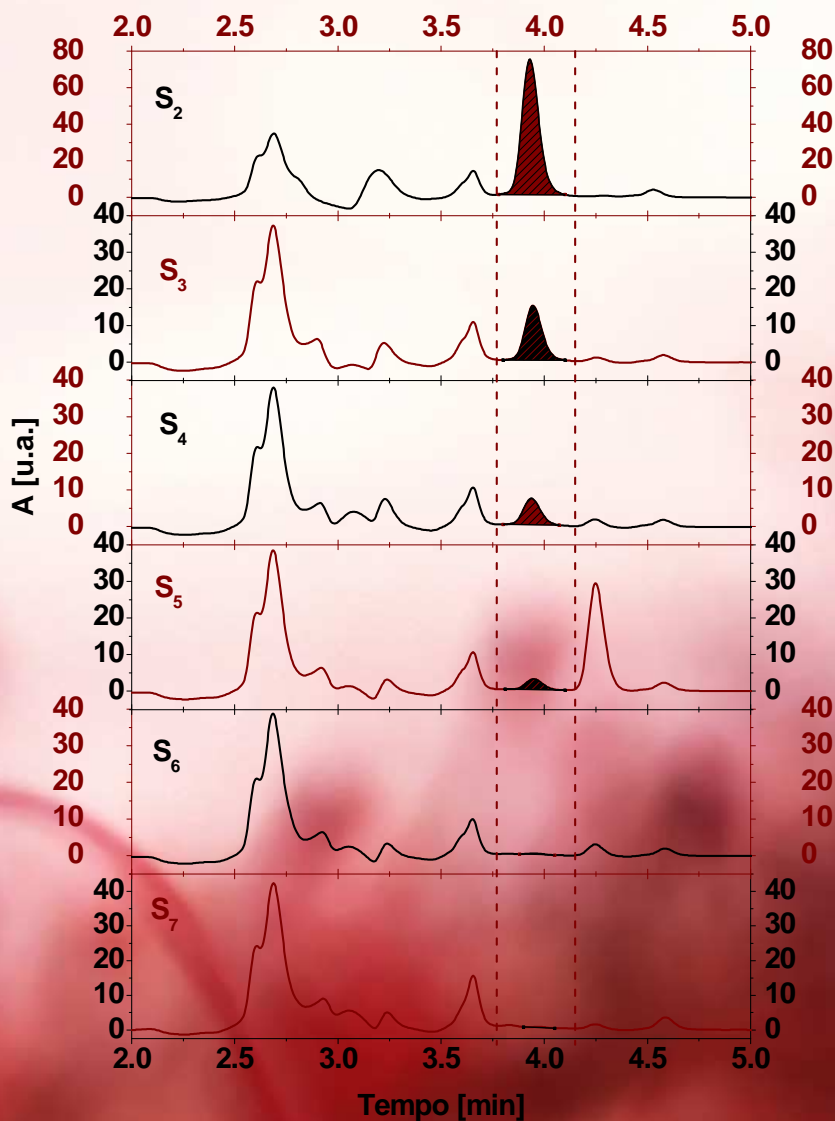


Studio della cinetica di degradazione enzimatica del Remifentanil



Piera Della Porta



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Studio della cinetica di degradazione enzimatica del Remifentanil

Tesi in
Principi di Ingegneria Chimica

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Prof. Ornella Piazza

Correlatori:

Ing. Sara Cascone

Candidato:

Piera Della Porta

matricola 0612200216

Anno Accademico 2012/2013

*Alla mia famiglia ed in particolare
a colui che nonostante non ci sia ora
c'è sempre stato.*

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman
La data prevista per la discussione della tesi è il 24 Luglio 2013
Fisciano, 18/07/13

