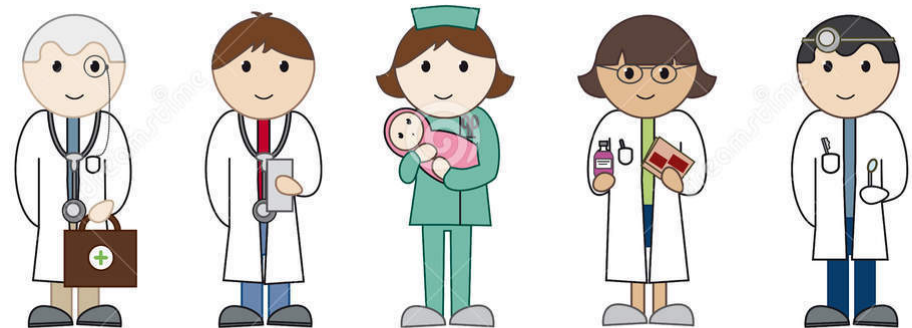
Le interazioni farmacologiche sono destinate ad aumentare

- La ricerca farmacologica tende a produrre un numero sempre crescente di farmaci
- Il progressivo invecchiamento della popolazione determina un aumento dei soggetti con patologie multiple, spesso croniche (Bolt C & Wieland GD, JAMA 2010).
- Il rischio di interazioni, specie di quelle gravi, aumenta in maniera esponenziale con l'aumentare dell'età e del