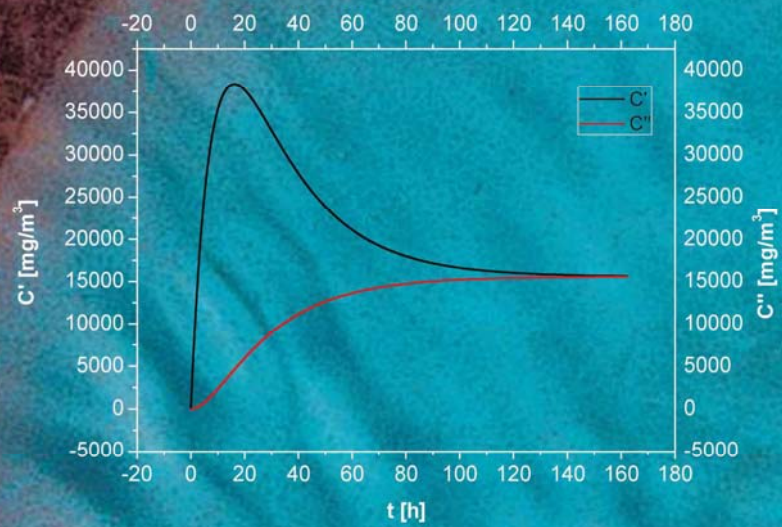


Trasporto di molecole attive attraverso membrane biologiche

Trasporto di molecole attive attraverso membrane biologiche



Antonio Montella

Antonio Montella



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Facoltà di Ingegneria

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Trasporto di molecole attive attraverso membrane biologiche

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Ch.mo Prof. Ing. Giuseppe Titomanlio

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Correlatore

Ing. Sara Cascone

Candidato:

Antonio Montella

matricola 0610200125

Anno Accademico 2011/2012

Ai miei genitori.

Questo testo è stato stampato in proprio in Times New Roman
La data prevista per la discussione della tesi è il 27/04/2012
Fisciano, 20/04/2012

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	III
Indice delle tabelle	VII
Introduzione.....	1
1.1 Introduzione	2
1.2 Meccanismi di trasporto attraverso la mucosa intestinale ..	4
1.3 Permeabilità attraverso la membrana cellulare.....	6
1.4 Obiettivi	8
Metodi in situ e in vivo	11
2.1 Metodi in situ	12
2.2 Metodi in vivo	15
2.2.1 Perfusioni intestinali negli umani	16
Metodi in vitro	21
3.1 Metodi basati su tessuti animali	22
3.1.1 Intestino rovesciato	22
3.1.2 Camera Ussing	23
3.1.3 Membrane isolate di vescicole	25
3.2 Metodi basati su membrane biologiche	26
3.2.1 Cellule Caco-2	26
3.2.2 Cellule di rene canino Madin-Darby	29

3.2.3 Cellule 2/4/A1	31
3.2.4 Considerazioni e prospettive future	32
3.3 Metodi basati su membrane artificiali	32
Metodi in silico	37
4.1 <i>Regola del cinque</i>	38
4.2 Lipofilità (log P-log D)	39
4.3 Potenziale di assorbimento	41
4.4 Polar Surface Area (PSA)	42
Modello Matematico	45
5.1 Un modello dell'assorbimento	46
5.2 Simulazioni	48
5.2.1 Caso di studio	49
5.2.2 Casi potenziali	49
5.3 Discussione	53
Conclusioni e prospettive	55
6.1 Conclusioni	56
Bibliografia	59