Sommario

Sommario	I
Indice delle figure	III
Indice delle tabelle	VII
Abstract	IX
Introduzione.....	1
1.1 Oppioidi _____	2
1.1.1 Farmacologia degli oppioidi	2
1.1.2 Recettori oppioidi	3
1.2 Oppioidi come anestetici _____	4
1.2.1 Classificazione degli oppioidi	5
1.2.2 Farmacocinetica e farmacodinamica del Remifentanil	6
1.2.3 Caratteristiche delle esterasi aspecifiche	9
1.3 Stato dell'arte _____	11
1.3.1 Gruppo di ricerca del Dipartimento di Anestesiologia dell'Università di Atlanta, Georgia [5]	11
1.3.2 Gruppo di ricerca del Dipartimento di Anestesiologia dell'Università di Stanford, California [6]	12
1.3.3 Gruppo di ricerca del Dipartimento di Ingegneria Industriale dell'Università di Salerno[4]	13
1.3.4 Gruppo di ricerca del Dipartimento di Anestesiologia dell'Università di Beijing [7]	15
1.3.5 Gruppo di ricerca dell'Istituto di Ricerca della Glaxo Inc., USA [8]	17

1.3.6 Gruppo di ricerca del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università del Maryland [9]	18
1.4 Obiettivo della tesi _____	19
Materiali e metodi.....	21
2.1 Materiali _____	22
2.1.1 Remifentanil	22
2.1.2 Enzimi	25
2.2 Apparecchiature _____	27
2.1.1 HPLC	27
2.3 Metodi _____	28
2.3.1 Preparazione della soluzione madre	28
2.3.2 Descrizione del sistema simulante il sito del metabolismo del farmaco	29
2.3.3 Metodi analitici	30
2.3.4 Taratura del metodo	31
Risultati e discussione.....	33
3.1 Tarature _____	34
3.1.1 Descrizione delle tarature e discussione delle problematiche relative	34
3.2 Effetto dei parametri operativi _____	46
3.2.1 Effetto della temperatura	47
3.2.2 Effetto del pH	49
3.2.3 Effetto del tipo di esterasi	52
3.3 Cinetica di degradazione con esterasi da fegato di maiale_	55
Conclusioni	65
4.1 Conclusioni_____	66
Bibliografia	69

Indice delle figure

Figura 1. Rappresentazione della modalit� di azione del sistema oppioide [13].	4
Figura 2. Concentrazione di fentanil (giallo) e alfentanil (blu) in vari organi e tessuti in un uomo di 70 Kg dopo un'iniezione intravenosa di 1 mg di ciascun principio attivo [2].	7
Figura 3. Effetto della temperatura di diversi tipi di esterasi [11].	10
Figura 4. Effetto del pH su diverse esterasi [10].	11
Figura 5. Profili delle concentrazione-tempo di remifentanil nel sangue alle diverse dosi.	12
Figura 6. Rappresentazione schematica dei tre modelli compartimentali.	14
Figura 7. Confronto tra i valori di concentrazione nel sangue a le curve di modellazione nel caso di un'infusione intravenosa di 20 min (a ₁) e nel caso di un'infusione rapida(per bolo) (b ₁).	14
Figura 8. Curve concentrazione-tempo durante le fasi preanepatica, anepatica e neoanepatica del trapianto [7].	16
Figura 9. Grafico delle concentrazioni previste dal modello (PRED) contro le concentrazioni misurate (DV) [7].	17
Figura 10. Cromatogramma rappresentativo di sangue umano (a) e canino (b) con campioni standard di calibrazione di 2.0 ng/mL di sangue umano e 100 ng/mL di sangue canino [8].	18
Figura 11. Cromatogrammi rappresentativi del sangue senza farmaco (a) e del sangue campione con una concentrazione di farmaco di 25 ng/mL (b) [9].	19
Figura 12. Struttura chimica del remifentanil.	22
Figura 13. Legame estere, sito del metabolismo per le esterasi del sangue e dei tessuti nella molecola del Remifentanil.	23
Figura 14. Flaconi di Ultiva nelle diverse quantit�.	23
Figura 15. I principali metaboliti del remifentanil [2].	24
Figura 16. Coltura di <i>Rhizopus Oryzae</i> .	25
Figura 17. Fiala di esterasi da <i>Rhizopus Oryzae</i> della Sigma-Aldrich.	26