numero di farmaci utilizzati (Karas S, Ann Emerg Med 1981; Sloan RW, Am Fam Physician 1983)




Le interazioni farmacologiche sono destinate ad aumentare

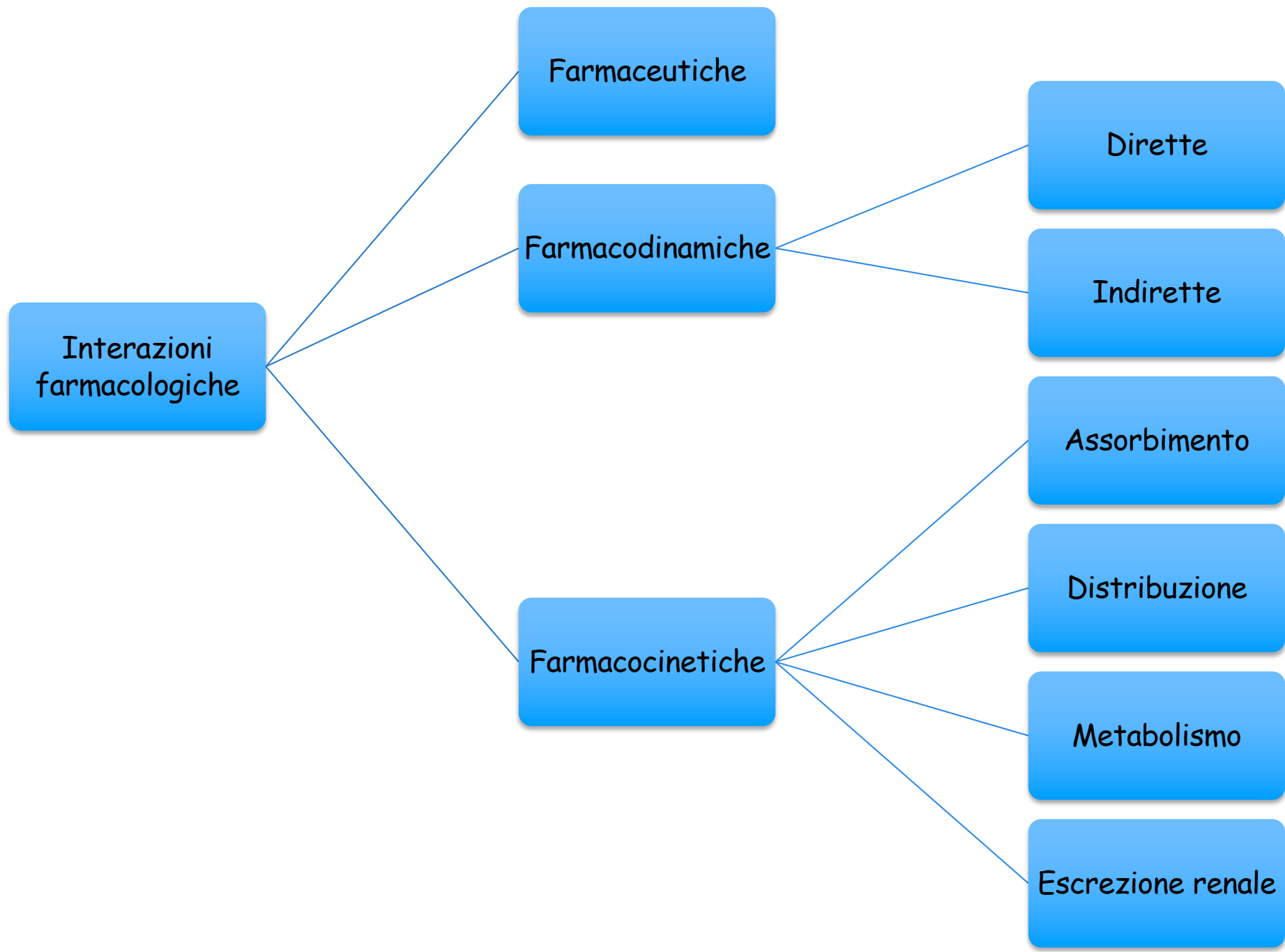
- Si fa sempre più strada il fenomeno della poliprescrizione con "frammentazione delle cure" e scarsa comunicazione tra gli specialisti.
- Il rischio di interazioni triplica nei pazienti che ricevono prescrizioni da due specialisti (Recalde J.M., Aten Prim, 1998)



