

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA  
in  
Scienze Farmaceutiche

Ciclo XX

Settore/i scientifico disciplinari di afferenza: CHIM/08

TITOLO TESI

**Caratterizzazione del legame di molecole  
di interesse farmaceutico alla  
sieroalbumina umana mediante  
biocromatografia e dicroismo circolare**

**Presentata da: MARCO PISTOLOZZI**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. Maurizio Recanatini**

**Prof. Carlo Bertucci**

**Esame finale anno 2008**



# INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RIASSUNTO .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ABSTRACT.....</b>   | <b>9</b>  |
| <b>LA SIEROALBUMINA.....</b>                                       | <b>15</b> |
| 1.1 STRUTTURA E PROPRIETÀ .....                                    | 15        |
| 1.2 FLESSIBILITÀ .....   | 18        |
| 1.3 EQUILIBRI CONFORMAZIONALI.....                                 | 19        |
| 1.4 CARATTERISTICHE SPETTROSCOPICHE .....                          | 20        |
| 1.4.1 Assorbanza .....   | 20        |
| 1.4.2 Fluorescenza.....  | 22        |
| 1.4.3 Dicroismo circolare (CD).....                                | 22        |
| 1.5 SITI DI LEGAME .....   | 23        |
| 1.5.1 Sito I.....  | 26        |
| 1.5.2 Sito II.....   | 28        |
| 1.5.3 Altri siti di legame .....                                   | 29        |
| 1.5.4 Interazioni per il legame ad HSA.....                        | 30        |
| 1.6 PROPRIETÀ ENZIMATICHE .....                                    | 31        |
| 1.7 PATOLOGIE .....  | 33        |
| <b>CROMATOGRAFIA DI AFFINITA' E BIOCROMATOGRAFIA.....</b>          | <b>37</b> |
| 2.1 PRINCIPI.....  | 39        |
| 2.2 STUDIO DELLE PROTEINE DEL SIERO MEDIANTE HPALC .....           | 41        |
| 2.2.1 Eluizione zonale.....  | 43        |
| 2.2.1.1 Valutazione della percentuale di legame.....               | 45        |
| 2.2.1.2 Studi di competizione.....                                 | 46        |
| 2.2.2 Analisi Frontale.....  | 48        |
| 2.2.2.1 Principi generali del metodo.....                          | 49        |
| 2.2.2.2 Misura dell'affinità e del numero dei siti di legame ..... | 50        |
| <b>DICROISMO CIRCOLARE NELLO STUDIO DEL LEGAME</b>                 |           |
| <b>FARMACO PROTEINA .....</b>                                      | <b>53</b> |
| 3.1 PRINCIPI DELLA SPETTROSCOPIA CD.....                           | 53        |
| 3.2 SPETTRO DI DICROISMO CIRCOLARE E SPETTRO DI                    |           |
| DISPERSIONE OTTICA ROTATORIA.....                                  | 54        |
| 3.3 DICROISMO CIRCOLARE ED ELLITTICITA' .....                      | 56        |
| 3.4 APPLICAZIONI E VANTAGGI DEL DICROISMO CIRCOLARE .....          | 58        |
| 3.5 STUDIO DEL LEGAME FARMACO PROTEINA .....                       | 60        |

**DETERMINAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI LEGAME ALLA SIEROALBUMINA UMANA DI UNA SERIE DI INIBITORI DELLA PROTEASI HIV..... 67**

|  |    |
|--|----|
| 4.1 INTRODUZIONE.....  | 67 |
| 4.1.1 <i>Farmacocinetica</i> .....   | 71 |
| 4.2 SCOPO DEL LAVORO .....   | 72 |
| 4.3 MATERIALE UTILIZZATO .....   | 73 |
| 4.4 DERIVATIZZAZIONE DI UNA COLONNA EPOXY KROMASIL CON HSA .....                       | 75 |
| 4.5 ANALISI FRONTALE .....   | 75 |
| 4.5.1 <i>Soluzioni</i> .....   | 76 |
| 4.6 CONTROLLO DELL'EFFICIENZA SEPARATIVA DELLA COLONNA.....                            | 77 |
| 4.7 ANALISI DEL LEGAME DI INIBITORI DELLA PROTEASI-HIV ALL'HSA .....                   | 78 |
| 4.7.1 <i>Determinazione della percentuale di legame tramite biocromatografia</i> ..... | 78 |
| 4.7.2 <i>Studi di competizione tramite biocromatografia</i> .....                      | 79 |
| 4.7.3 <i>Studi di competizione tramite dicromismo circolare</i> .....                  | 80 |
| 4.8 RISULTATI E DISCUSSIONE .....  | 82 |
| 4.8.1 <i>Caratterizzazione della colonna</i> .....                                     | 82 |
| 4.8.2 <i>Titolazione dei siti di legame attivi</i> .....                               | 83 |
| 4.8.3 <i>Controllo dell'efficienza separativa</i> .....                                | 84 |
| 4.8.4 <i>Interazione degli inibitori della proteasi-HIV con HSA</i> .....              | 85 |
| 4.8.5 <i>Studi di competizione tramite biocromatografia</i> .....                      | 88 |
| 4.8.6 <i>Studi di competizione tramite dicromismo circolare</i> .....                  | 90 |
| 4.9 CONCLUSIONI .....  | 91 |

**DETERMINAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI LEGAME ALLA SIEROALBUMINA UMANA DI UNA SERIE DI POLIAMMINOCHINONI ..... 105**

|  |     |
|--|-----|
| 5.1 INTRODUZIONE .....   | 105 |
| 5.2 SCOPO DEL LAVORO .....   | 110 |
| 5.3 MATERIALE UTILIZZATO .....   | 111 |
| 5.3.1 <i>Strumentazione</i> .....  | 113 |
| 5.4 DERIVATIZZAZIONE DI UNA COLONNA MONOLITICA DI SILICE EPOXY CON HSA .....           | 113 |
| 5.5 ANALISI FRONTALE .....   | 114 |
| 5.5.1 <i>Soluzioni</i> .....   | 114 |
| 5.6 CONTROLLO DELL'EFFICIENZA SEPARATIVA DELLA COLONNA.....                            | 115 |
| 5.7 ANALISI DEL LEGAME DI UNA SERIE DI POLIAMMINOCHINONI ALL'HSA .....                 | 116 |
| 5.7.1 <i>Determinazione della percentuale di legame tramite biocromatografia</i> ..... | 116 |
| 5.7.2 <i>Studi di competizione tramite dicromismo circolare</i> .....                  | 117 |
| 5.8 VALUTAZIONE DELLA STABILITÀ DELLA COLONNA .....                                    | 117 |
| 5.9 RISULTATI E DISCUSSIONE .....  | 118 |
| 5.9.1 <i>Caratterizzazione della colonna</i> .....                                     | 118 |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 5.9.2   | <i>Titolazione dei siti di legame attivi</i>   | 118        |
| 5.9.3   | <i>Controllo dell'efficienza separativa</i>  | 120        |
| 5.9.4   | <i>Interazione dei poliamminochinoni con la sieralbumina umana</i>                   | 121        |
| 5.9.5   | <i>Studi di competizione tramite dicroismo circolare</i>                             | 125        |
| 5.9.6   | <i>Valutazione della stabilità della colonna</i>                                     | 126        |
| 5.10  | <b>CONCLUSIONI</b>   | 127        |
| <b>SVILUPPO DI UN METODO HIGH-THROUGHPUT-SCREENING PER LA CARATTERIZZAZIONE DEL LEGAME DEI FARMACI ALLA SIEROALBUMINA UMANA</b> |  | <b>131</b> |
| 6.1   | <b>INTRODUZIONE</b>  | 131        |
| 6.2   | <b>SCOPO DEL LAVORO</b>  | 132        |
| 6.3   | <b>MATERIALE UTILIZZATO</b>  | 133        |
| 6.3.1   | <i>Strumentazione</i>  | 134        |
| 6.4   | <b>DERIVATIZZAZIONE DI UNA COLONNA MONOLITICA DI SILICE EPOXY CON HSA</b>            | 135        |
| 6.5   | <b>ANALISI FRONTALE</b>  | 135        |
| 6.5.1   | <i>Soluzioni</i>   | 136        |
| 6.6   | <b>CONTROLLO DELL'EFFICIENZA SEPARATIVA DELLA COLONNA</b>                            | 137        |
| 6.6.1   | <i>Procedimento</i>  | 137        |
| 6.7   | <b>STUDIO DELLA FRAZIONE LEGATA MISURATA AL VARIARE DEL FLUSSO DELLA FASE MOBILE</b> | 137        |
| 6.8   | <b>HIGH-THROUGHPUT-SCREENING DI UNA SERIE DI MOLECOLE PER IL LEGAME ALL'HSA</b>      | 138        |
| 6.8.1   | <i>Determinazione della percentuale di legame</i>                                    | 138        |
| 6.8.2   | <i>Studi di competizione al sito I</i>   | 139        |
| 6.8.2   | <i>Stabilità della colonna</i>   | 139        |
| 6.9   | <b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>   | 140        |
| 6.9.1   | <i>Caratterizzazione della colonna</i>   | 140        |
| 6.9.2   | <i>Titolazione dei siti di legame attivi</i>   | 140        |
| 6.9.3   | <i>Controllo dell'efficienza separativa della colonna</i>                            | 142        |
| 6.9.4   | <i>Studio della frazione legata misurata al variare del flusso della fase mobile</i> | 143        |
| 6.9.5   | <i>High-throughput-screening di una serie di molecole per il legame all'HSA</i>      | 145        |
| 6.9.6   | <i>Studio di competizione al sito I</i>  | 149        |
| 6.9.7   | <i>Stabilità della colonna</i>   | 155        |
| 6.10  | <b>CONCLUSIONI</b>   | 156        |
| <b>BIBLIOGRAFIA</b>   |  | <b>157</b> |



Dottorato di Ricerca in Scienze Farmaceutiche (XX ciclo)

CARATTERIZZAZIONE DEL LEGAME DI MOLECOLE DI INTERESSE  
FARMACEUTICO ALLA SIEROALBUMINA UMANA MEDIANTE  
BIOCROMATOLOGRAFIA E DICROISMO CIRCOLARE

Marco Pistolozzi

*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Bologna,  
Bologna*

**Riassunto**

Negli ultimi anni, un crescente numero di studiosi ha focalizzato la propria attenzione sullo sviluppo di strategie che permettessero di caratterizzare le proprietà ADMET dei farmaci in via di sviluppo, il più rapidamente possibile. Questa tendenza origina dalla consapevolezza che circa la metà dei farmaci in via di sviluppo non viene commercializzato perché ha carenze nelle caratteristiche ADME, e che almeno la metà delle molecole che riescono ad essere commercializzate, hanno comunque qualche problema tossicologico o ADME [1].

Infatti, poco importa quanto una molecola possa essere attiva o specifica: perché possa diventare farmaco è necessario che venga ben assorbita, distribuita nell'organismo, metabolizzata non troppo rapidamente, né troppo lentamente e completamente eliminata. Inoltre la molecola e i suoi metaboliti non dovrebbero essere tossici per l'organismo.

Quindi è chiaro come una rapida determinazione dei parametri ADMET in fasi precoci dello sviluppo del farmaco, consenta di risparmiare tempo e denaro, permettendo di selezionare da subito i composti più promettenti e di lasciar perdere quelli con caratteristiche negative.

Questa tesi si colloca in questo contesto, e mostra l'applicazione di una tecnica semplice, la biocromatografia, per caratterizzare rapidamente il legame di librerie di composti alla sieralbumina umana (HSA). Inoltre mostra l'utilizzo di un'altra tecnica indipendente, il dicroismo circolare, che permette di studiare gli stessi sistemi farmaco-proteina, in soluzione, dando informazioni supplementari riguardo alla stereochimica del processo di legame.

La HSA è la proteina più abbondante presente nel sangue. Questa proteina funziona da carrier per un gran numero di molecole, sia endogene, come ad esempio bilirubina, tiroxina, ormoni steroidei, acidi grassi, che xenobiotici. Inoltre aumenta la solubilità di molecole lipofile poco solubili in ambiente acquoso, come ad esempio i tannini. Il legame alla HSA è generalmente stereoselettivo e ad avviene a livello di siti di legame ad alta affinità. Inoltre è ben noto che la competizione tra farmaci o tra un farmaco e metaboliti endogeni,

possa variare in maniera significativa la loro frazione libera, modificandone l'attività e la tossicità.

Per queste sue proprietà la HSA può influenzare sia le proprietà farmacocinetiche che farmacodinamiche dei farmaci. Non è inusuale che un intero progetto di sviluppo di un farmaco possa venire abbandonato a causa di un'affinità troppo elevata alla HSA, o a un tempo di emivita troppo corto, o a una scarsa distribuzione dovuta ad un debole legame alla HSA. Dal punto di vista farmacocinetico, quindi, la HSA è la proteina di trasporto del plasma più importante.

Un gran numero di pubblicazioni dimostra l'affidabilità della tecnica biocromatografica nello studio dei fenomeni di bioriconoscimento tra proteine e piccole molecole [2-6].

Il mio lavoro si è focalizzato principalmente sull'uso della biocromatografia come metodo per valutare le caratteristiche di legame di alcune serie di composti di interesse farmaceutico alla HSA, e sul miglioramento di tale tecnica. Per ottenere una miglior comprensione dei meccanismi di legame delle molecole studiate, gli stessi sistemi farmaco-HSA sono stati studiati anche con il dicroismo circolare (CD).

Inizialmente, la HSA è stata immobilizzata su una colonna di silice epossidica impaccata 50 x 4.6 mm di diametro interno, utilizzando una procedura precedentemente riportata in letteratura [7], con alcune piccole modifiche.

In breve, l'immobilizzazione è stata effettuata ponendo a ricircolo, attraverso una colonna precedentemente impaccata, una soluzione di HSA in determinate condizioni di pH e forza ionica. La colonna è stata quindi caratterizzata per quanto riguarda la quantità di proteina correttamente immobilizzata, attraverso l'analisi frontale di L-triptofano [8]. Di seguito, sono stati iniettati in colonna alcune soluzioni raceme di molecole note legare la HSA in maniera enantioselettiva, per controllare che la procedura di immobilizzazione non avesse modificato le proprietà di legame della proteina.

Dopo essere stata caratterizzata, la colonna è stata utilizzata per determinare la percentuale di legame di una piccola serie di inibitori della proteasi HIV (IPs), e per individuarne il sito(i) di legame. La percentuale di legame è stata calcolata attraverso il fattore di capacità ( $k$ ) dei campioni. Questo parametro in fase acquosa è stato estrapolato linearmente dal grafico  $\log k$  contro la percentuale ( $v/v$ ) di 1-propanolo presente nella fase mobile. Solamente per due dei cinque composti analizzati è stato possibile misurare direttamente il valore di  $k$  in assenza di solvente organico.

Tutti gli IPs analizzati hanno mostrato un'elevata percentuale di legame alla HSA: in particolare, il valore per ritonavir, lopinavir e saquinavir è risultato maggiore del 95%. Questi risultati sono in accordo con dati presenti in letteratura, ottenuti attraverso il biosensore ottico [9]. Inoltre, questi risultati sono coerenti con la significativa riduzione di attività inibitoria di questi

composti osservata in presenza di HSA. Questa riduzione sembra essere maggiore per i composti che legano maggiormente la proteina [10].

Successivamente sono stati eseguiti degli studi di competizione tramite cromatografia zonale. Questo metodo prevede di utilizzare una soluzione a concentrazione nota di un competitore come fase mobile, mentre piccole quantità di analita vengono iniettate nella colonna funzionalizzata con HSA. I competitori sono stati selezionati in base al loro legame selettivo ad uno dei principali siti di legame sulla proteina. In particolare, sono stati utilizzati salicilato di sodio, ibuprofene e valproato di sodio come marker dei siti I, II e sito della bilirubina, rispettivamente. Questi studi hanno mostrato un legame indipendente dei PIs ai siti I e II, mentre è stata osservata una debole anticooperatività per il sito della bilirubina.

Lo stesso sistema farmaco-proteina è stato infine investigato in soluzione attraverso l'uso del dicroismo circolare. In particolare, è stata monitorata la variazione del segnale CD indotta da un complesso equimolare [HSA]/[bilirubina], a seguito dell'aggiunta di aliquote di ritonavir, scelto come rappresentante della serie. I risultati confermano la lieve anticooperatività per il sito della bilirubina osservato precedentemente negli studi biocromatografici.