Figura 18. Fiala di esterasi da fegato di cavallo della Sigma-Aldrich.	26
Figura 19. Fiala di esterasi da fegato di maiale della Sigma-Aldrich.	27
Figura 20. Rappresentazione schematica di un HPLC. (1) serbatoi per i solventi, (2) degasatore per i solventi, (3) pompa, (4) recipiente di miscelazione, (5) pompa ad alta pressione, (6) alloggio campioni, (7) ciclo del campione durante l'iniezione, (8) pre-colonna, (9) colonna di cromatografia, (10) rivelatore ad UV, (11) calcolatore per l'acquisizione dei dati, (12) serbatoio di uscita per i solventi esauriti [12].	28
Figura 21. Sistema creato per riprodurre l'ambiente fisiologico.	29
Figura 22. Tipico cromatogramma del remifentanil, i punti rappresentano gli estremi di integrazione e l'area campita rappresenta l'integrale sotteso al segnale.	31
Figura 23. Tipica retta di taratura del Remifentanil.	32
Figura 24. Taratura sulla polvere n°1 al tempo $t_1=0$ (a sinistra (T_1)) e al tempo $t_2=180$ giorni (a destra (T_2)).	35
Figura 25. Confronto del valore dell'integrale alla concentrazione di 500 ng/mL per le tarature a $t_1=0$ e $t_2=180$ giorni della polvere 1	37
Figura 26. Retta di taratura corrispondente alla taratura al tempo $t_1=0$, le linee verticali rappresentano il campo di confidenza in cui le tarature sono state considerate affidabili	37
Figura 27. Retta di taratura corrispondente alla taratura al tempo $t_2=180$ giorni	38
Figura 28. Cromatogrammi della taratura al tempo $t_3=0$ (T_3)	39
Figura 29. Cromatogrammi della taratura al tempo $t_4=99$ giorni (T_4)	40
Figura 30. Cromatogrammi della taratura al tempo $t_5=160$ giorni (T_5)	40
Figura 31. Cromatogrammi della taratura al tempo $t_6=172$ giorni. (T_6)	41
Figura 32. Retta di taratura al tempo $t_3=0$	43
Figura 33. Retta di taratura al tempo $t_4=99$ giorni	43
Figura 34. Retta di taratura al tempo $t_5=160$ giorni	44
Figura 35. Retta di taratura al tempo $t_6=172$ giorni	44
Figura 36. Confronto del valore dell'integrale alla concentrazione di 500 ng/mL nel tempo	45
Figura 37. Grafico della concentrazione del farmaco nel tempo, la linea retta continua è una linea guida per facilitare la lettura dei dati sperimentali [1;2;-;7.4;34°C;-;2.5mL;T6]	47
Figura 38. Grafico della concentrazione di farmaco nel tempo alla temperatura di 37°C [2;2;-;7.4;37°C;-;2.5mL;T5]	48
Figura 39. Grafico della concentrazione del farmaco nel tempo alla temperatura di 41°C [3;2;-;7.4;41°C;-;2.5mL;T4]	49

Figura 40. Grafico della concentraione di farmaco nel tempo ad un pH di 1.96 [4;1;-;1.96;37°C;-;2.5mL;T1].....	50
Figura 41. Grafico della concentrazione del farmaco nel tempo a pH 7.4 [5;2;-;7.4;37°C;-;2.5mL;T4].....	51
Figura 42. Grafico della concentrazione di farmaco nel tempo ad un pH 9.24 [6;2;-;1.96;37°C;-;2.5mL;T6].....	52
Figura 43. Grafico della concentrazione nel tempo con esterasi da Rhizopus Oryzae [7;1;ERO;7.4;37°C;540 ng/mL;2.5mL;T1]	53
Figura 44. Grafico ella concentrazione nel tempo con esterasi da fegato di cavallo [8;2;EFC;7.4;37°C;800 ng/mL;2.5mL;T5]	54
Figura 45. Grafico della concentrazione del farmaco nel tempo con esterasi da fegato di maiale [9;1;EFM;7.4;37°C;200 ng/mL;2.5mL;T1]	55
Figura 46. Grafico della concentrazione di farmaco nel tempo con l'aggiunta di 2 mL di soluzione di enzima corrispondenti in questo caso a 400 ng/mL [10;1;EFM;7.4;37°C;400 ng/mL;2.5mL;T1].....	56
Figura 47. Grafico della concentrazione di farmaco nel tempo con una quantità di soluzione di enzima uguale a 3 mL corrispondenti ad una concentrazione di 600 ng/mL [11;1;EFM;7.4;37°C;600 ng/mL;2.5mL;T1]	57
Figura 48. Grafico della concentrazione di farmaco nel tempo con l'aggiunta di 4 mL di soluzione enzimatica corrispondenti ad una concentrazione di 800 ng/mL [12;1;EFM;7.4;37°C;800 ng/mL;2.5mL;T1]	58
Figura 49. Confronto tre le tre prove di cinetica del farmaco con l'esterasi ottenuta dal fegato di maiale con concentrazioni di 400 ng/mL, 600 ng/mL e 800 ng/mL.	59
Figura 50. Confronto tra due prove con la stessa concentrazione di enzima di 400 ng/mL, ma con una concentrazione di substrato diversa. [13;2;EFM;7.4;37°C;400 ng/mL;2.5 mL;T5] [14;2;EFM;7.4;37°C;400 ng/mL;5mL;T5].....	60
Figura 51. Fitting dei dati sperimentali della prova numero 13.....	62
Figura 52. Modello che fitta i dati sperimentali.	63