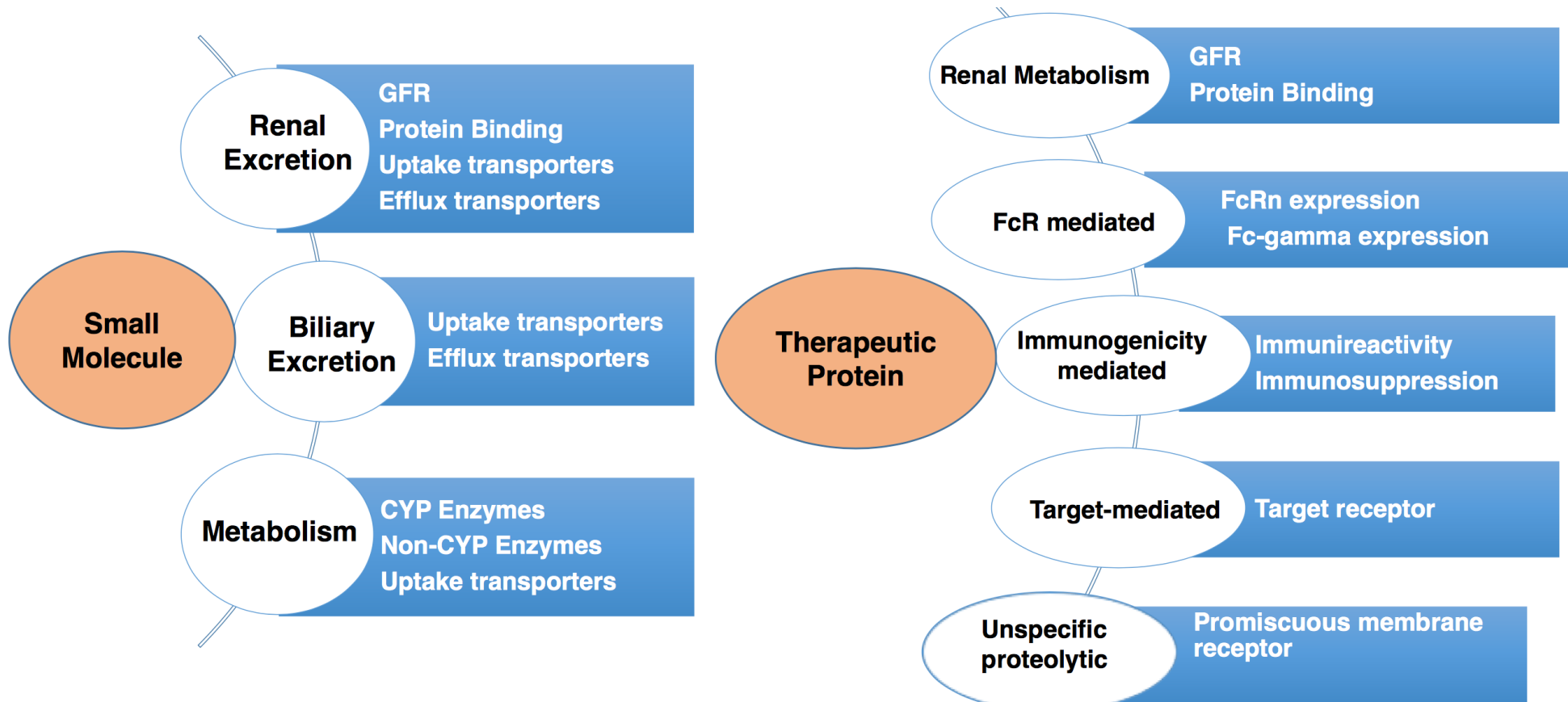
- Reazioni avverse sono trattate come patologie -
The prescribing cascade (Rochon PA & Gurwitz JH, Lancet 1995).