Indice delle figure

Figura 1 Concentrazione plasmatica di un principio attivo all'interno della finestra terapeutica.	2
Figura 2 Sistema di classificazione BCS. La Classe I è ad alta biodisponibilità [3].	3
Figura 3. Differenti percorsi di assorbimento intestinale. (a) trasporto passivo transcellulare; (b) trasporto attivato; (c) trasporto passivo paracellulare. Ci sono però meccanismi che possono inibire l'assorbimento: (d) P-gp; (e) enzimi metabolici [18].	6
Figura 4. Struttura della mucosa intestinale umana [19].	7
Figura 5	7
Figura 6 Illustrazione schematica dell'apparato di perfusione sui ratti. Il lume intestinale può essere cannulato per perfusione o per raccogliere fluido luminale [9].	13
Figura 7 a) perfusione oscillante; b) perfusione con ricircolo; c) perfusione single-pass; d) loop intestinale legato. S=segmento perfuso; C=cannula; V=vene intestinali; P=pompa; R=serbatoio [9].	14
Figura 8 Diagramma schematico di tre differenti tecniche di perfusione negli umani: A, aperta; B, semi aperta; C, doppio palloncino. Per aperta e semiaperta, la fluidodinamica è descritta meglio dal modello dei tubi paralleli (la linea tratteggiata descrive il profilo di concentrazione lungo il tratto). Il modello a mescolamento fornisce invece la miglior fluidodinamica per sistemi a doppio palloncino [26].	17
Figura 9 Schema generale del meccanismo di misurazione di P_{eff} [26].	19
Figura 10 Il tessuto intestinale, così come i monolayer cellulari, può essere montato in camere di flusso per misurare il flusso transepiteliale. Inoltre, può essere monitorata la resistenza elettrica transepiteliale: essa è uguale alla differenza di potenziale diviso la corrente di corto circuito [9].	24
Figura 11 Correlazione tra la frazione assorbita negli umani per farmaci somministrati per via orale e la rispettiva permeabilità apparente misurata tramite i monolayer Caco-2 a pH 6.0 e 7.4 per un set di molecole attive [Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.].	28

Figura 12 Correlazione tra la percentuale assorbita negli umani contro la P_{app} attraverso i monolayer Caco-2 trattati con 10 micro moli di CP-Y. ($R=0.95$, numero composti=35).....	29
Figura 13 Correlazione tra valori di permeabilità appartenente tra Caco-2 e MDCK. Δ composti trasportati attivamente ; $\blacklozenge$ composti trasportati passivamente; $\circ$ substrati di efflusso (?) [Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.].....	30
Figura 14 Correlazione tra la frazione assorbita di un set strutturalmente diverso di farmaci somministrati oralmente e i coefficienti di permeabilità ottenuti tramite le celle 2/4/A1. E' stata ottenuta una correlazione sigmoideale per tutti i modelli: $\blacklozenge$ 2/4/A1; $\circ$ Caco-2; Δ perfusione in vivo negli umani [Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.].....	31
Figura 15 Flusso PAMPA a differenti valori di pH contro dati di assorbimento negli umani [Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.]. Gli inserti mostrano i composti trasportati attivamente o quelli polari che possono essere assorbiti per via paracellulare.	33
Figura 16 Piatti Microtiter a 96 pozzetti.....	34
Figura 17 Lettore di micro piastre a fluorescenza.....	35
Figura 18 Relazione tra P e $\log P$	40
Figura 19 Relazione tra la frazione assorbita negli umani e $\log D$ a pH 7.4. Le frecce indicano che i valori potrebbero essere più alti o più bassi di quelli mostrati [Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.].....	40
Figura 20 Correlazione tra potenziale di assorbimento e frazione assorbita per: (A)aciclovir, (B)soluzione di clorotiazide, (C) griseofulvina micronizzata, (D) idroclorotiazide, (E) fenitoina, (F) prednisolone, (G) digossina [Errore. L'origine riferimento non è stata trovata.].....	42
Figura 21 Confronto tra il nuovo metodo e quello tradizionale per calcolare la PSA [20].	43
Figura 22 Sistema controcorrente di simulazione dell'assorbimento intestinale per composti assunti oralmente negli umani. In giallo è evidenziata la membrana.	46
Figura 23 Evoluzione delle concentrazioni di farmaco contro il tempo: caso di studio.	49
Figura 24 Evoluzione delle concentrazioni di farmaco contro il tempo: metodo USP.....	50
Figura 25 Evoluzione delle concentrazioni di farmaco contro il tempo: $A=1 \text{ m}^2$	50
Figura 26 Evoluzione delle concentrazioni di farmaco contro il tempo: volume maggiore lato sangue.	51
Figura 27 Evoluzione delle concentrazioni di farmaco contro il tempo: vitamina B12.	52

Figura 28 Evoluzione delle concentrazioni di farmaco: rilascio immediato.....	52
---	----

Indice delle tabelle

Tabella 1. Caratteristiche fisiche e biologiche del tratto gastrointestinale umano [1].	4
Tabella 2 Emivita stimata dalla misura della permeabilità effettiva negli umani e loro relazione con la massima dose assorbita [25].	20
Tabella 3 Principali colture cellulari per stimare il flusso transcellulare intestinale [7].	26
Tabella 4 n ^a =Numero di molecole del data set. Sommario degli studi di validazione del nuovo metodo [20].	43