Indice delle tabelle

Tabella 1. Dati chimico-fisici e farmacocinetici per oppioidi di uso comune [2].....	8
Tabella 2. Proprietà fisico-chimiche del remifentanil.	24
Tabella 3. Metodo HPLC per rilevare il remifentanil.....	30
Tabella 4. Concentrazioni e integrali dei picchi relativi alla taratura al tempo $t_1=0$ e al tempo $t_2=180$ giorni relativi alla polvere 1.....	36
Tabella 5. Dati relativi a tutte le tarature effettuate sulla polvere 2.....	42
Tabella 6. Tabella riepilogativa delle prove fatte	64

Abstract

Remifentanil is an opioid that combines the speed of action of drugs metabolized by esterases with potent analgesic properties of the class of piperidines. The purpose of this work was to evaluate the kinetics of degradation of remifentanil varying both: the type of enzyme used, as well as their concentrations. The operating parameters of temperature and pH were also changed to evaluate their effects on the degradation.

First of all, the degradation time of remifentanil solutions under optimal storage conditions, temperature and pH, has been evaluated. The solution of remifentanil was analyzed during the time and the calibrations of a HPLC method, performed with the same solution, were compared. From the comparison of the integrals of the peaks of the drug, corresponding to a chosen concentration, was observed a significant decay of the integral for the same concentration in time, even after few days. Furthermore it was observed in all calibrations obtained that the relation between peak and concentration is not linear for concentrated solutions, and for too low concentrations is not reliable because of the resolution limits of the analytical instrumentation. The degradation time of the drug was taken into account for each experiment.

To reproduce in vitro physiological conditions, a reaction system consisting of a thermostated beaker has been developed. To evaluate the effect of operating parameters on the degradation of remifentanil, different conditions have been simulated. The temperature was changed to simulate the physiological conditions, but also

hyperthermia and fever, and especially in order to analyze the effect of these conditions on the degradation of the drug. In the same way the pH of the solution was varied to evaluate its influence on the degradation. Finally, different types of enzymes were tested to evaluate the enzymatic kinetics. During the tests, samplings of the solution were withdrawn and analyzed by HPLC. For the analysis a method based on the literature has been used.

Concerning the effect of temperature and pH, the remifentanil concentration is not affected by these parameters, it maintains a constant concentration during the time. The first two types of esterase (in particular the first esterase extracted from *Rhizopus oryzae* and the second extracted from horse liver), used in different amounts, showed no effect on the degradation of the drug, while using the esterase from pig liver was noted a decay of the concentration of drug already at low amounts of enzyme. Thus, the kinetics with different amount of enzyme and different amount of the substrate were analyzed.