- 
- An iceberg floating in the ocean. The visible tip is a flat, white surface. The submerged part is a large, jagged, blue mass. A whale is visible swimming near the submerged part. The sky is blue with some clouds.
- È sempre maggiore la disponibilità di farmaci da automedicazione
 - È in crescita il ricorso alla medicina alternativa e ai prodotti a base di erbe

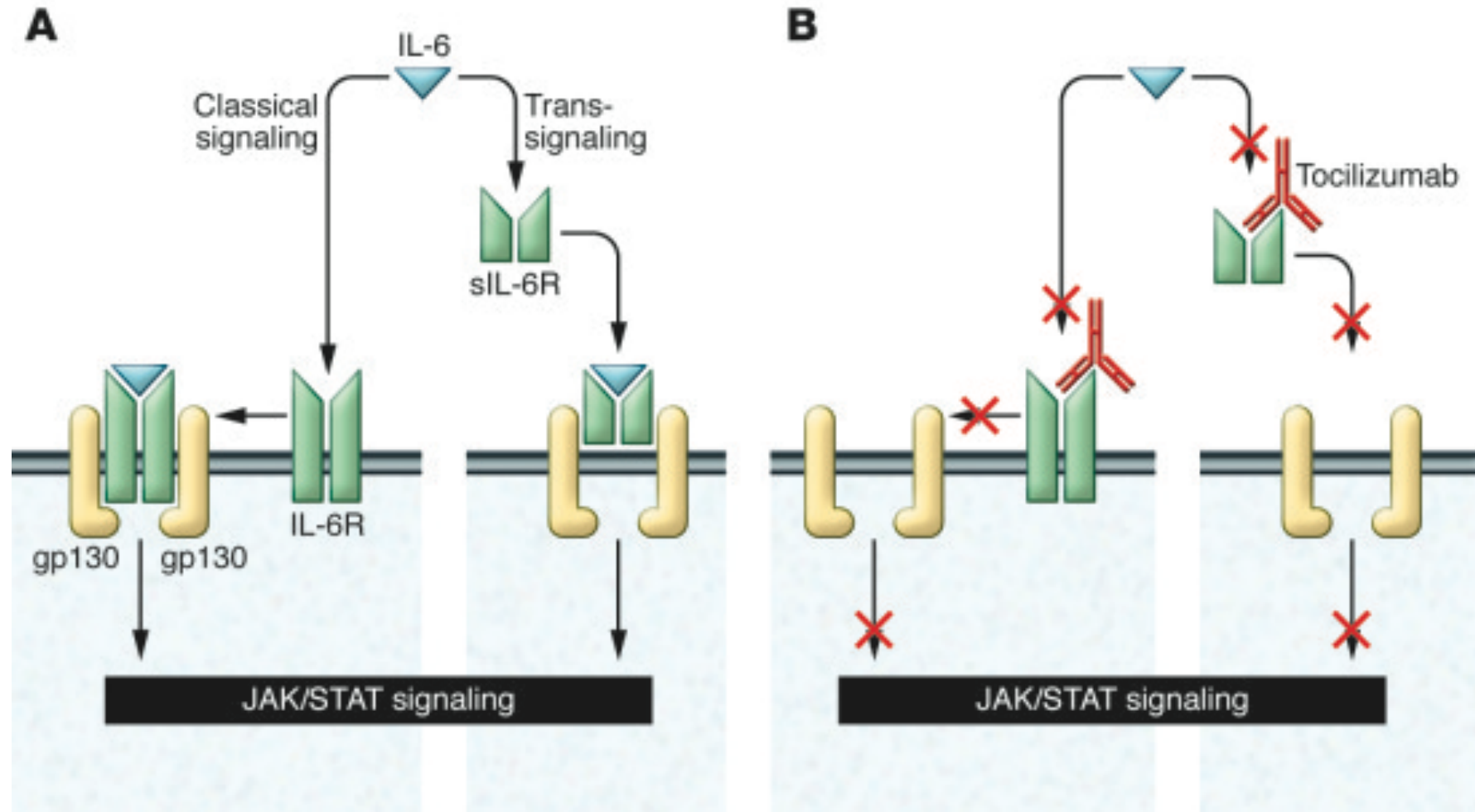


Per i farmaci biologici c'è un ridotto potenziale di interazioni farmacologiche per le differenti pathways di eliminazione