Successivamente, lo stesso protocollo descritto precedentemente è stato applicato a una colonna di silice epossidica monolitica 50 x 4.6 mm, per valutare l'affidabilità del supporto monolitico per applicazioni biocromatografiche. Il supporto monolitico ha mostrato buone caratteristiche cromatografiche in termini di contropressione, efficienza e stabilità, oltre che affidabilità nella determinazione dei parametri di legame alla HSA. Questa colonna è stata utilizzata per la determinazione della percentuale di legame alla HSA di una serie di poliamminochinoni sviluppati nell'ambito di una ricerca sulla malattia di Alzheimer.

Tutti i composti hanno mostrato una percentuale di legame superiore al 95%. Inoltre, è stata osservata una correlazione tra percentuale di legame e caratteristiche della catena laterale (lunghezza e numero di gruppi amminici). Successivamente sono stati effettuati studi di competizione dei composti in esame tramite il dicroismo circolare in cui è stato evidenziato un effetto anticooperativo dei poliamminochinoni ai siti I e II, mentre rispetto al sito della bilirubina il legame si è dimostrato indipendente.

Le conoscenze acquisite con il supporto monolitico precedentemente descritto, sono state applicate a una colonna di silice epossidica più corta (10 x 4.6 mm). Il metodo di determinazione della percentuale di legame utilizzato negli studi precedenti si basa su dati ottenuti con più esperimenti, quindi è necessario molto tempo prima di ottenere il dato finale. L'uso di una colonna più corta permette di ridurre i tempi di ritenzione degli analiti, per cui la determinazione della percentuale di legame alla HSA diventa molto più rapida. Si passa quindi da una analisi a medio rendimento a una analisi di screening ad alto rendimento (high-throughput-screening, HTS). Inoltre, la riduzione dei tempi di analisi, permette di evitare l'uso di solventi organici nella fase mobile.

Dopo aver caratterizzato la colonna da 10 mm con lo stesso metodo precedentemente descritto per le altre colonne, sono stati iniettati una serie di standard variando il flusso della fase mobile, per valutare la possibilità di utilizzare flussi elevati. La colonna è stata quindi impiegata per stimare la percentuale di legame di una serie di molecole con differenti caratteristiche chimiche. Successivamente è stata valutata la possibilità di utilizzare una colonna così corta, anche per studi di competizione, ed è stata indagato il legame di una serie di composti al sito I. Infine è stata effettuata una valutazione della stabilità della colonna in seguito ad un uso estensivo.

L'uso di supporti cromatografici funzionalizzati con albumine di diversa origine (ratto, cane, guinea pig, hamster, topo, coniglio), può essere proposto come applicazione futura di queste colonne HTS. Infatti, la possibilità di ottenere informazioni del legame dei farmaci in via di sviluppo alle diverse albumine, permetterebbe un migliore paragone tra i dati ottenuti tramite esperimenti in vitro e i dati ottenuti con esperimenti sull'animale, facilitando la successiva estrapolazione all'uomo, con la velocità di un metodo HTS. Inoltre, verrebbe ridotto anche il numero di animali utilizzati nelle sperimentazioni. Alcuni lavori presenti in letteratura dimostrano l'affidabilità di colonne funzionalizzate con albumine di diversa origine [11-13]: l'utilizzo di colonne più corte potrebbe aumentarne le applicazioni.

CHARACTERISATION OF DRUG BINDING TO SERUM ALBUMINS BY  
BIOCHROMATOGRAPHY AND CIRCULAR DICHROISM

Marco Pistolozzi

*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Bologna,  
Bologna*

**Abstract**

Lately, an increasing number of scientists, academics as well as pharmaceutical industries, have focused their attention on the development of strategies to characterise the ADMET properties of the candidate drugs as early as possible. This trend is due to the awareness that about half of all drugs in development fail to make it to the market because of ADME deficiencies and that at least half of the ones that do make it to market still have some ADME or toxicological problems [1]. No matter how active nor specific is a chemical: to turn it into drug it needs to be well absorbed, distributed throughout the body, metabolised in a not too rapid nor too slow way and completely eliminated. Moreover, it and its metabolites should not be toxic for the body. Thus, it is clear how a rapid determination of ADMET parameters in early stages of drug discovery would save money and time, allowing to choose the better compounds and to eliminate any losers, early and cheaply.

This thesis is set in this context, showing the application of a simple technique, biochromatography, to quickly evaluate candidate drugs as far as binding to human serum albumin (HSA) is concerned. Furthermore it shows another suitable independent technique, namely circular dichroism, able to study the same drug-protein system, allowing a deeper insight into the stereochemistry of the binding process.

HSA is the most abundant protein in the blood. It acts as a carrier for a wide range of molecules either endogenous, such as bilirubin, tiroxine, steroid hormones and fatty acids, or xenobiotics. Furthermore, it allows the solubilisation of hydrophobic compounds (e.g. taxanes), characterized by very low solubility. The binding to albumin is usually stereoselective and occurs at high-affinity binding sites level. It is also well known that competition of drugs for the same sites on HSA can meaningfully alter their free fraction affecting their activity and toxicity. Thus, by its binding properties, HSA can affect the pharmacokinetics as well as the pharmacodynamic properties of drugs. It is not unusual that even whole drug discovery projects have been abandoned due to very strong binding to HSA or short lifetime or poor distribution due to weak binding. This makes HSA the most important serum protein from a pharmacokinetics point of view.

A large body of literature has showed the reliability of the biochromatographic technique for the study of the biorecognition processes between proteins and small molecules [2-6].

My work was mainly finalised to use this technique to evaluate the binding characteristics of series of compounds and to improve such technique. To obtain a better comprehension of the binding mechanisms of the molecules investigated, circular dichroism was also employed.

First, HSA was immobilised onto a classic packed epoxy silica-based column 50 x 4.6 mm i.d. using a slightly modified procedure previously reported [7]. In brief, the immobilisation was achieved by overnight recirculation of a solution of HSA through the column previously packed with epoxy silica particles, at set pH and ionic strength. Then, the column was characterised in terms of amount of HSA correctly immobilised by the frontal analysis of L-tryptophan [8]. By injecting some racemates known to bind the protein in a stereoselective manner, we also checked that the immobilisation procedure would preserve the binding properties of the free protein. The column so characterised was employed to determine the binding percentage of a small series of five HIV protease inhibitors (PIs), and also it was attempted to identify their binding site(s). The bound drug percentage was calculated from the capacity factor ( $k$ ) of the samples. This parameter in only aqueous phase was extrapolated by linearly plotting the  $\log k$  values against the percentage (v/v) of 1-propanol in the eluent mixtures. Only for two of the five compounds, it has been possible to measure the  $k$  value without organic modifier. All of the IPs analysed proved to strongly bind HSA; in particular the percentage of binding for ritonavir, lopinavir and saquinavir was found to be higher than 95%. The results are in agreement with data achieved by optical biosensor technique previously published [9]. In addition, these results are consistent with the significant reduction of their inhibitor activity observed in the presence of HSA. This effect seems to be greater for the inhibitors strongly bound to the protein [10].

Displacement studies were also performed by zonal elution approach. By this method, a known concentration of a competitive agent is continuously applied in the mobile phase to the HSA-based column, while small amounts of the studied drugs are injected. The competitors employed were chosen for their selective binding in the main binding areas of HSA. In particular salicylate, ibuprofen, and valproate were employed as markers of Sudlow's site I, of Sudlow's site II, and of bilirubin site, respectively. The displacement studies have shown an independent binding of PIs to sites I and II, while a slight anticooperativity was observed for the bilirubin site. The same system, drug – target protein, was finally investigated in solution using circular dichroism spectroscopy. The change in the induced CD spectrum of an equimolar complex HSA/bilirubin was monitored once increasing amounts of ritonavir, chosen as representative of the series, were added. The results confirmed a slight anticooperativity for the bilirubin binding site observed by the biochromatographic approach.

Subsequently, the validation protocol previously described was applied to a novel 50 mm epoxy silica-based monolithic column to evaluate the reliability of using such support for biochromatographic studies. That monolithic column showed good chromatographic characteristics in terms of backpressure, efficiency and stability as well as reliability in drug binding parameters determination. Such column was applied in the determination of the binding percentage to HSA of a series of poliaminoquinones developed within a project on Alzheimer's disease. All samples showed a binding percentage higher than 95%. Furthermore, the data obtained showed a good correlation between binding percentage and side chain chemical features (length and number of amine groups). Also in this case circular dichroism provided useful information about the binding sites on HSA of the chemicals studied: displacement studies indicated an anticooperative binding of these poliaminoquinones to sites I and II, while an independent binding with respect to bilirubin site was observed.

The knowledge built up with the monolithic support previously described was applied to a shorter monolithic column (10 x 4.6 mm). The method previously described for the binding percentage determination is based on the data of several analyses, so it is time consuming. The use of a shorter column allows reducing the retention times of analytes. As a consequence the time needed to determine the binding percentage to HSA of a series of molecules undergo a tremendous decrease, turning such biochromatography from medium to high-throughput screening technique. Furthermore, the significant retention time shortness makes unnecessary the use of organic modifier, like 1-propanol, in the mobile phase. After the characterisation of the short column as previously described for the other columns, a series of standards were injected, also by changing the flow rate in order to evaluate the possibility to use high flows. The column was then employed to investigate the binding percentage to HSA and the main binding sites of a series of molecules with different moieties. Finally, the stability of the column was evaluated, in terms of reliability of results after repeated analysis.

The development of chromatographic supports based on albumins from other mammalian species (i.e. rat, dog, guinea pig, hamster, mouse, rabbit) may be proposed as a future application of these short columns. In fact, this would allow a better comparison between data achieved by in-vitro experiments and data collected by experiments on animals, making easier the following data extrapolation to human, with the speed of an high-throughput screening method. Moreover it may reduce the number of animals used for pharmacokinetics investigations. Some papers previously published proved the reliability of these albumin-based supports [11-13]: using a shorter column may enhance its applications.



# **CAPITOLO 1**

## **LA SIEROALBUMINA**



# LA SIEROALBUMINA

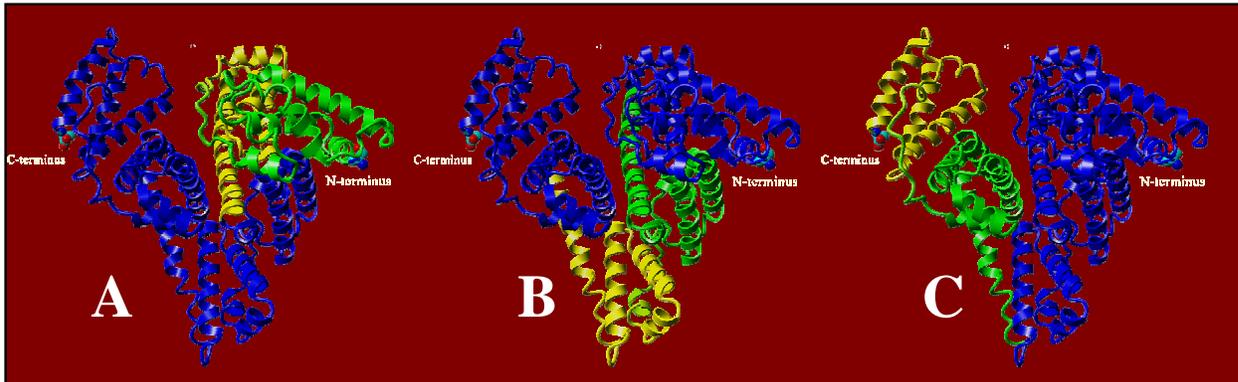
Fra tutte le proteine, l'albumina è probabilmente la più studiata in assoluto. Nonostante questo, ancora oggi, dopo oltre 80 anni di studi, molte sue proprietà non sono state completamente chiarite. La sua complessità ha attirato, e attira tuttora numerosi studiosi, anche a causa del suo importante ruolo in numerosi processi fisiologici e patologici.

L'albumina è la più abbondante proteina del siero dei vertebrati (~600  $\mu\text{M}$ , 42 g/L nell'uomo) [14] e le sue principali funzioni fisiologiche sono correlate alla sua caratteristica capacità di legare un vasto numero di composti, sia endogeni che esogeni. Per esempio, il legame all'albumina permette di solubilizzare molecole poco solubili in ambiente acquoso (es. acidi grassi), oppure permette di sequestrare molecole potenzialmente tossiche (es. bilirubina) [15]. Inoltre può anche fungere da antiossidante, in quanto può interagire o inibire la formazione di vari agenti ossidanti [16]. Infine, grazie alle sue proprietà di legame, l'albumina agisce da carrier di metaboliti, (es. L-triptofano, tiroxina e gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ) [14], e di farmaci. Un altro importante ruolo svolto dall'albumina è il rilevante apporto alla pressione colloidale-osmotica (80%) che deriva dalla sua elevata concentrazione e dal suo peso molecolare relativamente basso.

## 1.1 STRUTTURA E PROPRIETÀ

La struttura primaria della sieralbumina umana (HSA) era già conosciuta [17, 18] ben prima della determinazione tramite cDNA [19]. Tramite questi studi è stato dimostrato che HSA è una proteina con una massa molecolare di circa 66500 Da costituita da una singola catena polipeptidica di 585 amminoacidi. La presenza di 17 ponti disolfuro determina una struttura a nove (in realtà otto e mezzo) doppi loops. Questi loops possono essere ulteriormente raggruppati in tre domini omologhi, ognuno dei quali comprendente due loops lunghi separati da un loop corto. I tre domini omologhi vengono numerati I, II e III a partire dal residuo N-terminale. All'interno di ogni dominio, i primi due

loops (loops 1-2, 4-5 e 7-8) sono raggruppati rispettivamente nei sottodomini IA, IIA, e IIIA e i loops 3, 6 e 9 vengono detti, rispettivamente, sottodomini IB, IIB, e IIIB (Fig. 1.1). I tre domini, e i rispettivi sottodomini, benché omologhi, hanno caratteristiche di legame differenti.



**Fig. 1.1** Struttura cristallina di HSA (PDB ID: 1AO6). Suddivisione dei domini e sottodomini di HSA. (A) Dominio I; (B) Dominio II; (C) Dominio III. Sottodomini A (in verde); Sottodomini B (in giallo). Immagine creata a partire dal file PDB con il software freeware YASARA® ([www.yasara.org](http://www.yasara.org))

Per quanto riguarda la composizione amminoacidica, la caratteristica peculiare di HSA è la presenza di un unico residuo di Trp e da una elevata presenza di residui di Cys. Inoltre, rispetto alla media delle proteine (dalla struttura primaria nota nel 1987), HSA ha un basso contenuto di Met, Gly e Ile, mentre sono numerosi i residui di Leu e amminoacidi ionici quali Glu e Lys [14]. Il grande numero di amminoacidi ionizzabili, conferisce ad HSA un'elevata carica totale, 185 ioni per molecola a pH 7, che rende merito della sua elevata solubilità. I residui acidi superano in numero quelli basici determinando a pH 7 una carica netta di -15. Questa carica non è uniformemente distribuita nella molecola: è più elevata nel dominio I (-9), si riduce nel dominio II (-8) e quasi si annulla nel dominio III (+2). Dividendo la molecola di HSA a metà (dominio I + IIA e dominio IIB + III), la prima metà ha una carica netta a pH 7.4 di -14, mentre la seconda di -1. Il punto isoionico, cioè il pH di soluzione di HSA completamente deionizzata, è circa pH 5.2 [20]; in contrasto il punto isoelettrico, cioè il pH in cui la carica netta della proteina è zero, in NaCl 0.15 M è circa pH 4.7 [21]: probabilmente gli ioni cloruro e gli acidi grassi legati alla

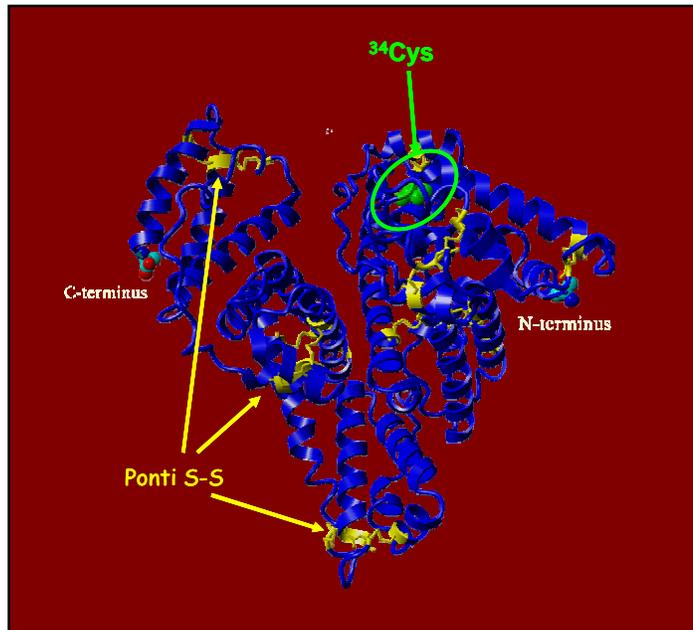
proteina determinano la riduzione di questo valore rispetto al punto isoionico. [14].