Bibliografia

1. Balimane et al., Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44** 301± 312 (2000)
2. W. J. Egan, G. Lauri, Prediction of intestinal permeability, *Advanced Drug Delivery Reviews* **54** 273 –289 (2002)
3. Custodio et al., Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption, *Advanced Drug Delivery Reviews* **60** 717–733 (2008)
4. Gerard J. Tortora, Bryan Derrickso, Principles of Anatomy and Physiology, *WILEY*
5. Balimane et al., Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44** 301± 312 (2000)
6. W. J. Egan, G. Lauri, Prediction of intestinal permeability, *Advanced Drug Delivery Reviews* **54** 273 –289 (2002)
7. Balimane et al., Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44** 301-312 (2000)
8. Yamashita et al., Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **10** (2000) 195–204
9. Balimane et al., Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44** 301-312 (2000)
10. Stewart et al., Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption, *Advanced Drug Delivery Reviews* **23** 27-45 (1997)
11. Haase et al., Studies on the Orientation of Brush-Border Membrane Vescicles, *Biochemical Journal* **172** 57-62 (1978)
12. Hilgers et al., Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa, *Pharmaceutical Research* **7** 902-910 (1990)

13. Kansy et al., Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes, *Journal of Medicinal Chemistry* **41** 1007-1010 (1998)
 14. Mannhold, Kubinyi, Folkers, Methods and Principles in Medicinal Chemistry, *WILEY-VCH* **5.3.2**
 15. Irvine et al., MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A Tool for Membrane Permeability Screening, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **88** 28-33 (1999)
 16. M.A. Catino, "Studio del meccanismo di oligomerizzazione di proteine smistate alla superficie apicale in cellule epiteliali polarizzate.", *Tesi di dottorato in Patologia e Fisiopatologia Molecolare, Università degli studi di Napoli Federico II* (2008)
 17. Di Li et al., Development of a New Permeability Assay Using Low Efflux MDCKII Cells, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **11-227.R1** (2011)
 18. Balimane, Chong, Cell culture-based models for intestinal permeability: a critique, *Drug Discovery Today*, vol.**10** No.5 (2005)
 19. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/it/thumb/d/da/Diapositiva2.JPG/450px-Diapositiva2.JPG>
 20. Ertl et al., Fast Calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *Journal of Medicinal Chemistry* **43** 3714-3717 (2000)
 21. http://en.wikipedia.org/wiki/Partition_coefficient
 22. Lipinski et al., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews* **23** 3-25 (1997)
 23. Yamashita et al., Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **10** (2000) 195-204
 24. S. Yee, In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man-fact or myth, *Pharmaceutical Research* **14** (6) 1997
 25. H. Lennernas, Human intestinal permeability, *Journal of Pharmaceutical Sciences* vol.**87** No.4 (1998)
 26. Lennernas et al., A residence-time distribution analysis of the hydrodynamics within the intestine in man during a regional single-pass perfusion with Loc-I-Gut: in vivo permeability estimation, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **49** 682-686 (1997)
 27. Uhing, Kimura, The effect of surgical bowel manipulation and anesthesia on intestinal glucose absorption in rats, *Journal of Clinical Investigation* Vol. **95**, 2790-2798 (1995)
-

28. Amidon et al., A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: the correlation of in vitro drugproduct dissolution and in vivo bioavailability, *Pharmaceutical Research*, Vol. **12**, N. 3, 413-420 (1995)
 29. Barthe et al., The improved everted gut sac: a simple method to study intestinal P-glycoprotein, *International Journal of Pharmaceutics* **173** 255–258 (1998)
 30. <http://www.ama-assn.org/ama/pub/physician-resources/medical-science/united-states-adopted-names-council.page>
-

Se sei arrivato qui per cercare il tuo nome tra gli altri, come ho fatto io nella stessa occasione con le persone più importanti dei miei meravigliosi anni all'università, allora a te va il mio grazie.

Perché ci sei sempre stato, mi hai dato la forza nei momenti difficili, mi hai strappato un sorriso quando ero intrattabile. Oppure eri lontano e ti cercavo, o ti amavo.