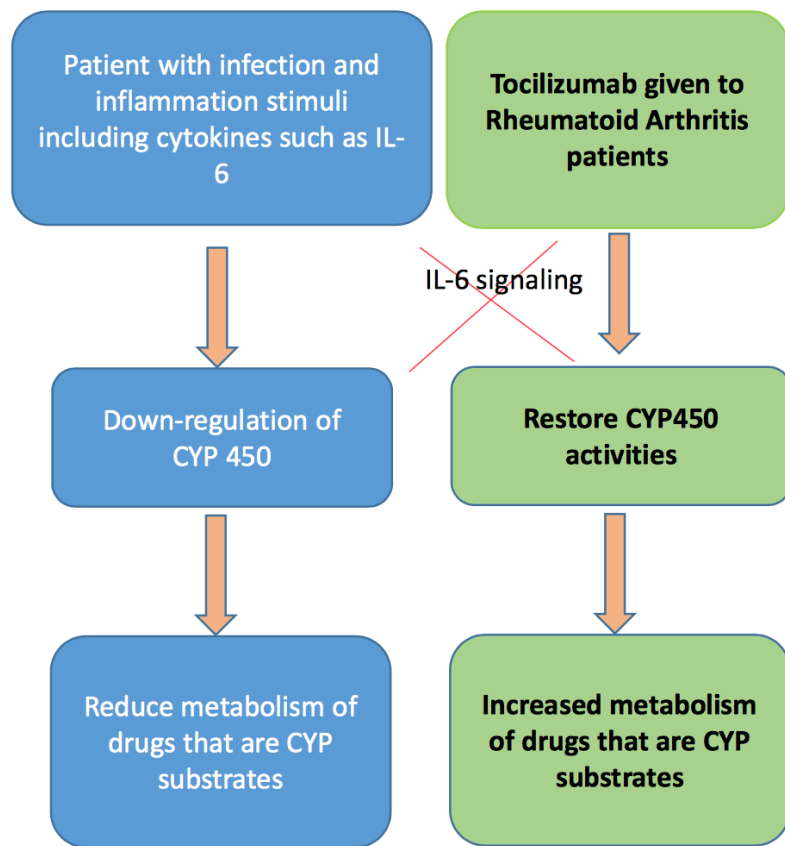


Possibili meccanismi di interazione

1. Alterazione dei processi infiammatori e immuni, con conseguente alterazione dell'espressione di CYP. Esempio: tocilizumab aumenta la clearance della simvastatina mediata dal CYP3A4 nei pazienti con RA
2. Alterazione dell'immunogenicità (per influenza degli immunosoppressori sulla farmacocinetica degli anticorpi monoclonali. Esempio: il metotressato riduce la clearance accelerata dell'infliximab, riducendo l'immunogenicità dell'infliximab in pazienti con reazioni immunogeniche.
3. Alterazione della fisiologia del target o della dispesizione target mediata influenzando la distribuzione della proteina terapeutica. Esempio: l'uptake del trastuzumab da parte del tumore si riduce con la contemporanea somministrazione di un anticorpo anti VEGF per la riduzione del flusso ematico nel tumore e della permeabilità vascolare alle macromolecole.



Tocilizumab (IL-6R blocker) Interactions with CYP450 Substrates



- *In vitro* studies showed effect on expression of multiple CYP enzymes including CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4. Its effects on CYP2C8 or transporters is unknown.
- *In vivo clinical* studies with omeprazole metabolized by CYP2C19 and CYP3A4, and simvastatin, metabolized by CYP3A4, showed up to a 28% and 57% decrease in exposure one week following a single dose of ACTEMRA, respectively.

Ref: Schmitt et. al (2011), Clin Pharmacol Ther., 89(5):735-40

Ref: European Medicines Agency (EMA), 2009. EMA/26276/2009, Procedure No. EMA/H/C/000955.

Tocilizumab e substrati del CYP450

- Interazione clinicamente rilevante per substrati del CYP450 con stretto indice terapeutico.
- All'inizio o alla sospensione di tocilizumab, deve essere eseguito il monitoraggio clinico (ad es. Warfarin) o misurata la concentrazione del farmaco (ad es., ciclosporina o teofillina) e la dose del medicinale deve essere aggiustata secondo necessità.
- I medici prescrittori devono prestare attenzione quando tocilizumab è co-somministrato con farmaci metabolizzati dal CYP3A4 in cui la diminuzione dell'efficacia può essere un problema, ad es. contraccettivi orali, lovastatina, atorvastatina, ecc.
- L'effetto di tocilizumab sull'attività dell'enzima CYP450 può persistere per diverse settimane dopo l'interruzione della terapia.

Possibili meccanismi di interazione

1. Alterazione dei processi infiammatori e immuni, con conseguente alterazione dell'espressione di CYP. Esempio: tocilizumab aumenta la clearance della simvastatina mediata dal CYP3A4 nei pazienti con RA
2. Alterazione dell'immunogenicità (per influenza degli immunosoppressori sulla farmacocinetica degli anticorpi monoclonali). Esempio: il metotressato riduce la clearance accelerata dell'infliximab, riducendo l'immunogenicità dell'infliximab in pazienti con reazioni immunogeniche.
3. Alterazione delle funzioni fisiologiche del target o della disposizione target mediata influenzando la distribuzione della proteina terapeutica. Esempio: l'uptake del trastuzumab da parte del tumore si riduce con la contemporanea somministrazione di un anticorpo anti VEGF per la riduzione del flusso ematico nel tumore e della permeabilità vascolare alle macromolecole.