HSA è costituita solamente da amminoacidi, senza gruppi prostetici; inoltre, non avendo sequenze Asn-X-Ser/Thr, necessarie per le N-glicosilazioni, è una delle poche proteine del siero non glicosilata. In tre delle varianti note di HSA, le mutazioni creano sequenze di Asn-X-Ser/Thr: la glicosilazione di questi siti non sembra comunque avere effetti funzionali. In realtà, comunque, l'HSA circolante accumula del glucosio attraverso reazioni di glicosilazione non enzimatica ed altre sostanze, come per esempio Cys o glutatione, attraverso la formazione di un legame covalente tra i gruppi -SH di queste molecole e il residuo di <sup>34</sup>Cys libero da ponti disolfuro. L'assenza di carboidrati viene usata come criterio di purezza delle preparazioni di HSA: l'albumina pura deve contenere meno dello 0,05% (p/p) di carboidrati [20]. Inoltre le preparazioni di HSA in genere contengono piccole quantità di molecole molto affini, come bilirubina o emina, che causano la tipica colorazione giallastra delle soluzioni concentrate della proteina, altrimenti incolori.

I 35 residui di Cys formano 17 ponti disolfuro, lasciando libero il solo residuo <sup>34</sup>Cys (Fig. 1.2). Di questo residui, quasi la metà si trova in posizioni adiacenti lungo la catena. Benché sia stato dimostrato che due Cys adiacenti possano formare un legame S-S tra di loro [22], generalmente si considera che ogni Cys formi un ponte disolfuro con il residuo di Cys più vicino, prima e dopo la coppia Cys-Cys. La presenza dei numerosi ponti disolfuro spiega sia la sua flessibilità, sia la sua particolare resistenza alle condizioni esterne.

Per quanto riguarda la struttura tridimensionale, studi di idrodinamica [23] e di small-angle neutron scattering [24] convergono nell'attribuire a HSA in soluzione una forma a sigaro (ellissoide di rotazione) con l'asse maggiore di 140 Å e quello minore di 40 Å. Quando invece si trova sottoforma di cristallo, l'albumina assume una forma tetraedrica simile a quella di un cuore [25], formato da triangoli equilateri di 80 Å per lato, con uno spessore medio di 30 Å. Questa differenza rende conto della grande flessibilità della proteina in funzione delle condizioni in cui si trova. L'analisi ai raggi X ha permesso anche di determinare la struttura secondaria di HSA che, allo stato solido, presenta il 67%

di  $\alpha$ -elica, il 10% di  $\beta$ -turn ed il restante 23% di catena estesa [25], [PDB ID: 1AO6].



**Fig. 1.2** Struttura cristallina di HSA (PDB ID: 1AO6). Disposizione dei residui di cisteina di HSA. Ponti disolfuro (in giallo);  $^{34}\text{Cys}$  (in verde). Immagine creata a partire dal file PDB con il software freeware YASARA® ([www.yasara.org](http://www.yasara.org))

## 1.2 FLESSIBILITÀ

L'albumina non è una proteina statica, ma è caratterizzata da una elevata flessibilità tanto da arrivare a descriverla come una molecola “che scalcia e urla” [26]. L'intera molecola ruota in circa 40 nsec (coefficiente di diffusione rotazionale). La struttura a serie di loop permette alla proteina di espandersi, contrarsi e flettersi molto rapidamente, sia a seguito del legame di molecole, ma anche quando si trova da sola. L'adattamento strutturale che avviene in occasione del legame delle molecole all'albumina è molto rapido ed avviene in circa 0.1-0.3 sec [14]. La velocità di scambio dei protoni labili con l'acqua viene spesso utilizzata per misurare la flessibilità delle proteine. Gli studi vengono effettuati tramite il trizio, sfruttando la sua radioattività come label, o più comunemente col deuterio che può essere facilmente analizzato tramite risonanza magnetica nucleare (NMR) [27]. A pH fisiologico, circa 750 dei 1100

protoni potenzialmente labili dell'albumina bovina (BSA), scambiano con una velocità che non può essere misurata tramite NMR, addirittura a 0°C. Altre due classi di 280 protoni totali, scambiano con velocità di  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  sec<sup>-1</sup>. I restanti 70 non scambiano neanche dopo 24 ore [27]. Questa elevata velocità di scambio dei protoni è una caratteristica peculiare dell'albumina, addirittura unica tra le proteine non enzimatiche [28], ed è probabilmente correlata alla sua propensione a legare svariati ligandi. Benché si assuma che l'albumina abbia un'unica forma in soluzione, è più realistico pensare ad una molecola in continuo cambio di conformazione, infatti molti autori si riferiscono all'albumina come a una proteina che “respira” [15, 27].

### 1.3 EQUILIBRI CONFORMAZIONALI

L'albumina subisce varie transizioni conformazionali in funzione del pH in cui si trova. Al momento sono state identificati quattro isomeri della forma normale (conformazione N): estesa (extended, E) a pH <3, rapida (fast, F) a pH 4, basica (basic, B) a pH 8 e invecchiata (aged, A) intorno a pH 10. Gli equilibri tra queste conformazioni sono completamente reversibili.

La forma F è la predominante a PH 4 e prende il nome dal fatto che migra più rapidamente della forma N su gel elettroforesi [29]. L'albumina in questa forma diventa meno compatta e meno solubile. Il contenuto di alfa elica si riduce, anche se non in maniera drastica. Esperimenti effettuati su frammenti della proteina suggeriscono che la durante la transizione N-F, i domini III + IIB si separino dai domini I + IIA [25].

Scendendo al di sotto di pH 3, si ha un'ulteriore rilassamento della molecola, che diventa completamente estesa e perde quasi completamente la sua struttura terziaria. Il segnale CD residuo che si osserva in queste condizioni viene attribuito a piccole porzioni ordinate dalla presenza dei ponti disolfuro.

La forma B diventa predominante a pH 8, il che significa che è presente anche in condizioni di pH fisiologico. Per questo motivo molti ricercatori attribuiscono alla forma B un'importanza fisiologica e per il trasporto dei farmaci. Nella forma B, l'albumina sembra perdere rigidità, in particolare nella regione N-

terminale. Alcuni farmaci, noti legare il sito I della proteina, sembrano interagire con la forma B con maggiore affinità rispetto alla forma N, mentre il sito II mostra minori differenze. [14].

La forma A (da non confondere con l'albumina A, il comune allotipo di albumina, (cfr. par. 1.7), scoperta lasciando una soluzione di HSA a pH 9 per 3-4 giorni, è caratterizzata da una banda particolarmente lenta in gel elettroforesi [30]. Questa forma predomina a  $\text{pH} \geq 10$ , e mostra un equilibrio "quasi" reversibile con le forme B e N, anche se procede con una certa inerzia. La composizione in alfa elica non sembra differire molto da quella della forma B [31]. I cromofori e fluorofori della albumina nella forma A appaiono maggiormente esposti ai solventi e la proteina è più suscettibile all'attacco proteolitico, il che indica l'assunzione di una forma più aperta e rilassata, rispetto alla forma N.

## **1.4 CARATTERISTICHE SPETTROSCOPICHE**

Le tecniche spettroscopiche rivelano principalmente i gruppi funzionali che esibiscono proprietà radianti: assorbanza, fluorescenza, polarizzazione, rotazione della luce e radiazioni Raman. I gruppi responsabili di queste proprietà sono principalmente quelli degli amminoacidi aromatici (Trp, Tyr e Phe, in ordine di attività). Le tecniche principalmente utilizzate per studiare le caratteristiche di legame dell'HSA sono l'assorbimento UV, la fluorescenza e il dicroismo circolare.

### ***1.4.1 Assorbanza***

Nel campo del visibile (400-800 nm), le soluzioni di albumina, essendo incolori, non assorbono luce. Alcune preparazioni possono risultare gialle a causa della presenza di piccole quantità di bilirubina, carotene o, soprattutto nelle preparazioni commerciali, ematina e prodotti di degradazione dell'N-acetil-Trp.

Nel vicino ultravioletto (240-400 nm), l'assorbimento dell'albumina è simile a quello della maggior parte delle proteine senza gruppi prostetici, con un picco intorno a 280 nm. Comunque sia, a causa della presenza di un solo residuo

di Trp, l'assorbività è particolarmente bassa (0.5 contro un'assorbività pari a 1 della maggior parte delle proteine). Questo sottolinea la grande influenza del Trp nella banda a 280 nm, infatti le assorbività ( $\epsilon_{280}$ ) per Trp, Tyr e Phe sono rispettivamente 5540, 1480 e  $\sim 0$ . A causa della presenza di due residui di Trp, anziché uno, l'assorbività della BSA a 280 nm è circa il 25 % più alta di quella della HSA. Il massimo di assorbimento di HSA e BSA non è esattamente 280 nm, ma si aggira tra 278.5-279 nm. Tra pH 5 e pH 8 c'è una lieve differenza di assorbimento, mentre non si osservano differenze cambiando la forza ionica tra 0 e 0.3 M. Il valore di assorbività delle diverse albumine, calcolato a partire dalla composizione amminoacidica considerando anche il contributo dei ponti disolfuro ( $\epsilon_{280}=134$ ) è in ragionevole accordo con quanto determinato sperimentalmente. Per HSA, BSA e RSA (rat serum albumin) le assorbività calcolate sono rispettivamente 0.52, 0.65 e 0.55 [32], mentre quelle sperimentali sono 0.531, 0.661, e 0.59 [14]. La misura dell'assorbanza a 287 nm, dove l'assorbanza delle Tyr è massima, permette di prevederne la posizione relativa all'interno della molecola. Circa due terzi dei 18 residui di Tyr di HSA risultano influenzabili dagli effetti del solvente [33]. Di questi, sei sembrano giacere abbastanza vicino alla superficie da venire influenzati da solventi ingombranti come il glicole polietilenico [34]. Basandosi sull'effetto del blocco di  $^{34}\text{Cys}$ , uno di questi sei sembra vicino ad esso. Presi nel complesso, gli studi delle variazioni spettrali nel vicino ultravioletto indicano che un terzo dei residui di Tyr sono facilmente accessibili e giacciono quindi sulla superficie molecolare della proteina, un altro terzo diventa accessibile in condizioni di pH acido in cui i domini di HSA si separano, mentre l'ultimo terzo diventa accessibile solamente a seguito della riduzione dei residui di Cys che comporta l'apertura irreversibile della struttura tridimensionale della proteina [14]

Nel lontano ultravioletto (sotto 240 nm), l'assorbimento della proteina è dovuto principalmente ai legami peptidici, con un picco vicino a 187 nm [35]. L'assorbanza è molto alta ( $A_{1\text{ g/L}}$  a 190 nm per BSA è circa 50 volte il valore del picco a 280 nm) ed è molto influenzata dalla presenza di gruppi carbossilici o idrossilici. Il minimo di assorbanza nell'intervallo 187-280 nm è centrato a circa 253 nm. Il suo valore di assorbanza è sensibile alla presenza di turbidità o impurezze: una buona soluzione di HSA presenta un  $A_{253} \leq 0.5 \times A_{280}$  [14].

### **1.4.2 Fluorescenza**

La fluorescenza emessa da HSA è attribuita principalmente dal residuo di Trp, ma in realtà anche i numerosi residui di Tyr possono emettere fluorescenza. Utilizzando una  $\lambda$  di eccitazione compresa fra 295 e 305 nm, i residui di Tyr non vengono eccitati, per cui l'emissione centrata intorno a 345 nm è dovuta esclusivamente al residuo di Trp. È però possibile stimare il contributo dei residui di Tyr, utilizzando una  $\lambda$  di eccitazione minore di 295 nm, capace di eccitare sia i residui di Tyr che quello di Trp, sottraendo poi il contributo del Trp misurato a  $\lambda > 295$  nm [14]. La fluorescenza del residuo  $^{214}\text{Trp}$  può essere sfruttata nella caratterizzazione del legame dei farmaci ad HSA [36-38]. Questo residuo infatti, si trova all'interno del sito I (cfr. par. 1.5.1) e le molecole che legano a questo sito, o che ne modificano la struttura in maniera allosterica, variano il microambiente attorno all'amminoacido, variandone di conseguenza il segnale di fluorescenza.

### **1.4.3 Dicroismo circolare (CD)**

L'albumina mostra uno spettro di dicroismo di dicroismo circolare ad alta energia ( $\lambda < 240\text{nm}$ ) dall'aspetto tipico di una proteina ad alto contenuto di  $\alpha$ -elica, con due massimi negativi centrati intorno a 208 e 222 nm, e un massimo positivo centrato intorno a 190 nm.

L'analisi dello spettro CD ha permesso di stimare la struttura secondaria assunta in soluzione dalla proteina e, analizzando lo spettro di dicroismo circolare ad alta energia di HSA attraverso l'uso del software freeware CDPro [39], un programma di calcolo basato su strutture secondarie ottenute tramite diffrazione ai raggi X di svariate proteine, si ottengono dati in accordo con quelli determinati allo stato solido ( $\alpha$ -elica, 63%,  $\beta$ -sheet 3.8%,  $\beta$ -turn 11,8% e catena estesa 21,7%).

Le proprietà di legame delle molecole all'albumina possono essere studiate tramite la tecnica CD, seguendo le variazioni dello spettro di dicroismo circolare indotto (ICD) al variare delle condizioni. Spesso, infatti, il legame di una molecola alla proteina, stabilizza una particolare conformazione che determina una chiralità, anche per molecole non chinali, per cui il legame analita-albumina, genera un segnale CD diverso dalla somma degli spettri dei singoli componenti. Un tipico esempio è rappresentato dal diazepam, un farmaco

achirale che esiste in due conformazioni simmetriche in equilibrio tra loro in soluzione, dette M e P. Il legame del diazepam ad HSA, stabilizzando la conformazione M più di quella P [40, 41], da origine ad un segnale ICD che è stato sfruttato per studiare l'ubicazione del sito a più alta affinità e per determinarne la costante di legame [42].

In studio recente la medesima tecnica è stata utilizzata per identificare le differenze di legame di alcune molecole ad albumine di altri mammiferi [43].

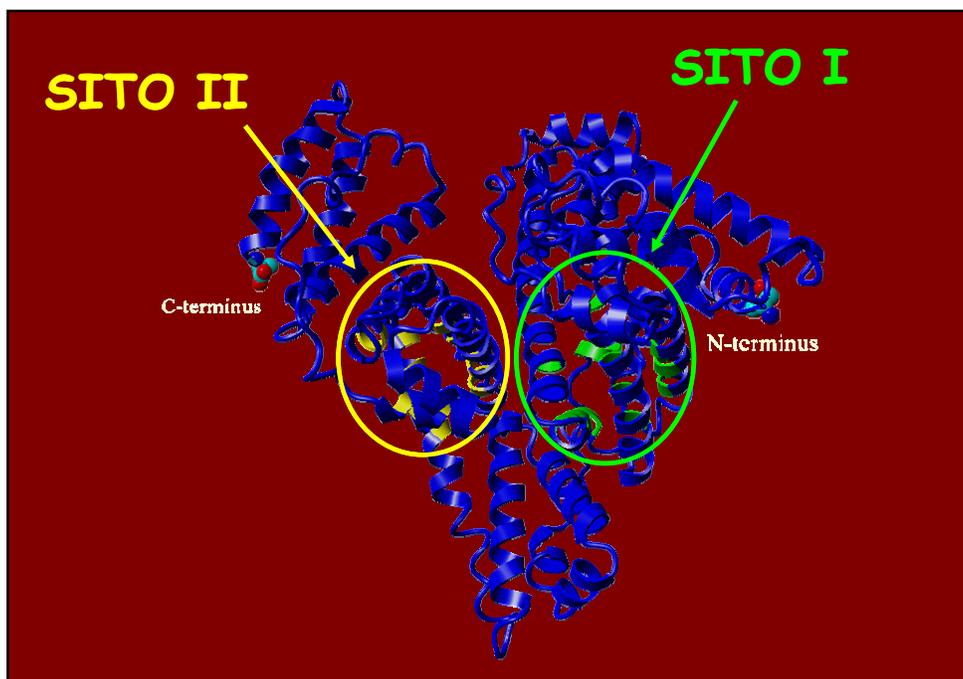
## 1.5 SITI DI LEGAME

L'albumina interagisce con gran numero di molecole, sia endogene che esogene. Generalmente i farmaci legano ad un unico sito, o ad un ristretto numero di siti ad alta affinità, con una costante di associazione compresa tra  $10^4$ - $10^6$   $M^{-1}$  [45]. In aggiunta al sito primario, spesso esistono numerosi siti secondari che i farmaci, generalmente, legano con un'affinità notevolmente inferiore. Comunque, l'attenzione degli studi delle interazioni tra farmaci e HSA viene rivolta quasi esclusivamente ai siti di legame ad alta affinità, perchè la concentrazione di farmaco nel sangue che viene raggiunta in un normale regime terapeutico è generalmente molto più bassa di quella di HSA (~600  $\mu M$ ), per cui si può ragionevolmente supporre che solo i siti ad alta affinità siano effettivamente occupati.