Bibliografia

1. Gullo A., *Anestesia Clinica*, Springer (1998).
2. Miller R. ,MD, L.Eriksson, et al., *Miller's Anesthesia*, sez.III cap. 25, Churchill Livingstone (2009).
3. [Di Meo A., Bufalari A., *Gli anestetici oppiacei di nuova generazione*] https://centri.unipg.it/cesda/doc/files/articoli/oppiacei_di_nuova_generazione.pdf
4. Cascone S., Lamberti G., et al., *Pharmacokinetics of Remifentanil:a three-compartmental modeling approach*, Translational Medicine @ Unisa, in stampa.
5. Westmoreland, C.L, et al., *Pharmacokinetics of remifentanil(GI87084B) and its major metabolite (GI90291) in patients undergoing elective inpatient surgery*. Anesthesiology, 1993. **79**(5):p.893.
6. Egan, T.D., et al., *The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanil (GI87084B) in healthy adult male volunteers*. Anesthesiology, 1993. **79**(5):p.881.
7. Zhang L., et al., *Population pharmacokinetics of remifentanil in patients undergoing orthotopic liver transplanation*. Chin Med J, 2009. 122(9): p. 1032.
8. Selinger K., Lanzo C., et al., *Determination of remifentanil in human and dog blood by HPLC with UV detection*, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, Vol. 12, No.2, p. 243,1994.
9. Haidar S. H., et al., *Determination of remifentanil, an ultra-short-acting opioid anesthetic, in rat blood by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, p. 1727,1996.
10. Bergmann F., Rimon S., *The effect of pH variations on the Activity of C-Esterase*, *Biochemical Journal*, 1958, 70(2) p. 338.
11. Giver L., Gershenson A., et al., *Directed evolution of a thermostable esterase*, Proc. Natl. Acad. Sci. Biochemistry, vol.95, 1998, p.12809.
12. [<http://en.wikipedia.org/wiki/HPLC>]

13. [http://xfiles.farmacia.uniba.it/farmol/didattica_web/64/argomenti-12-13/AnalgesiciOppiodi.pdf]
-

Ringraziamenti

Nonostante sia sembrato impossibile fino all'ultimo giorno, alla fine, tra ansia, Sumeri, criminal case, balze qua e là e tanto oppio ce l'ho fatta anche io.

Il merito di tutto questo non è semplicemente riconducibile a me, ma a tutte le persone che in un modo o nell'altro hanno fatto parte del mio percorso universitario.

Prima di tutto un ringraziamento va al prof. Lamberti che non solo è stato sempre presente e disponibile, ma è stato anche il primo a credere in me, a scommettere su di me e spero (anche se non gli è piaciuto il mio abstract) di non averlo deluso. E poi gli sono grata perchè mi ha dato la possibilità di conoscere persone eccezionali che altrimenti non avrei avuto la possibilità di conoscere.

Tra queste persone quella che si merita un grazie gigantesco è Sara, che nonostante tutto il mio piattolume, è sempre stata paziente e comprensiva, mi ha insegnato più di quanto immagina, e spero un giorno di diventare anche solo la metà di quello che è lei oggi. E poi devo ringraziare Gianni, il mio dispensatore di consigli e all'occasione moralizzatore, e poi Felice, senza il quale non solo non avrei potuto scrivere le conclusioni di questo lavoro di tesi, ma me la sarei fatta a piedi tutte le sere;!), e poi devo ringraziare Carmen che con la sua pazzia mi ha sempre tirato su anche nei momenti più bui, e non posso dimenticare Pietro, che nonostante mi abbia tirato i piedi fino all'ultimo, tifava per me, e Valentina, compagna di tesi, che mi ha

resa più ansiosa di quello che fossi (ma che mi ripagherà con la nostra festa di laurea) e poi Elena, Margherita e tutti i ragazzi del lab T5A e del lab di farmacia.

Come dimenticare tutte le mie compagne e compagni di questi anni di studi con i quali ho condiviso gioie e dolori, in primis Antonella senza la quale probabilmente sarebbe stato tutto molto più complicato e poi Nadia, Simona, Lucia, Mery, Chiara, Daniele. E poi Fabris per tutte le volte che mi ha fatto trovare la cena pronta, quando tornavo a casa stanchissima!! Ma anche la mia quasi coinquilina Annalisa! Ringrazio tutti per esserci sempre stati.

Ringrazio la mia Bietta, costante della mia vita, per avermi sempre appoggiata e sostenuta.

Ringrazio la mia famiglia, mia madre Paola, mio padre Patrizio, mia sorella Delia, mia nonna Adelina, e tutti i miei zii, per avermi dato la possibilità di arrivare fin qui, per avermi appoggiata sempre e comunque, per avermi ascoltata, consolata, compresa, aiutata. Senza di voi non sarei quello che sono oggi.

Ed infine un grosso, enorme grazie va a Nicola, che mi ha sopportata e accompagnata per questi anni, mi ha tirata su quando proprio nessuno ci riusciva, per tutti gli infiniti pianti che ha consolato, per le passeggiate sotto il sole a ripetere, per le nostre lavagne sul muro e tutte le litigate sui problemi di fisica. Grazie!