Nel caso di molecole chirali, il legame ad HSA è spesso enantioselettivo; questo fenomeno ha assunto una crescente importanza negli ultimi anni visto che più di un terzo delle molecole commercializzate è chirale. Pertanto è necessario indagare se l'enantioselettività del legame comporta differenze sostanziali nella farmacocinetica del farmaco. Bisogna comunque considerare che le differenze di comportamento farmacocinetico tra enantiomeri sono generalmente di piccola entità, se confrontate con quelle farmacodinamiche.

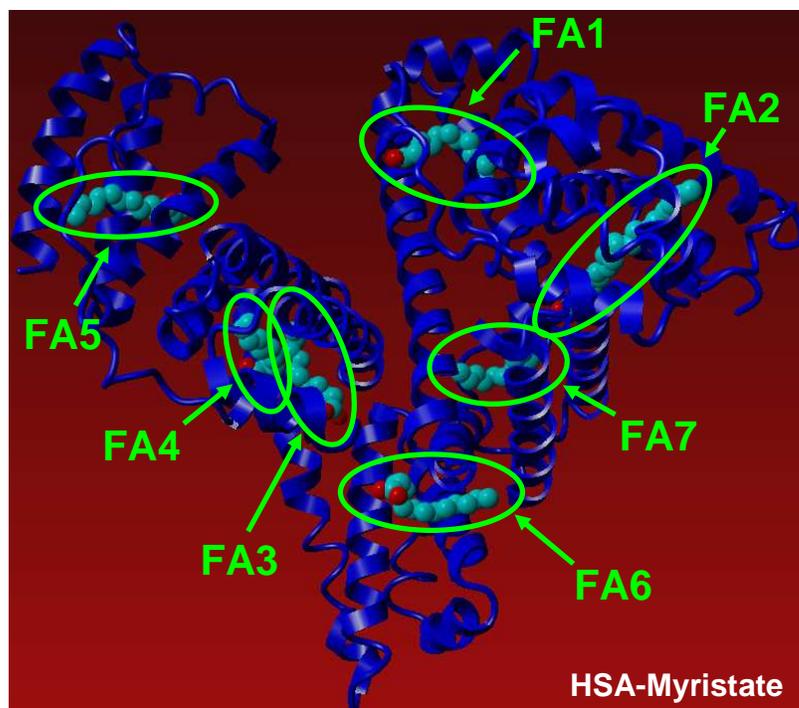
Un lavoro pionieristico di Sudlow e collaboratori [45], basato su studi di competizione con sonde fluorescenti, ha dimostrato l'esistenza di due siti di legame principali, nominati siti I e II, a cui la maggior parte dei farmaci si lega con un'alta affinità (Fig. 1.3).

Uno studio cristallografico più recente [46] ha ampliato questo modello, identificando 7 regioni di legame (nominate FA1-7) per gli acidi grassi saturi a catena lunga; tre dei 7 siti corrispondono ai siti I e II di Sudlow (FA7 e il complesso FA3-FA4, rispettivamente) (Fig. 1.4).



**Fig. 1.3** Struttura cristallina di HSA (PDB ID: 1AO6). Localizzazione dei siti di legame secondo Sudlow et al. Gli amminoacidi considerati importanti per il legame dei farmaci sono indicati in verde (sito I) e in giallo (sito II). Immagine creata a partire dal file PDB con il software freeware YASARA® ([www.yasara.org](http://www.yasara.org))

Studi cristallografici successivi hanno dimostrato che a questi 7 siti legano anche acidi grassi a catena intermedia, gli acidi grassi mono e poliinsaturi a catena lunga [47-49]. Ulteriori studi hanno infine dimostrato che anche l'emina [50, 51], la tiroxina [52] e svariati farmaci [53-56], si legano ad uno o più di questi 7 siti di legame. Studi di NMR al carbonio hanno permesso confermare la localizzazione dei siti di legame di LCFA ed inoltre di determinarne l'affinità relativa. I risultati ottenuti indicano che l'ordine di affinità è FA5>FA4>FA2>>FA1, FA3, FA6, FA7 [57].



**Fig. 1.4.** Struttura cristallina di HSA complessata con miristato (PDB ID: 1E7G). Localizzazione dei siti di legame per gli LCFAs. Immagine creata a partire dal file PDB con il software freeware YASARA® ([www.yasara.org](http://www.yasara.org))

Al momento della stesura di questa tesi sono presenti le strutture ai raggi X di HSA complessata con acidi grassi a catena lunga e intermedia ( PDB ID: 1E7E, 1E7F, 1E7G, 1E7H, 1E7I, 1GNI, 1GNJ) [48, 49], HSA complessata con (PDB ID) acido 3,5-diiodosalicilico (2BXL), azapropazone e indometacina (2BXK), azapropazone (2BXI), fenilbutazone e indometacina (2BXQ), indometacina (2BXM), oxifenbutazone (2BXO), fenilbutazone (2BXP), iodipamide (2BXN), [56], acido triiodobenzoico (1BKE) [46], (S)-warfarin (1HA2), (R)-warfarin (1H9Z) [54], acido salicilico (2I30), acido acetilsalicilico (2I2Z) [58], tiroxina (1HK4) [52], emina (1N5U) [50], alotano (1E7C) [53] in presenza di miristato e HSA complessata con azapropazone (2BX8), warfarin (2BXD), diflunisal (2BXE), diazepam (2BXF), ibuprofene (2BXG), indoxil solfato (2BXH), oxifenbutazone (2BXB), CMPF (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid) (2BXA), fenilbutazone (2BXC) [56], propofol (1E7A), alotano (1E7B) [53], tiroxina (1HK1) [52], in assenza di miristato.

### ***1.5.1 Sito I***

In generale, le molecole che legano ad alta affinità al sito I sono acidi dicarbossilici e/o molecole eterocicliche ingombranti con una carica negativa localizzata al centro della molecola. Queste caratteristiche comunque non sembrano sufficienti per prevedere se una molecola possa legarsi o meno a questo sito, visto che anche molecole con caratteristiche molto diverse, sembrano legarsi al sito I con alta affinità [44]. Il sito I, (detto anche sito di legame warfarin-azapropazone) sembra essere molto capiente ed adattabile, visto che molecole molto ingombranti come la bilirubina possono legarsi; inoltre è stato dimostrato che più molecole possono legare questo sito in maniera indipendente [15], come ad esempio le coppie fenilbutazone-indometacina e azapropazone-indometacina [56]. Questo fenomeno suggerisce l'esistenza di più sottositi parzialmente sovrapposti o comunque, molto vicini tra loro, oppure che variazioni conformazionali guidate dal legame di una molecola, modificando la disposizione tridimensionale del sito, creino, di fatto, un nuovo sito, strutturalmente diverso da quello in assenza della molecola [44]. Forse sarebbe quindi più corretto parlare del sito I come un'"area di legame", piuttosto che di un sito vero e proprio. In un primo modello, il sito I veniva considerato composto da almeno due sottositi sovrapposti (warfarin e azapropazone) [59]. Altri studi più recenti suggeriscono l'esistenza di almeno tre regioni, chiamate Ia, Ib e Ic [60]. Secondo questo modello la regione Ia si collocherebbe tra le regioni Ib e Ic, rivestendo un ruolo di connessione tra questi due sottositi; le regioni Ib e Ic, viceversa, non sembrerebbero connesse fra loro, visto che, da esperimenti di dialisi all'equilibrio, il legame a queste regioni sembra avvenire in maniera indipendente. In realtà, esperimenti di dicroismo circolare hanno dimostrato che il legame di marker specifici del sito Ic, modificando allostericamente il sito Ib, variano l'orientazione spaziale dei marker specifici del sito Ib, senza però influenzarne l'affinità. Questo riarrangiamento conformazionale dell'albumina presenta forti analogie a quello che avviene a seguito della transizione N-B (cfr. par. 1.3), passando da pH 6 a pH 9. Dansil-L-asparagina (DNSA) e n-alchil-p-amminobenzoati vengono utilizzati come marker specifici dei sottositi, Ib e Ic, rispettivamente [61]. Nel cristallo, il sito I di HSA è costituito da una larga tasca idrofobica situata nel dominio IIA, delimitata dalle sei eliche del sottodominio IIA e da un loop (residui 148-154)

del sottodominio Ib. Il residuo <sup>214</sup>Trp, l'unico nella struttura primaria di HSA, si trova all'interno di questa tasca. La parete interna della tasca è formata principalmente da residui idrofobici, a parte due cluster di amminoacidi basici situati nella parte inferiore e all'entrata della tasca. Il sito può essere suddiviso schematicamente in una larga zona centrale, da cui si estendono tre differenti compartimenti: andando verso la parte posteriore si trovano due aree idrofobiche, una a destra e l'altra a sinistra, separate da <sup>264</sup>Ile, mentre il terzo compartimento protrude dalla zona centrale in avanti verso il basso. Dai risultati ottenuti tramite raggi X, si è constatato che in assenza di acidi grassi, warfarin, fenilbutazone, oxifenbutazone e CMPF si posizionano nella porzione centrale della tasca [56], intercalando il loro gruppo planare tra le catene laterali idrofobiche di <sup>238</sup>Leu e <sup>291</sup>Ala. La posizione del resto della molecola è invece molto variabile. Tutti questi farmaci occupano, in maniera più o meno estesa, la porzione posteriore destra, mentre solo fenilbutazone e CMPF proiettano i loro gruppi idrofobici nella porzione posteriore sinistra. La parte anteriore viene occupata dai gruppi fenilici di oxifenbutazone e warfarin. Oltre alle interazioni di tipo idrofobico, tutti i farmaci si posizionano in maniera da formare un legame a idrogeno con il residuo <sup>150</sup>Tyr: questo amminoacido, in assenza di acidi grassi, assume quindi un ruolo centrale per il legame dei farmaci al sito I. In presenza di miristato, invece, <sup>150</sup>Tyr si posiziona in maniera tale da assumere un ruolo marginale per il legame dei farmaci. È interessante notare che gli enantiomeri del warfarin si legano essenzialmente nella stessa maniera e formano entrambi tre legami ad idrogeno. Questo indica che la stereoselettività di HSA nei confronti di queste molecole non è dovuta a differenze di legame al sito I [54]. Un'altra peculiarità è rappresentata dall'orientamento di fenilbutazone e oxifenbutazone all'interno del sito: pur avendo solo una piccola differenza strutturale (l'oxifenbutazone ha un gruppo ossidrilico su uno degli anelli aromatici), le due molecole, in assenza di acidi grassi, si legano in posizioni ruotate di 180° l'una dall'altra. La presenza di miristato, invece, obbliga l'oxifenbutazone a legarsi con la stessa orientazione del fenilbutazone.

### ***1.5.2 Sito II***

Le molecole che legano il sito II (o sito indolo-benzodiazepine) ad alta affinità sono spesso acidi carbossilici aromatici con una carica negativa posizionata ad un estremo della molecola, lontana dal centro idrofobico (ad es. i farmaci antiinfiammatori non steroidei, FANS). Il sito II è più piccolo del sito I, infatti nessuna molecola ingombrante (come ad es. bilirubina, emina, ematina, ed altre porfirine) sembra capace di legarsi a questo sito. Inoltre, sembra essere poco flessibile, perchè il legame è fortemente influenzato dalla chiralità delle molecole. Tipico esempio dell'enantioselettività del sito II è rappresentata del L-Trp che ha un'affinità 100 volte più elevata dell'enantiomero D [62]. Inoltre sostituzioni di piccoli gruppi sui ligandi di questo sito possono influenzare in maniera determinante il legame. Ad esempio il diazepam, ma non il suo analogo fluorurato flunitrazepam, lega il sito II con elevata affinità [63], oppure, la semplice sostituzione del idrogeno  $\alpha$  di L-Trp con un metile impedisce il legame al sito II. Quindi, nonostante svariate molecole siano in grado di legare il sito II, questo sito sembra essere più restrittivo del sito I. In particolari condizioni, comunque, anche il sito II mostra una certa flessibilità, infatti riesce a legare due molecole di acidi grassi (siti FA3 e FA4) [48]. L'analisi cristallografica ha localizzato il sito II all'interno del dominio IIIA ed ha evidenziato che è strutturato essenzialmente come il sito I [56, 64, 65]. I residui  $^{410}\text{Arg}$  e  $^{411}\text{Tyr}$  sono generalmente considerati importanti per il legame delle molecole a questo sito, come ad esempio per il ketoprofene, anche se esperimenti compiuti su rHA hanno dimostrato che  $^{410}\text{Arg}$  non è essenziale per il legame del diazepam [66]. La principale regione di legame del sito II corrisponde alla zona centrale del sito I; da qui si origina un ulteriore compartimento, corrispondente a quello posteriore destro del sito I, benché sia accessibile solamente a seguito di un riarrangiamento ligando-indotto dell'HSA. Sono invece assenti tasche di legame analoghe al compartimento posteriore sinistro e anteriore del sito I. A differenza del sito I, il sito II ha un unico cluster di amminoacidi polari ( $^{410}\text{Arg}$ ,  $^{411}\text{Tyr}$ ,  $^{414}\text{Lys}$ ,  $^{489}\text{Ser}$ ) situati su un lato all'ingresso del sito. Quindi, pur avendo varie analogie, i siti I e II sono chiaramente distinguibili per forma, dimensioni e polarità, e questo dà ragione delle differenti caratteristiche di legame [56]. I ligandi del sito II di cui è stata risolta la struttura cristallina del complesso con l'HSA (diazepam, ibuprofene, diflunisal e indoxil solfato) si posizionano nella

zona centrale del sito, con almeno un ossigeno rivolto nella direzione del cluster polare. L'unica eccezione è il propofol (diisopropilfenolo), il cui gruppo ossidrilico, per ragioni steriche dovute ai suoi gruppi isopropilici, non può interagire con il cluster di amminoacidi polari. Il suo legame viene invece stabilizzato dalla formazione di un legame idrogeno con l'ossigeno carbonilico di  $^{430}\text{Leu}$ .

### ***1.5.3 Altri siti di legame***

Nonostante la classificazione di Sudlow e collaboratori sia ancora molto utile, col passare del tempo sono state raccolte molte evidenze sperimentali che dimostrano che i siti I e II non sono gli unici siti di legame ad alta affinità di HSA. Ad esempio probenecid e amitriptilina non sembrano legare nessuno dei due siti [45], e anche il sito di legame ad alta affinità della digitossina non è stato ancora localizzato [44]. Inoltre, non è chiaramente possibile limitarsi alla classificazione di Sudlow, nel caso di molecole che legano più di due siti. Ad esempio, studi di microcalorimetria e NMR dimostrano che la tolbutamide si lega ad HSA a tre siti con un'affinità comparabile, e non ad un unico sito ad alta affinità [67]. Nonostante sia notorio che i farmaci basici si legano alla  $\alpha$ -AGP con alta affinità, molti di questi si legano con alta affinità anche ad HSA, benché la localizzazione dei loro siti di legame sia ancora sconosciuta [14, 44].

Il legame irreversibile delle molecole a carico della  $^{34}\text{Cys}$  merita un discorso a parte. Il residuo  $^{34}\text{Cys}$  si trova nel dominio IA (Fig. 3) ed è l'unico residuo tiolico libero da legami disolfuro. Generalmente, in circa la metà dei gruppi sulfidrilici dei campioni di HSA  $^{34}\text{Cys}$  non è libera, ma è in realtà presente sottoforma di disolfuri misti con cisteina o glutatione, oppure si trova ossidata a solfito, solfato o sulfonato. Il resto dei gruppi sulfidrilici sono invece liberi e accessibili, e rappresentano la maggiore fonte di gruppi tiolici nel sangue. Questo residuo è quindi disponibile all'attacco di sostanze ossidanti tanto che la quantità di HSA ridotta (mercaptoalbumina) presente nel sangue è stata proposta come biomarcatore dello stress ossidativo [14]. Questo residuo si lega inoltre in maniera irreversibile a svariati farmaci, come ad esempio i derivati bucillamici, aurotiomalato, auranofina, D-penicillamina, captopril, acido etacrinico, cisplatino, ma anche cisteina e N-acetilcisteina [44].

#### ***1.5.4 Interazioni per il legame ad HSA***

Data la grande flessibilità dell'albumina e il numero relativamente piccolo di siti di legame ad alta affinità, il legame di una molecola alla proteina spesso influenza il legame di altre molecole che si legano simultaneamente [68]. Queste alterazioni nel legame all'albumina possono comportare variazioni significative delle proprietà farmacocinetiche dei farmaci, soprattutto nel caso di quelli che competono per lo stesso sito ad alta affinità. In alcuni casi di competizione, comunque, l'incremento della concentrazione di farmaco libero è minore di quello atteso, perchè gran parte del farmaco che viene spiazzato da un sito, va a legarsi ad un altro. Ad esempio il carprofene, spiazzato dal sito II dall'ibuprofene, va a legarsi al sito I. [69]. Lo stesso fenomeno è stato osservato anche con il diclofenac [70].

Il legame dei farmaci può essere modulato anche dal legame simultaneo di composti endogeni, come acidi grassi, metaboliti uremici, sali biliari e bilirubina. Gli acidi grassi a catena lunga (LCFAs) competono con i farmaci per il legame ai siti FA1-7, ed inoltre, possono indurre competizioni di tipo allosterico. Gli acidi grassi competono in maniera diretta con i farmaci che legano il sito II, in quanto corrisponde ai siti a più alta affinità per gli LCFA (FA3-FA4). Viceversa, l'effetto della presenza di LCFAs sul sito I, dipende dalla loro concentrazione: bassi eccessi di LCFA aumentano l'affinità di legame per vari ligandi specifici per il sito I (competizione allosterica positiva) come warfarin, furosemide e bilirubina, mentre alti eccessi LCFAs, invece, diminuiscono l'affinità (competizione allosterica negativa e competizione diretta al sito FA7). [44]

L'insufficienza renale cronica è associata all'accumulo di tossine uremiche nel siero, tra cui anche quattro acidi organici che legano l'albumina e competono con svariati farmaci, come diazepam, warfarin, acido salicilico, furosemide, L-Trp, L-tiroxina e fenitoina. In particolare il CMPF, che lega specificamente il sito I, compete con farmaci che legano allo stesso sito come warfarin, furosemide e bilirubina [71]. Allo stesso modo le tossine indolo-3-acetato, idoxil solfato e ippurato, che legano il sito II con alta affinità, spiazzano i farmaci che legano questo sito. Numerosi farmaci competono con la bilirubina, un prodotto

del catabolismo dell'eme, tossico e insolubile, che viene sequestrato e reso solubile da HSA. Alcuni esempi sono: valproato, ceftriaxone, alcune sulfonammidi come il sulfisossazolo, oxifenbutazone, fenilbutazone, glibenclamide, tolbutamide, warfarin, salicilato e furosemide. I ligandi del sito II, invece, hanno generalmente poco o nessun effetto sul legame della bilirubina. La presenza di alti livelli di bilirubina libera possono essere molto pericolosi, soprattutto nei neonati, per cui tutti i farmaci che vanno somministrati ai neonati dovrebbero essere testati per il loro effetto sul legame della bilirubina ad HSA.

È quindi importante conoscere in dettaglio la dislocazione dei siti di legame delle molecole, in modo da poter prevedere possibili interazioni tra farmaci che devono essere assunti contemporaneamente e tra farmaci e composti endogeni (soprattutto nel caso di farmaci che devono essere assunti in particolari condizioni metaboliche). Queste informazioni, se ottenute in fasi precoci dello sviluppo del farmaco, consentirebbero anche di poter scegliere le migliori modifiche strutturali delle molecole, e quindi di ottenere i farmaci col miglior profilo farmacocinetico possibile.

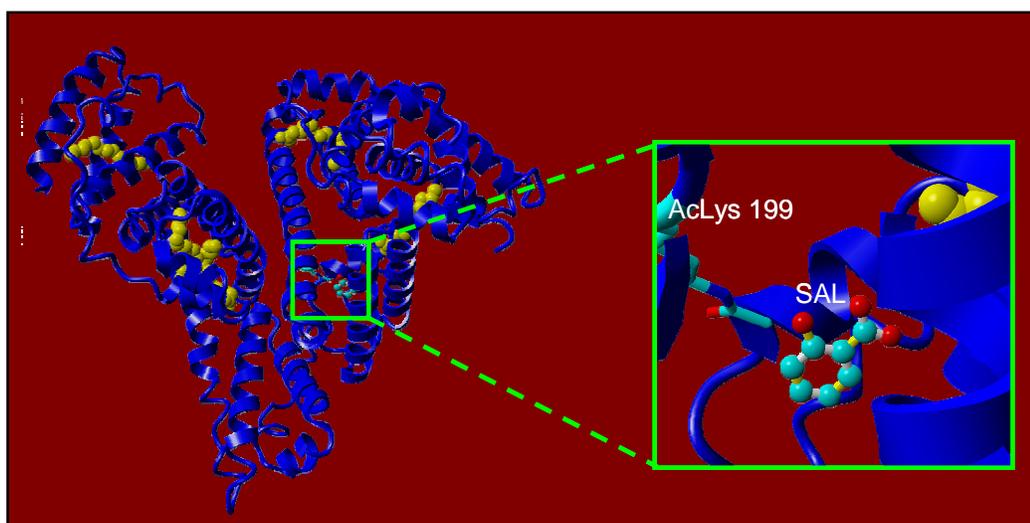
## 1.6 PROPRIETÀ ENZIMATICHE

L'HSA mostra svariate proprietà enzimatiche, anche se il suo ruolo principale resta quello di trasporto. Ad esempio è stata osservata un'attività enolasica di HSA nei confronti del diidrotosterone, da parte del terminale amminico della molecola [72]. Inoltre l'albumina agisce come tioesterasi grazie alla presenza del residuo <sup>34</sup>Cys; questa proprietà acquista importanza, dal punto di vista clinico, in quanto permette la degradazione del disulfiram da parte dell'HSA [73]. HSA catalizza la deidratazione della prostaglandina D<sub>2</sub> e la deidratazione, con conseguente isomerizzazione della 15-keto-prostaglandina E<sub>2</sub>. Gli amminoacidi del dominio IIA possono degradare la sulbenicillina in maniera stereoselettiva, con l'enantiomero R degradato più rapidamente di quello S [44]. Quindi anche l'attività enzimatica di HSA può essere stereoselettiva quanto il legame dei farmaci. Il dominio IIA mostra anche proprietà esterasiche; ad esempio catalizza il trasferimento del gruppo acetilico

dell'aspirina alla  $^{199}\text{Lys}$ . Questo comportamento è stato visto di recente sul cristallo tramite diffrazione ai raggi X [58] (Fig. 1.5).

Il dominio IIIA possiede un'attività esterasica verso vari substrati come il p-nitrofenil acetato e vari altri esteri p-nitrofenilici [66]. L'attività glucuronidasica è invece più difficile da localizzare, perché sembra che i diversi substrati vengano idrolizzati da domini diversi: alcuni, come il diflunisal glucuronide, vengono idrolizzati a livello del sito I [74], altri, come il carprofen glucuronide, a livello del sito II [75], ed altri, come il ketoprofene glucuronide in qualche altra regione della molecola [76].

L'attività enzimatica di HSA può essere sfruttata per usi pratici. Ad esempio è stato messo a punto un metodo di quantificazione della proteina, eseguibile sia tramite fluorimetria che spettrofotometria, che usa come substrato una cumarina [77].



**Fig. 1.5** Struttura cristallina di HSA complessata con acido acetilsalicilico (PDB ID: 2I2Z). Immagine creata a partire dal file PDB con il software freeware YASARA® ([www.yasara.org](http://www.yasara.org))

Inoltre l'attività esterasica di HSA può essere sfruttata per scopi farmaceutici, in quanto permette l'attivazione di profarmaci in farmaci. Ad esempio l'olmesartan medoxolmil viene convertito nel plasma ad olmesartan in pochi secondi [78]. Quindi la grande quantità di albumina circolante permette di

avere idrolisi rapide, benché l'attività enzimatica di HSA, di per se, non sia molto elevata.

## 1.7 PATOLOGIE

Mentre l'iperalbuminemia è quasi sempre dovuta a stati di disidratazione, piuttosto che ad un aumento della sintesi della proteina, l'ipoalbuminemia è generalmente causata da una ridotta sintesi (in certe malattie epatiche), da una maggiore perdita da parte dell'organismo (in casi di sindrome nefrotica e ustioni estese) o da stati di malnutrizione [15].

L'analbuminemia è una malattia ereditaria molto rara [14, 15], caratterizzata da una bassissima concentrazione di albumina nel plasma (si considera analbuminemico un paziente con una concentrazione di albumina inferiore a 1 g/L) trasmessa tramite un tratto autosomico recessivo. Curiosamente, in quasi la metà dei casi, i pazienti sono completamente asintomatici, mentre gli altri hanno solo sintomi clinici poco gravi (generalmente edema e iperlipidemia). Per spiegare questo fenomeno, l'aumento compensatorio dei livelli di altre proteine seriche non sembra sufficiente, per cui ci deve essere l'intervento di altri meccanismi tuttora poco chiari. [14, 15].

Infine, un'altra raro disturbo ereditario che coinvolge l'albumina è la bisalbuminemia, un'anomalia caratterizzata dalla presenza nel siero di una certa quota di albumina "normale", detta albumina A (da non confondere con la forma isomerica **A**, aged, cfr. par. 1.3) e da una certa quota di una sua variante. Questa anomalia ha una prevalenza compresa tra 0,03-0,1% della popolazione generale (quindi è troppo bassa per usare il termine "polimorfismo" che sottintende una prevalenza superiore all'1%) [14]. Siccome solo un terzo degli amminoacidi dell'albumina sono ionizzati, circa la metà delle sostituzioni a singolo residuo non comporterebbero variazioni della carica netta della proteina, quindi queste varianti non sono rivelabili tramite elettroforesi [14]; chiaramente l'uso della spettrometria di massa può risolvere questo problema. Tra i mutanti identificati, solo uno ha mostrato un'alterazione funzionale: la variante con aumentata affinità per la tiroxina osservata nell'ipertiroxinemia disalbuminemia familiare (FDH). Al momento sono state individuate almeno un centinaio di varianti [14].



## **CAPITOLO 2**

# **CROMATOGRAFIA DI AFFINITÀ E BIOCROMATOGRAFIA**



# CROMATOGRAFIA DI AFFINITA' E BIOCROMATOGRAFIA

La cromatografia di affinità si distingue dagli altri tipi di cromatografia perché non sfrutta differenze nelle proprietà fisiche per la separazione delle molecole, ma si avvale dell'estrema specificità delle interazioni biologiche; da questo ne deriva la sua particolare selettività.

Questa tecnica utilizza un ligando biologico come fase stazionaria. I ligandi capaci di interagire biochimicamente col ligando vengono ritenuti, mentre le altre sostanze vengono eluite dalla fase mobile. La tecnica è nata per la purificazione di enzimi, ma le applicazioni si sono rapidamente estese anche a nucleotidi, acidi nucleici, immunoglobuline, recettori di membrana e persino a cellule intere e frammenti cellulari. I ligandi ed i componenti che devono essere separati con questa tecnica di solito sono sia spazialmente che elettrostaticamente complementari l'uno all'altro. Il desorbimento dell'analita è realizzato, generalmente, tramite eluizione con una soluzione che contiene una sostanza che si lega al ligando con maggiore affinità dell'analita.

La biocromatografia è un particolare tipo di cromatografia di affinità, in cui la macromolecola biologica che conferisce selettività (detta ligando), viene immobilizzata sul supporto cromatografico in maniera tale da mantenerne inalterate le proprietà di legame mostrate nella forma nativa. In questa maniera la ritenzione dei soluti iniettati in colonna sarà correlata alla loro affinità per il ligando. La tecnica biocromatografica permette quindi di ottenere informazioni predittive sul legame delle molecole nell'interazione con le proteine [79-82].

L'interazione di piccoli soluti con le proteine è importante in molti processi biologici. Esempi includono l'azione di enzimi sui substrati, il legame degli ormoni con i loro recettori e il legame di farmaci ed altri composti con le proteine del siero.

La tecnica biocromatografica si è dimostrata particolarmente efficace quando applicata alla caratterizzazione dell'interazione tra i farmaci e le proteine del siero, in particolare l'HSA [6]. Più recentemente, questa tecnica è diventata

più raffinata ed inizia ad essere applicata anche allo studio delle interazioni farmaco-recettore [83, 84]

Il legame con le proteine del sangue è importante nel determinare il destino dei farmaci una volta che sono entrati in circolo. Queste interazioni possono influenzare la distribuzione, il metabolismo, la velocità di escrezione, e la tossicità dei farmaci. In aggiunta, la presenza di una competizione diretta o indiretta tra due farmaci o tra un farmaco ed un composto endogeno (per es. un acido grasso) per lo stesso sito di legame con le proteine plasmatiche, può essere l'origine di effetti indesiderati [5]. Per questo è importante avere una buona comprensione di come gli agenti farmaceutici si legano alle proteine del siero e di come queste interazioni siano influenzate da altre sostanze.

Il presupposto necessario per la corretta esecuzione di analisi biocromatografiche è che la proteina legata abbia un comportamento il più possibile simile a quello presentato all'interno dell'organismo. Per verificare che questa condizione sia soddisfatta, i parametri di legame misurati mediante HPALC dovrebbero essere confrontati con quelli ottenuti in soluzione, mediante metodi biochimici, anche se spesso questo confronto non è semplice, a causa delle diverse condizioni impiegate.

Il fatto che la proteina sia stabile e mantenga proprietà di legame costanti, permette di utilizzare una stessa colonna per numerosi esperimenti. Di conseguenza una piccola quantità di proteina risulta sufficiente per condurre molteplici studi e garantisce una buona precisione e riproducibilità di analisi, minimizzando eventuali variazioni dovute a fattori esterni. La possibilità di automatizzare la tecnica e di sfruttare il metodo HPLC, inoltre, conferisce al metodo rapidità e accuratezza, permettendo la rivelazione anche di piccole differenze nell'affinità di legame dei farmaci alla proteina [82].

L'analisi biocromatografica viene condotta tramite due diverse strategie (eluizione zonale e analisi frontale) che permettono di ottenere informazioni diverse. Entrambe vengono ampiamente impiegate per lo studio delle proteine del siero [82].

## 2.1 PRINCÌPI

La cromatografia di affinità (HPALC) é una tecnica di cromatografia liquida impiegata generalmente nella purificazione e nella quantificazione di analiti presenti in matrici complesse.

In questa applicazione, la ritenzione dei soluti é dovuta alle stesse interazioni, specifiche e reversibili, esistenti in un sistema biologico, come il legame di un enzima con il substrato o di un anticorpo con un antigene.

Queste interazioni sono sfruttate nella cromatografia d'affinità attraverso l'immobilizzazione (o l'adsorbimento) di una delle coppie delle molecole interagenti, su di un supporto solido e usando questo come fase stazionaria in un sistema HPLC (Fig. 2.1).

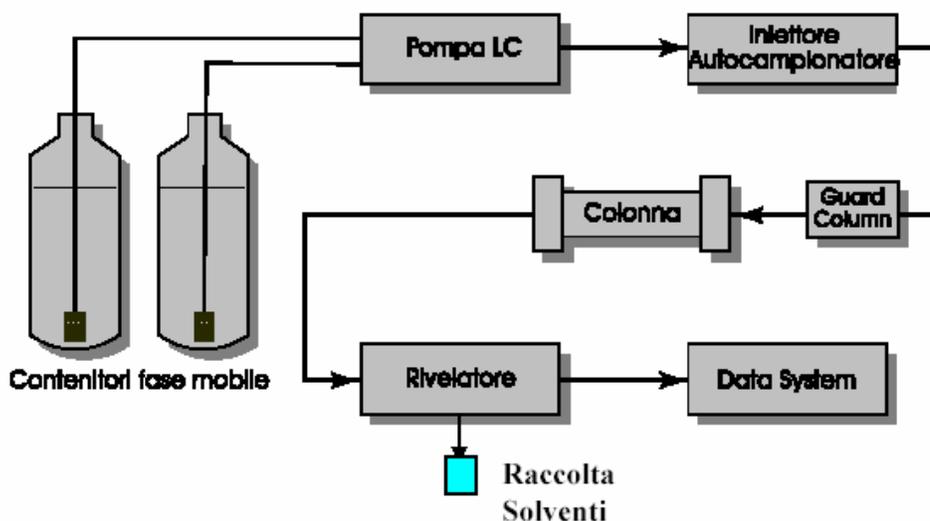


Fig. 2.1 Componenti di un sistema HPLC

La molecola immobilizzata prende il nome di “ligando” ed è ciò che conferisce ad una colonna di affinità la capacità di legare un particolare composto in un campione.

Insieme al ligando, un altro importante fattore nella cromatografia d'affinità è il materiale utilizzato per sostenere il ligando lungo la colonna, la "matrice".

Questo supporto deve essere caratterizzato da un basso legame non-specifico per i componenti del campione, deve essere facile da modificare per l'immobilizzazione del ligando e deve essere stabile alla velocità del flusso, alla pressione e alle condizioni del solvente che verranno impiegate nell'analisi o nella purificazione dei campioni.

La cromatografia liquida di affinità ad alte prestazioni (HPALC) è caratterizzata da un supporto che consiste in piccole particelle rigide (dell'ordine di qualche  $\mu\text{m}$ ), in grado di impaccarsi efficacemente e di sopportare alte pressioni e velocità di flusso. Esempi di questi supporti includono silice modificata o polimeri sintetici. Recentemente sono stati messi a punto anche supporti di tipo monolitico. Questi supporti consistono di un unico blocco polimerico poroso, e, rispetto ai supporti impaccati, presentano una minore resistenza al flusso della fase mobile. Questa proprietà consente di utilizzare velocità di flusso più elevate, che porta a tempi di analisi più brevi, mantenendo comunque ottime risoluzioni [85]. Esistono vari tipi di supporti monolitici per applicazioni in cromatografia di affinità, ad esempio basati su polimeri di glicidilmetacrilato, di agarosio, di silice o su criogel di poliacrilammide [86]. Recentemente le colonne monolitiche di silice si sono dimostrate particolarmente utili per lo sviluppo di bioreattori enzimatici [87, 88]. I supporti monolitici per applicazioni biocromatografiche sono ancora in fase di studio, e pertanto non sono reperibili in commercio.

La stabilità e l'efficienza di questi supporti, impaccati e monolitici, permette loro di essere utilizzati con l'equipaggiamento standard di un HPLC.

Quando le colonne di affinità sono utilizzate come strumenti per lo studio delle interazioni soluto-ligando, questo approccio viene riportato come cromatografia analitica di affinità, cromatografia quantitativa di affinità, o biocromatografia [89]. Dall'analisi del tempo d'eluizione o dal volume di analita dopo il suo passaggio attraverso la colonna, si ottengono informazioni sulle costanti d'equilibrio che descrivono il legame tra analita e ligando. Se sono presenti anche agenti addizionali nella fase mobile, possono essere ottenute

informazioni su come tali agenti influenzano le interazioni analita-ligando. Ulteriori informazioni sulle velocità di questi processi di legame possono essere ricavati esaminando la forma del profilo d'eluizione dell'analita [84].

## **2.2 STUDIO DELLE PROTEINE DEL SIERO MEDIANTE HPALC**

La maggior parte degli studi eseguiti con l'HPALC sono stati focalizzati sulla sieralbumina umana (HSA), la sieralbumina bovina (BSA) e l' $\alpha_1$ -glicoproteina acida (AGP). Per quanto riguarda le proteine del siero BSA e HSA sono state riscontrate buone correlazioni nei parametri qualitativi e quantitativi ottenuti in biocromatografia [2, 4, 90]. La proteina AGP, invece, in seguito ad immobilizzazione su colonna, ha mostrato per alcuni composti, un comportamento diverso da quello tenuto in soluzione [91, 92]; per questo motivo, al momento, le colonne di AGP vengono utilizzate solo come selettori chirali.

In generale, in cromatografia d'affinità, il materiale e il metodo usati per l'immobilizzazione della proteina nella colonna sono fattori molto importanti. Il supporto dovrebbe instaurare una minima quantità d'interazioni aspecifiche con le componenti dei campioni, presentare gruppi attivi per il legame della proteina ed essere stabile alle condizioni di analisi (flusso, pressione, solvente). Nella biocromatografia, inoltre, è importante che l'immobilizzazione non coinvolga direttamente siti specifici di legame della proteina, affinché le proprietà della proteina stessa non risultino alterate.

Le colonne di HSA e BSA per l'HPALC possono essere preparate legando covalentemente l'albumina alla silice diolo, attivata con 1,1-carbonildiimidazolo [2, 93], oppure legando direttamente la proteina alla silice epoxy [7], attraverso il legame dell'albumina alla silice con un metodo base di Schiff a due [90] o a tre passaggi [94], o utilizzando silice modificata attivata con N-idrossisuccinimide [95]. Alcuni lavori sono stati eseguiti immobilizzando la proteina su colonne di agarosio [96] o idrossimetilmetacrilato (HEMA) [97]. In alcuni casi sono state utilizzate colonne in cui la proteina è

stata adsorbita, anzichè legata covalentemente, su colonne a scambio ionico [98] o su silice di grado HPLC [99].

Le colonne di albumina presenti in commercio sotto il nome di Resolvosil, sono preparate attraverso il legame incrociato di albumina con agenti come glutarildialdeide o N-N'-disuccinimidil carbonato. La presenza di legami crociati rende la colonna più stabile, ma ne riduce l'affidabilità, nel caso in cui la colonna venga utilizzata per scopi biocromatografici anziché prettamente separativi [100].

Le colonne HPLC che contengono AGP immobilizzata, presenti in commercio sotto i nomi Enantiopac e Chiral AGP, sono preparate ossidando la componente zuccherina con periodato, in maniera da formare gruppi aldeidici in tali residui. Innalzando il pH, i gruppi aldeidici reagiscono con i gruppi amminici liberi di altre molecole di AGP. I risultanti legami imminici sono infine stabilizzati dalla riduzione con sodio cianoboroidruro per formare gruppi amminici secondari. Questo metodo fornisce un supporto HPLC ricoperto con AGP reticolato [100].

Un vantaggio nell'utilizzo di HPALC per gli studi proteina-soluto è l'abilità di tale metodo di riutilizzare lo stesso ligando per più esperimenti, quindi è sufficiente una piccola quantità di proteina. Ciò permette di ottenere una buona precisione minimizzando le variazioni tra corsa e corsa.

Altri vantaggi includono la facilità con cui i metodi HPALC possono essere automatizzati e i periodi di tempo relativamente corti che sono richiesti in HPALC per la maggior parte di studi di legame (spesso 5-15 min per analisi). Il lavaggio continuo della proteina immobilizzata con il solvente utilizzato come fase mobile, rappresenta un ulteriore vantaggio, dal momento che questo elimina gli effetti prodotti da qualsiasi contaminante organico (per esempio acidi grassi), che potrebbe essere presente nella preparazione iniziale della proteina [90].

Ogni volta che una proteina viene immobilizzata per studiare interazioni proteina-analita, è necessario verificare quanto il comportamento della proteina legata alla matrice sia simile a quello della proteina nel suo ambiente nativo. Questo aspetto deve essere valutato caso per caso, sulla base della proteina studiata e del metodo d'immobilizzazione utilizzato.

Nel caso dell'albumina, esiste un gran numero di prove che confermano la similitudine tra il comportamento osservato con le proteine immobilizzate e le stesse proteine in soluzione, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo. Per esempio è stato dimostrato in numerosi studi l'ottimo accordo tra le percentuali di legame ottenute con le colonne derivatizzate con HSA e i dati ottenuti attraverso dialisi all'equilibrio, oppure che i fenomeni di competizione e le interazioni allosteriche viste nelle colonne HSA sono simili a quelle osservate per HSA in soluzione [2, 3, 90].

Inoltre, le costanti d'equilibrio misurate con l'HPALC per le albumine immobilizzate mostrano generalmente un buon accordo con quelle ottenute con tecniche che lavorano in soluzione come la dialisi all'equilibrio o l'ultrafiltrazione, quando ottenute in condizioni di solvente e temperatura confrontabili. In particolare, è stato riscontrato un ottimo accordo nella dipendenza dalla temperatura di tali costanti, nei cambiamenti in entropia ed entalpia e nelle costanti cinetiche [5].

### ***2.2.1 Eluizione zonale***

L'approccio HPALC più utilizzato per lo studio delle interazioni di piccole molecole con le proteine del siero è la cosiddetta eluizione zonale. In pratica, è lo stesso metodo utilizzato nella maggior parte delle applicazioni analitiche della cromatografia, in cui una piccola quantità di soluto viene iniettata all'interno della colonna, mentre il tempo di eluizione o il volume del soluto vengono monitorate [5].

Il primo utilizzo dell'eluizione zonale per lo studio del legame soluto ligando fu eseguito nel 1974 da Dunn e Chaiken [101], che esaminarono la ritenzione della nucleasi dello stafilococco su di una colonna di affinità a bassa prestazione contenente timidina-5'-fosfato-3'-amminofenilfosfato immobilizzata. La prima applicazione che prevedeva l'utilizzo di un sistema farmaco proteina fu eseguita da Lagercrantz e collaboratori nel 1979 [102], che utilizzarono colonne Sepharose a bassa prestazione con BSA immobilizzata per misurarne l'interazione di acidi grassi, steroidi e diversi farmaci. A metà degli anni ottanta, l'eluizione zonale venne utilizzata come parte del sistema HPLC

per analizzare le proprietà delle proteine come fase stazionaria chirale [103, 104]. Dalla fine degli anni '80 l'approccio zonale in HPALC iniziò ad essere utilizzato nello studio delle interazioni farmaco-proteina [3, 105, 107.]

La fase mobile usata in questi studi è costituita di solito da un tampone a pH fisiologico con la presenza o meno di un modificatore organico[2-5]; inoltre vi può essere aggiunta una quota di additivi o competitori. La variazione del tempo di ritenzione dell'analita con la composizione della fase mobile permette di avere informazioni sull'interazione tra analiti e sull'affinità di legame.

I fattori che possono essere variati in questo tipo di lavoro sono:

(1) pH, forza ionica e polarità fase mobile; (2) temperatura; (3) il tipo di soluto o ligando nella colonna; (4) la presenza di spiazzatori nella fase mobile [5].

Un importante vantaggio dell'eluizione zonale è che richiede solo piccole quantità di analita per ogni iniezione (generalmente dell'ordine di  $10^{-9}$ - $10^{-10}$  moli); inoltre è possibile analizzare contemporaneamente miscele di composti, purchè si ottenga una buona risoluzione tra i picchi corrispondenti. Questo è un vantaggio importante nel caso in cui si vogliano studiare molecole chirali di cui non è possibile isolare i singoli enantiomeri a causa della loro elevata velocità di racemizzazione. Ovviamente sarà necessario che la proteina abbia un comportamento enantioselettivo nei confronti dei due enantiomeri della molecola e che la colonna riesca a risolvere il racemo. Un altro vantaggio è la sua facile esecuzione con la strumentazione HPLC. Se correttamente utilizzato, questo metodo permette di monitorare, in maniera riproducibile, variazioni nel tempo di ritenzione di pochi secondi. Tra le varie applicazioni dell'eluizione zonale, si trovano la misura del grado di affinità del legame soluto-proteina, studi sulla variazione dell'interazione in funzione della composizione della fase mobile o della temperatura e l'analisi delle interazioni che si stabiliscono tra farmaci leganti lo stesso sito, o a siti allosterici della proteina [5].

Tutte queste applicazioni si basano sul fatto che la ritenzione osservata per ogni soluto è una misura diretta delle interazioni che si stabiliscono all'interno della colonna. Il fattore di capacità dell'analita ( $k$ ) è correlato al numero di siti di

legame attivi presenti nella colonna e alle costanti d'equilibrio per l'analita in questi siti:

$$k = (K_{A1}n_1 + \dots + K_{An}n_n)m_L/V_M \quad (\text{eq. 2.1})$$

In quest'equazione  $k$  è il fattore di capacità ( $k = (t_R - t_M)/t_M$  oppure  $k = (V_R - V_M)/V_M$ ),  $K_A$  è la costante di associazione per ogni sito,  $n$  è la frazione di ogni sito presente nella colonna,  $m_L$  le moli totali di siti di legame presenti in colonna,  $V_M$  il volume morto. Da quest'equazione si comprende come un cambiamento nella forza del legame, il numero di siti attivi, o la distribuzione di questi siti può risultare in una variazione della ritenzione dell'analita [5].

### 2.2.1.1 Valutazione della percentuale di legame

Una delle applicazioni dell'eluizione zonale in HPALC è la misura della percentuale con cui un farmaco si lega alla proteina immobilizzata. Ciò si basato sul fatto che il fattore di capacità, se misurato all'equilibrio, è uguale al rapporto tra la frazione di farmaco legato al ligando ( $b$ ) e quella di farmaco libero nella fase mobile ( $f$ ):

$$k = b/f \quad (\text{eq. 2.2})$$

Considerando che  $b + f = 1$ , è possibile calcolare la frazione di farmaco legato direttamente dal fattore di capacità [4]:

$$b = k/(1+k) \quad (\text{eq. 2.3})$$

Tenendo conto che questi studi vengono eseguiti generalmente con una piccola quantità di farmaco, in condizioni di eccesso di proteina, la percentuale di legame misurata del farmaco risulta indipendente sia dalle concentrazioni di

proteina che di farmaco; viceversa, utilizzando maggiori quantità di farmaco, la percentuale di legame dipenderà sia dalla sua concentrazione che da quella della proteina, per cui sarà necessario misurare queste due grandezze. Nella pratica, la percentuale di legame misurata risulta indipendente dalle concentrazioni se la quantità di farmaco iniettato è 500-1000 volte inferiore alla quantità di proteina immobilizzata nella colonna [5].

### **2.2.1.2 Studi di competizione**

L'uso più comune dell'HPALC, nello studio dei sistemi soluto-proteina, è l'osservazione degli effetti dovuti all'interazione tra farmaci ed altri soluti nel legame alla proteina.

Gli studi di spiazzamento vengono eseguiti iniettando uno o più composti come analiti ed aggiungendo una concentrazione nota di agente competitore alla fase mobile. In tal modo i farmaci si trovano a legare la proteina contemporaneamente e, in base al sito coinvolto, possono stabilire o meno interazioni.

I possibili casi di interazione tra molecole nel legame alla proteina sono:

1. Legame indipendente: le molecole si legano a siti diversi, indipendentemente tra loro.
2. legame cooperativo: il legame fra una molecola e la proteina induce una variazione conformazionale che aumenta l'affinità di legame di un'altra molecola
3. legame anti-cooperativo: il legame di una molecola fa diminuire la capacità dell'altro composto di legarsi alla proteina, perché induce nella proteina una modificazione che è sfavorevole al legame del secondo composto con la proteina.
4. competizione diretta: le due molecole competono per lo stesso sito di legame.

In determinate condizioni d'analisi, ogni composto è caratterizzato da uno specifico valore di  $k$  proporzionale alla percentuale di legame con la proteina.

Quando alla fase mobile viene aggiunto un competitore, si verificano variazioni nei parametri di legame, che si manifestano in una variazione del valore di  $k$ ; analizzando queste variazioni è possibile stabilire il tipo di competizione che si stabilisce tra i due farmaci [5, 107].

La relazione esistente tra il  $k$  del soluto e la concentrazione del competitore nella fase mobile, può essere espressa dalla seguente equazione:

$$1/(k-X-Y) = (V_M K_C [C])/(K_A m_L) + V_M/(K_A m_L) \quad (\text{eq. 2.4})$$

Dove  $V_M$  è il volume morto della colonna;  $K_C$  e  $K_A$  sono rispettivamente, le costanti d'affinità del competitore e dell'analita per il sito di legame del soluto;  $m_L$  rappresenta le moli di siti di legame presenti in colonna;  $[C]$  è la concentrazione del competitore;  $X$  è il valore delle interazioni residue con i siti specifici della proteina;  $Y$  rappresenta la quota di  $k$  dovuta le interazioni con i siti aspecifici [107].

Il parametro  $X$  è una costante che rappresenta la porzione di  $k$  risultante dal legame del soluto ai siti al quale lo spiazzatore non si lega. Se il soluto e il competitore si legano allo stesso sito della proteina (competizione diretta), allora  $X=0$ ; nella caso di una competizione indiretta, invece, il sito di legame non è lo stesso e il soluto presenta delle interazioni residue; di conseguenza il valore di  $X$  sarà diverso da zero.

Il termine  $Y$  è un parametro caratteristico per ogni composto e rappresenta il  $k$  residuo, dovuto alle interazioni che il soluto stabilisce con i siti aspecifici sulla fase stazionaria. Se, abbiamo un eccesso di competitore, l'analita dovrebbe essere interamente spiazzato e il valore di  $k$  dovrebbe tendere a zero. In realtà, non si ha mai un completo spiazzamento e il fattore di capacità raggiunge un valore  $Y$ , al di sotto del quale non scende.

La dimostrazione del fatto che il fenomeno è dovuto ad interazioni aspecifiche tra soluto e proteina, proviene da studi di autocompetizione e da

prove di legame effettuate con la proteina denaturata; in entrambi i casi si è riscontrato una ritenzione residua, da cui è stato ricavato il valore di  $Y$  per quel composto [107]. La determinazione del tipo di competizione esistente tra due o più composti, avviene osservando l'andamento del grafico avente alle ordinate  $k-Y$  e alle ascisse  $[C]$ .

Se entrambi l'analita e il competitore legano ad un solo sito, il valore di  $X$  sarà nullo, non ci saranno interazioni residue al sito di legame specifico. Esisterà una correlazione lineare tra  $1/(k-Y)$  e la  $[C]$ . Dal rapporto fra coefficiente angolare,  $(V_M K_C)/(K_A m_L)$ , e intercetta pari a  $V_M/(K_A m_L)$  si ottiene il valore di  $K_C$  [82]. Conoscendo il valore di  $V_M/m_L$ , che può essere ottenuto mediante un esperimento di eluizione frontale, si ottiene quindi anche il valore di  $K_A$ .

Anche se la competizione non fosse di tipo diretto (per lo stesso sito), dal rapporto fra pendenza ed intercetta di un grafico  $1/(k-Y)$ , si ottiene comunque un valore di  $K_C$ . Questo può essere confrontato con un valore della costante di associazione del competitore presente in letteratura: se i due valori sono confrontabili, siamo di fronte ad una competizione diretta, mentre se il valore di  $K_C$  trovato è inferiore a quello in letteratura di diversi ordini di grandezza, allora la competizione sarà di tipo allosterico.

Questo modello suppone che analita e competitore abbiano un unico sito di legame sulla proteina. Questa assunzione è generalmente soddisfatta per il competitore che viene selezionato in base alla sua specificità per un particolare sito di legame, mentre l'analita può avere più di un sito di legame ad alta affinità. In questo caso il modello descritto può essere utilizzato solo come prima approssimazione e sarà necessario considerare modelli matematici più complessi.

### ***2.3 Analisi Frontale***

L'analisi frontale è un altro metodo usato in HPALC per l'analisi del legame soluto-proteina. Essa differisce dall'eluizione zonale per il continuo passaggio dell'analita attraverso la colonna.

I primi ad applicarla furono Kasai e Ishii nel 1975; essi impiegarono questo metodo con una colonna di affinità a bassa efficienza, per l'analisi del legame

soluto-ligando[108]. Nel 1978 colonne a bassa affinità vennero utilizzate da Nakano e collaboratori per lo studio del legame del salicilato con BSA immobilizzata [109], e nel 1979 Lagercrantz e collaboratori impiegarono un metodo simile per esaminare il legame del salicilato con HSA [102]. Infine, Loun e Hage riportarono l'utilizzo dell'analisi frontale e dell'HPALC come metodo per caratterizzare il legame di HSA immobilizzata con numerosi soluti [5].

### **2.2.3.1 Principi generali del metodo**

Nell'analisi frontale, il soluto viene posto all'interno della fase mobile e viene fatto passare in continuo nella colonna che contiene il ligando immobilizzato. Quando il soluto si lega al ligando, la colonna diventa satura e la quantità di soluto che eluisce dalla colonna cresce gradualmente, formando un caratteristico cromatogramma sigmoidale. Se sono presenti nel sistema veloci cinetiche di associazione e dissociazione, il punto di flesso può essere correlato alla concentrazione dell'analita, alla quantità di ligando nella colonna, e alle costanti di equilibrio del complesso analita-ligando, perciò la sua misura permette la stima del numero di siti di legame presenti in colonna e della sua affinità di legame con l'analita[8].

Variando la temperatura, il tipo di ligando immobilizzato, ed il solvente che passa attraverso la colonna, questo stesso tipo di studio può essere utilizzato per la caratterizzazione della natura e del tipo d'interazioni che avvengono tra analita e ligando nella colonna.

Come l'eluizione zonale, l'analisi frontale può essere facilmente eseguita utilizzando la strumentazione HPLC standard, con in aggiunta il controllo della temperatura della colonna e le usuali manipolazioni della fase mobile e dei dati per misurare il tempo di eluizione delle curve. Nonostante l'analisi frontale richieda l'utilizzo di maggiori quantità di analita rispetto all'eluizione zonale, essa permette però di ottenere un maggior numero di informazioni. Il suo principale vantaggio, come vedremo nella sezione seguente, è la capacità di misurare contemporaneamente sia le costanti di equilibrio che il numero di siti di legame lungo la colonna. Ciò rende questo un valido approccio nella

caratterizzazione delle proprietà della colonna e per ottenere precise misurazioni dell'affinità e dell'attività di legame.

Per quanto riguarda le applicazioni, l'analisi frontale viene usata, come l'eluizione zonale, per ottenere informazioni sui sistemi soluto-proteina, per determinare l'affinità di un soluto, il tipo di legame che si forma in una colonna, l'effetto del solvente o della temperatura su questi legami e gli effetti dell'uso di un competitore.

### **2.2.3.1 Misura dell'affinità e del numero dei siti di legame**

Assumendo che il soluto si leghi ad un singolo sito sulla proteina, la seguente equazione mette in relazione il punto di flesso della curva con i valori di  $K_A$  e  $m_L$ , ovvero tra la costante di associazione e le moli di ligando presenti all'interno della colonna [90, 110]:

$$1/m_{Lapp} = 1/(K_A m_L [A]) + 1/m_L \quad (\text{eq. 2.5})$$

dove  $m_{Lapp} = V_{\text{eluizione}} \times [A]$  e rappresenta le moli di analita necessarie per saturare i siti disponibili nella colonna, mentre  $[A]$  è la concentrazione dell'analita.

La determinazione dei valori dei singoli parametri può essere effettuata costruendo un grafico dell'inverso di  $m_{Lapp}$  in funzione dell'inverso della concentrazione di analita. Tale grafico rappresenta una retta avente pendenza di  $1/(K_A m_L)$  e una intercetta pari a  $1/m_L$ .

Quindi è possibile ottenere moli di proteina immobilizzata calcolando semplicemente l'inverso dell'intercetta, mentre la costante di affinità è pari al rapporto tra intercetta e pendenza.

## **CAPITOLO 3**

# **DICROISMO CIRCOLARE NELLO STUDIO DEL LEGAME FARMACO-PROTEINA**



# DICROISMO CIRCOLARE NELLO STUDIO DEL LEGAME FARMACO-PROTEINA

## 3.1 PRINCIPI DELLA SPETTROSCOPIA CD

Il dicroismo circolare (CD) è una tecnica spettroscopica per lo studio di molecole otticamente attive. Questa tecnica utilizza luce circolarmente polarizzata, destra e sinistra. La combinazione di queste due componenti risulta linearmente polarizzata e oscilla in un piano perpendicolare alla direzione di propagazione.

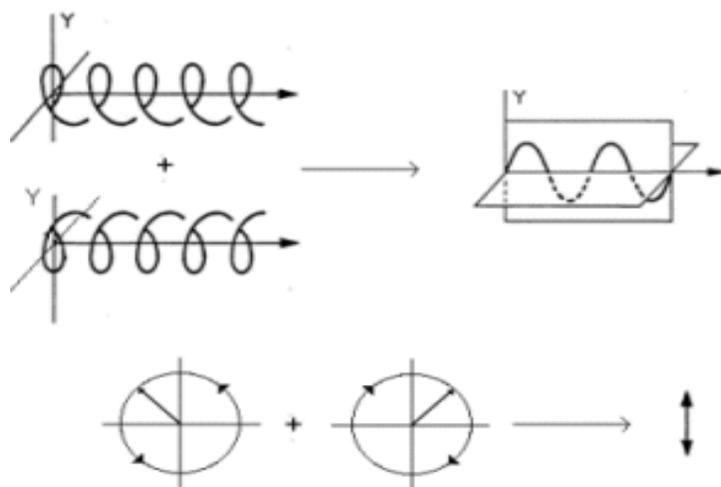


Fig 3.1 - Componenti di luce polarizzata circolarmente, destra e sinistra, si sommano per produrre luce linearmente polarizzata (in alto, visualizzata nel piano della pagina, in basso perpendicolare al piano).

L'osservatore situato sull'asse x (Fig. 3.1) vedrebbe il vettore elettrico rimanere costante in intensità, ma ruotare tracciando circonferenze in direzioni opposte. La somma dei due vettori relativi a queste due componenti varia nel tempo come il vettore E della luce polarizzata linearmente, perciò quest'ultima può essere ottenuta dalla somma di due onde polarizzate circolarmente in direzioni opposte, di uguale intensità e in fase tra loro.

## 3.2 SPETTRO DI DICROISMO CIRCOLARE E SPETTRO DI DISPERSIONE OTTICA ROTATORIA

Quando un raggio di luce piano polarizzata ottenuta dalla combinazione di due onde circolarmente polarizzate, incontra un campione otticamente attivo, le due componenti, destra e sinistra, interagiscono in modo diverso col mezzo chirale.

Ciò può manifestarsi in due modi:

- le due onde si propagano con velocità diversa, cioè sono caratterizzate da indici di rifrazione differenti.
- l'assorbimento da parte del campione della luce circolarmente polarizzata destra è diverso da quello della luce circolarmente polarizzata sinistra.

La principale conseguenza della diversa velocità di propagazione della luce in un mezzo chirale è che le due componenti escono dal campione fuori fase. Sommando vettorialmente i vettori elettrici delle due onde si ottiene ancora luce polarizzata linearmente, ma la direzione di polarizzazione risulta ruotata di un angolo  $\alpha$  rispetto a quella della luce incidente.

La differenza tra i due indici di rifrazione,  $n_L - n_R$  è chiamata **birifrangenza circolare**, mentre l'angolo  $\alpha$  di cui viene ruotata la luce polarizzata è chiamato **rotazione ottica**.

Per un campione chirale che abbia spessore  $\ell$  (in cm) e per una radiazione monocromatica di lunghezza d'onda  $\lambda$ , queste due grandezze sono legate dall'equazione (3.1)

$$\alpha = \frac{180 \cdot \ell \cdot (n_L - n_R)}{\lambda} \quad \text{Eq. 3.1}$$

La birifrangenza circolare è un numero molto piccolo (ca.  $10^{-9}$ ) e perciò difficile da misurare, ma tramite la (3.1), può essere ricavata la rotazione ottica  $\alpha$  la quale invece può essere determinata con un polarimetro. Per poter paragonare risultati di campioni a diversa concentrazione è opportuno utilizzare grandezze che siano caratteristiche unicamente della sostanza e che non dipendano da altri parametri; si è così definita la rotazione molare,  $[\alpha]$

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 100}{c \cdot \ell} \quad \text{Eq. 3.2}$$

dove C è la concentrazione del campione in moli/litro e  $\ell$  lo spessore del campione in cm.

Invece, la principale conseguenza del fatto che le onde polarizzate circolarmente in modo opposto vengano assorbite diversamente dal mezzo chirale, è che i due vettori elettrici usciranno dal mezzo otticamente attivo con diversa intensità, quindi il modulo dei due vettori elettrici dei raggi polarizzati circolarmente a destra e a sinistra diminuirà, avremo così due diversi coefficienti di estinzione molare  $\epsilon_L$  e  $\epsilon_R$ . La misura della differenza tra i due  $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ , riportata in funzione della lunghezza d'onda  $\lambda$ , mi da uno **spettro di dicroismo circolare o spettro CD**.

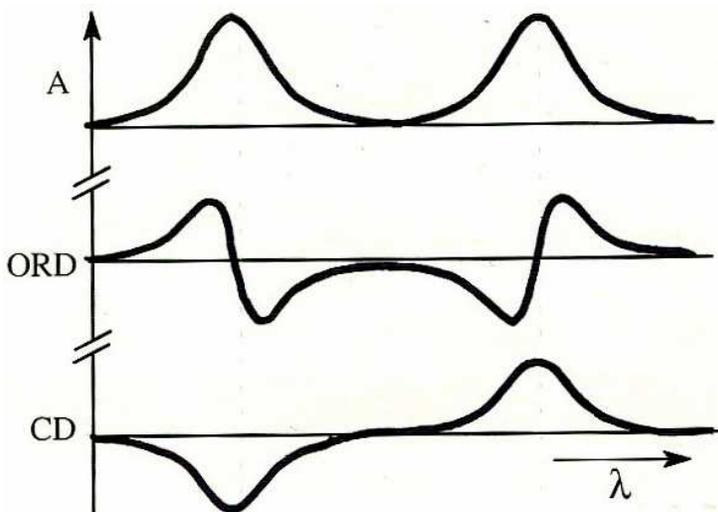


Figura 3.2 – Bande di assorbimento di molecole chirali caratterizzate da effetto Cotton opposto.

Tramite uno spettropolarimetro è possibile determinare la rotazione ottica di un mezzo in funzione della lunghezza d'onda. Il grafico risultante viene detto **spettro di dispersione ottica rotatoria o di ORD** (Optical Rotatory Dispersion), dove il termine dispersione è usato per denotare la dipendenza dalla

lunghezza d'onda (o dalla frequenza) di una grandezza fisica che, in questo caso, è la rotazione molare.

Le bande di assorbimento elettronico di una molecola chirale possono presentare valori di  $\epsilon_L - \epsilon_R$  positivi o negativi; ciò dipende da quale delle due radiazioni polarizzate circolarmente è assorbita in modo maggiore. Il segno e l'intensità delle bande di assorbimento dipendono dalla struttura molecolare della sostanza in esame; mentre al di fuori di queste regioni il segnale risulta nullo. Le bande con valori di dicroismo negativi mostrano spettri di dispersione rotatoria positivi a lunghezze d'onda inferiori al massimo d'assorbimento e negativi per valori maggiori di  $\lambda_{MAX}$ ; le bande con CD positivi mostrano invece l'andamento opposto. L'insieme dei due fenomeni è chiamato effetto Cotton, che è rispettivamente negativo o positivo nei due casi considerati.

Due enantiomeri mostrano effetto Cotton opposto.

Lo spettro ORD e CD danno informazioni equivalenti, tuttavia lo spettro CD è la tecnica d'elezione nella determinazione della chiralità delle molecole. Lo strumento per la misura del dicroismo circolare presenta infatti una selettività più alta rispetto al polarimetro, perché il segnale CD può essere misurato solo in corrispondenza di una banda di assorbimento, così l'interpretazione dei dati di uno spettro CD risulta più semplice di quella di uno spettro ORD, dove è più difficile estrapolare il contributo di ogni singolo effetto Cotton. Quindi in genere si valutano solamente i dati ottenuti tramite uno spettro CD, in modo da semplificare e accorciare le analisi [111].

### **3.3 DICROISMO CIRCOLARE ED ELLITTICITA'**

Con la tecnica del dicroismo circolare si misura la differenza di assorbimento tra la luce polarizzata circolarmente destra e quella polarizzata circolarmente sinistra. A seguito di questo assorbimento, diverso in intensità per i due versi di polarizzazione, il vettore elettrico non oscilla più su un solo piano, ma inizia a descrivere un'ellisse; il semiasse maggiore e minore dell'ellisse formano un triangolo e l'angolo  $\theta$ , opposto al semiasse minore, è detto ellitticità. Questo angolo è proporzionale al dicroismo circolare.

L'asse maggiore dell'ellisse è ruotato rispetto alla posizione iniziale di un angolo  $\alpha$  che corrisponde alla rotazione ottica [112].

Quindi:

$$\theta = \tan^{-1} (b/a) \quad \text{Eq. 3.3}$$

dove b e a sono rispettivamente l'asse minore e l'asse maggiore dell'ellisse.

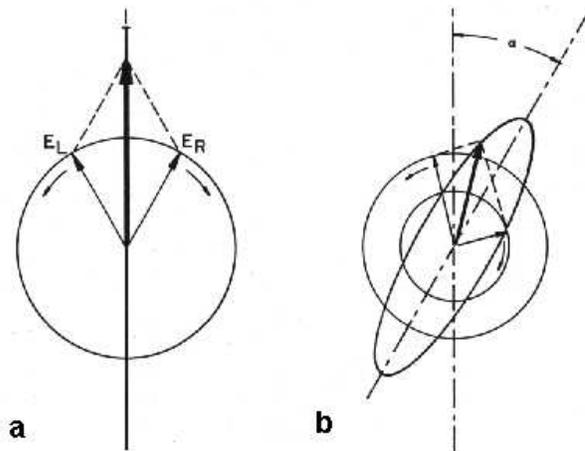


Figura 3.2 - (a) Altra visualizzazione della luce linearmente polarizzata composta da componenti circolarmente polarizzate di uguale intensità e fase. (b): Un differente assorbimento delle due componenti circolarmente polarizzate destra e sinistra da parte di una sostanza chirale riduce l'intensità di una componente rispetto all'altra; quando ricombinate danno luogo a luce ellitticamente polarizzata.

La relazione tra dicroismo circolare ( $A_L - A_R$ ), dove  $A_L$  e  $A_R$  sono le assorbanze rispettivamente delle due onde sinistrorsa e destrorsa) ed ellitticità è data dalla equazione (3.4):

$$\theta = \frac{2,303 \cdot (A_L - A_R) \cdot 180}{4\pi} \quad \text{Eq 3.4}$$

Anche l'ellitticità è un numero piccolo e difficile da misurare; per questo viene ricavata tramite l'equazione precedente dal valore del dicroismo circolare, che invece può essere misurato facilmente. Come parametro indipendente dalle condizioni di misura, viene definita **l'ellitticità molare**  $[\theta]$  in modo analogo alla rotazione molare.

$$[\theta] = \frac{\theta \cdot 100}{c \cdot \ell} \quad \text{Eq. 3.5}$$

L'assorbimento delle componenti circolari della luce polarizzata, segue la legge di Lambert-Beer ( $A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot \ell$ ), ma in realtà nel dicroismo circolare ho due tipi di assorbimento, uno per la luce polarizzata circolarmente sinistra e uno per quella destra, per cui:

$$A_L = \log_{10}(I_o/I_L) \quad \text{e} \quad A_R = \log_{10}(I_o/I_R).$$

$$A_{L(\lambda)} - A_{R(\lambda)} = \Delta A(\lambda) = [\varepsilon_{L(\lambda)} - \varepsilon_{R(\lambda)}] \cdot C \cdot \ell = \Delta \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot \ell \quad \text{Eq. 3.6}$$

Combinando le equazioni (3.4), (3.5), (3.6), ottengo una semplice relazione numerica tra  $\Delta A$  ed l'ellitticità:

$$[\theta] = 3298 \Delta \varepsilon \quad \text{Eq. 3.7}$$

Sia  $\Delta \varepsilon$  che  $[\theta]$  vengono usati normalmente, anche se, per ragioni storiche, gli strumenti commerciali riportano le misure in ellitticità. Molti preferiscono esprimere uno spettro CD in ellitticità molare; d'altra parte,  $\Delta \varepsilon$  sottolinea la relazione che esiste tra uno spettro CD e un normale assorbimento, così altri preferiscono usare valori di  $\Delta \varepsilon$ . Entrambe le misure hanno lo stesso andamento, ma presentano valori diversi che differiscono di un fattore di circa  $3,3 \cdot 10^3$  [113].

### **3.4 APPLICAZIONI E VANTAGGI DEL DICROISMO CIRCOLARE**

Il dicroismo circolare viene utilizzato per ottenere informazioni nello studio di molecole otticamente attive o eventualmente di molecole simmetriche che hanno uno spettro CD dovuto all'ambiente chirale creato dai gruppi circostanti [113]. Il dicroismo circolare è la tecnica di scelta per questo tipo di indagine, poiché offre la possibilità di studiare la proteina in fase liquida, l'ambiente naturale in cui si trova la maggior parte delle proteine: inoltre non è

una tecnica distruttiva ed è estremamente sensibile, richiedendo basse concentrazioni di proteina (dell'ordine dei  $\mu\text{M}$ ).

Il CD viene quindi utilizzato per:

- studi di legame tra farmaci a proteine bersaglio con determinazione della costante d'affinità del farmaco legato e della sua conformazione.
- determinazione della configurazione assoluta di due enantiomeri interpretando i dati con il sistema di analisi empirico, semiempirico o non empirico.
- sistema di rivelazione HPLC per determinare l'eccesso enantiomerico, la configurazione assoluta dell'enantiomero prevalente, stabilità stereochimica di farmaci in vitro ed in vivo.
- determinazione della struttura secondaria di biomolecole e studio di transizioni conformazionali di rilevanza funzionale.
- determinazione della struttura secondaria di proteine e di acidi nucleici.

Usare questo tipo di tecnica da indiscutibilmente dei vantaggi:

- gli esperimenti sono semplici e veloci da realizzare
- il CD è unicamente sensibile alla chiralità del sistema e in genere è proprio questa chiralità a guidare l'interazione di una molecola con il suo recettore, tali studi sono di notevole importanza, dato il crescente interesse ad avere sul mercato sostanze enantiomericamente pure.
- gli esperimenti CD sono condotti in fase liquida; ciò è rilevante per i sistemi biologici, perché la conformazione più stabile allo stato solido non è necessariamente quella il più stabile in soluzione. Il dicroismo circolare permette inoltre di studiare la dinamica del sistema, in funzione delle condizioni sperimentali adottate.
- gli esperimenti CD richiedono basse concentrazioni rispetto agli esperimenti NMR; ciò significa che il CD non solo richiede una minore quantità di campione, ma può essere usato per studiare quei sistemi dove la concentrazione richiesta per l'NMR può completamente cambiare il sistema
- uno spettro CD può essere registrato in pochi minuti, per fare misure a un'unica lunghezza d'onda, si impiegano pochi millisecondi

- sia l’NMR che la cristallografia danno informazioni dettagliate sulla struttura solo per piccole proteine (PM<20.000 Da) e acidi nucleici (~24 kbasi) mentre il CD può essere usato per qualsiasi dimensione della molecola.

### 3.5 STUDIO DEL LEGAME FARMACO PROTEINA

Il dicroismo circolare è una tecnica adatta per studiare l’interazione che avviene tra una proteina e uno specifico farmaco, in quanto rivela esclusivamente la frazione di farmaco che si è legata alla proteina in esame. Se il farmaco è chirale, sarà necessario sottrarre il proprio contributo da quello del complesso, mentre se non è chirale l’analisi dello spettro viene semplificata, infatti il segnale CD di una molecola achirale in soluzione è pari a zero.

Svariati studi, hanno rivelato che generalmente solo i siti primari delle proteine sono stereoselettivi [114-116]. Il segnale CD del complesso formato tra l’albumina e il farmaco achirale, ottenuto sottraendo dal segnale totale lo spettro dell’albumina (il bianco), è proporzionale quindi alla concentrazione del farmaco che si è legata al sito di legame primario della proteina.

L’interazione tra un ligando (L) e questo sito primario della proteina (P), può essere descritto da una costante di affinità che rappresenta questa associazione in una situazione di equilibrio:



L’equazione 3.8 implica un rapporto stechiometrico di 1/1 in questo tipo di interazione, e conoscendo la concentrazione (p) iniziale di proteina, l’equazione può essere scritta in questo modo:

$$p = [P] + [LP] = [L] + [LP] \quad K = [LP]/(p-[LP])^2 \quad \text{Eq. 3.9}$$

Se il ligando è una molecola achirale, quindi non ha un proprio segnale CD, e il complesso che si è formato con la proteina mostra una banda dicroica a

bassa energia, dove la proteina non assorbe, possiamo misurare la concentrazione di tale complesso [LP] con la legge di Lambert-Beer:

$$CD = [LP] \cdot \ell \cdot \Delta\varepsilon \quad \text{Eq. 3.10}$$

dove CD è il dicroismo circolare ( $A_L - A_R$ ),  $\ell$  è la lunghezza della cuvetta di quarzo, e  $\Delta\varepsilon$  è il coefficiente molare dell'assorbimento dicroico [117].

Dalle equazioni 1.9 e 1.10, si può ottenere la seguente espressione:

$$\frac{p}{\sqrt{\frac{CD}{l}}} = \frac{1}{\Delta\varepsilon} \sqrt{\frac{CD}{l}} + \frac{1}{\sqrt{K\Delta\varepsilon}} \quad \text{Eq 3.11}$$

Questa equazione descrive una retta da cui posso ricavare i parametri fondamentali  $\Delta\varepsilon$  e  $K$ . Costruendo un grafico in cui la x è  $\sqrt{(CD/L)}$  e la y è  $p/\sqrt{(CD/L)}$ , e inserendo i dati sperimentali ottenuti ( $CD$ ,  $\ell$ ,  $p$ ) in tale grafico, ottengo una retta dalla cui pendenza posso ricavare il valore del  $\Delta\varepsilon$  del farmaco legato, e dall'intercetta il valore di  $K$ . Questo è l'unico metodo per ottenere una costante di affinità che dipenda esclusivamente dal sito di legame stereospecifico, cioè l'unico a cui si lega ad una conformazione enantiomerica preferenziale del ligando achirale, dando così un segnale dicroico. Inoltre si può determinare anche il parametro  $\Delta\varepsilon$  per il complesso farmaco-proteina. Tutto ciò è un risultato di notevole interesse, data la difficoltà di isolare in soluzione un complesso puro senza alterare l'equilibrio di dissociazione [118].

### ***3.5.1 Competizione di due ligandi per lo stesso sito sulla proteina***

Il legame di un marker (M) e di un competitore (C) allo stesso sito di una proteina (P), può essere studiato con la tecnica del dicroismo circolare. Se il legame è esclusivamente competitivo, le costanti di associazione e il loro rapporto possono essere descritte in questo modo:

$$K_m = [MP]/[M][P] \quad K_c = [CP]/[C][P] \quad \text{Eq. 3.12}$$

$$K_m/K_c = [MP][C]/ [CP][M] \quad \text{Eq. 3.13}$$

Le concentrazioni totali della proteina, del marker e del competitore sono:

$$p = [P]+[CP]+[MP] \quad m = [M]+[MP] \quad c = [C]+[CP]$$

Possiamo considerare che  $[P]=0$ , perché  $K_m$  e  $K_c$  sono generalmente dei valori grandi e, visto che le condizioni sperimentali prevedono di lavorare con precisi rapporti stechiometrici tra i ligandi e la proteina e non in presenza di un eccesso di proteina, si può ragionevolmente supporre che la concentrazione di proteina libera sia trascurabile. Così l'equazione 1.13 può essere scritta anche nel seguente modo:

$$K_m/K_c = [MP]([MP] + c + p)/(m - [MP])(p - [MP]) \quad \text{Eq. 3.14}$$

Questo rapporto viene ottenuto esclusivamente da dati sperimentali, sapendo che  $[MP]$  può essere determinato in questo modo:

$$[MP] = mCD/CD_{\max} \quad \text{Eq. 3.15}$$

dove  $CD$  è il valore del segnale ottenuto dallo spettro sperimentale, e  $CD_{\max}$  è il valore del segnale ottenuto in assenza di competitore. Si può quindi ottenere in questo modo il rapporto tra le costanti di affinità del marker e del competitore per lo stesso sito stereospecifico della proteina. Non ci sono delle restrizioni per quanto riguarda il rapporto tra le concentrazioni del marker e del competitore, quindi le equazioni 3.14 e 3.15 sono valide per l'intero range delle condizioni sperimentali.

Se la competizione non è di tipo diretto, questo modello deve subire alcune modifiche, poiché i meccanismi molecolari che causano una competizione indiretta non sono mai elementari e possono essere dovuti a un insieme di processi diversi, come interazioni allosteriche (legami cooperativi, anticooperativi), o parziale sovrapposizione di siti diversi.

La tecnica CD permette di studiare in modo selettivo il legame stereospecifico del marker, ipotizzando che il competitore spiazzì il marker esclusivamente da quella frazione di siti di legame chiamati P, mentre la restante parte dei siti stereospecifici, detti Z, non sono influenzati da questa competizione. Questo modello comune, sebbene rappresenti in modo approssimativo una situazione piuttosto complessa, permette di ottenere con estrema semplicità dei dati sperimentali che conducono a risultati interessanti.

Le equazioni precedenti possono essere modificate in questo modo:

$$m = [M] + [MP] + [MZ] = [MP]_{\max} + [MZ]_{\max} \quad \text{Eq. 3.16}$$

La concentrazione MZ è costante, perché non viene spiazzata dal competitore e provoca un segnale CD residuo ( $CD_{\text{res}}$ ) ad alte concentrazioni di competitore, mentre la concentrazione MP può essere ottenuta in questo modo:

$$[MZ]_{\max} = [MZ] = m \cdot CD_{\text{res}} / CD_{\max} \quad (3.17)$$

$$[MP] = m(CD - CD_{\text{res}}) / CD_{\max} \quad (3.18)$$

Il rapporto tra le costanti di affinità può essere scritto nel modo seguente:

$$\frac{Km}{Kc} = \frac{[MP]([MP] + c - p)}{(m - [MP] - [MZ])(p - [MP])} \quad \text{se} \quad \frac{c}{p} > 1 \quad (3.19)$$

$$\frac{Km}{Kc} = \frac{[MP]([MP] + c - p \frac{[MP]}{[MP] + [MZ]})}{(m - [MP] - [MZ])(p - [MP])} \quad \text{se} \quad \frac{c}{p} < 1 \quad (3.20)$$

Si deve ricordare che Km, nella competizione indiretta, si riferisce solo alla frazione dei siti di legame influenzata dalla competizione, e non a tutti i siti di legame stereospecifici, come nel caso della competizione diretta.

Sperimentalmente si impone un preciso rapporto stechiometrico m/p, in questo modo  $CD_{max}$  e  $CD_{res}$  possono essere considerati parametri costanti, e il segnale CD sarà funzione esclusivamente della concentrazione totale del competitore e di c/p. Si può inoltre calcolare la costante di affinità del marker per un preciso sito stereospecifico sulla proteina, utilizzando l'equazione 3.11, e quella del competitore, tramite l'equazione 3.14, se si tratta di competizione diretta o tramite la 3.19 o la 3.20 se si tratta di competizione indiretta [117].

## **CAPITOLO 4**

# **DETERMINAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI LEGAME ALLA SIEROALBUMINA UMANA DI UNA SERIE DI INIBITORI DELLA PROTEASI HIV**



# **DETERMINAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI LEGAME ALLA SIEROALBUMINA UMANA DI UNA SERIE DI INIBITORI DELLA PROTEASI HIV**

## **4.1 INTRODUZIONE**

Gli inibitori della proteasi HIV (IP) rappresentano la classe più potente tra i farmaci attualmente utilizzati nel trattamento dell'infezione da HIV e comprendono una serie di composti peptidomimetici capaci di legare, ed inibire, in maniera selettiva, la proteasi virale. Tali sostanze sono state approvate dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA) a partire dal 1995 e sono utilizzate nella HAART (Highly active anti-retroviral therapy) in associazione con antivirali che agiscono in altri step del ciclo di replicazione virale (in particolare con agli inibitori della trascrittasi inversa (ITI)) [119-121]

Il primo ad essere approvato è stato il Saquinavir (Fortovase®, Invirase®, fig. 4.1), seguito da Ritonavir (Norvir®, fig. 4.2) e Indinavir (Crixivan®) nel 1996, il Nelfinavir (Viracept®) nel 1997, l'Amprenavir (Agenerase®, fig. 4.3) nel 1999, l'associazione Lopinavir(fig. 4.4)/Ritonavir (Kaletra®) nel 2000, Atazanavir (Reyataz®, fig. 4.5) e Fosamprenavir (Lexiva®) nel 2003 [122].

Questi composti hanno avuto un grande impatto nella terapia farmacologica dell'HIV determinando un aumento della durata e della qualità della vita di pazienti sieropositivi e malati di AIDS [123].

L'inibizione della proteasi virale previene la divisione delle poliproteine gag-pol, da cui risultano particelle virali non infettive. La resistenza agli inibitori della proteasi insorge tramite mutazioni primarie e accessorie del genoma che codifica per la proteasi virale che causano, inoltre, resistenze crociate tra i farmaci di questa classe [124].

Gli inibitori della proteasi sono metabolizzati attraverso il citocromo P-450 e tutti i farmaci somministrati in aggiunta a essi devono essere valutati per possibili interazioni a livello metabolico.

Il vantaggio principale rispetto agli inibitori della trascrittasi inversa, utilizzati precedentemente nella terapia antivirale, è dato dalla loro azione ad un diverso stadio del ciclo di replicazione virale; perciò risultano attivi sia nelle infezioni acute, sia in quelle croniche. La loro attività, inibendo la biosintesi delle proteine strutturali e funzionali del virus, determina la formazione di virioni immaturi e non infettanti [125, 126].

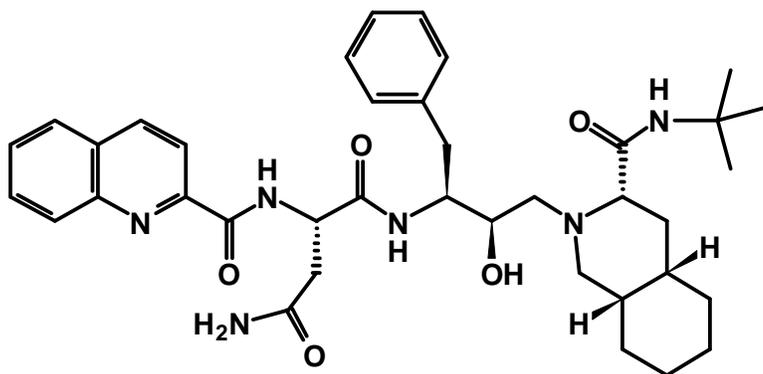


Fig. 4.1 Saquinavir.

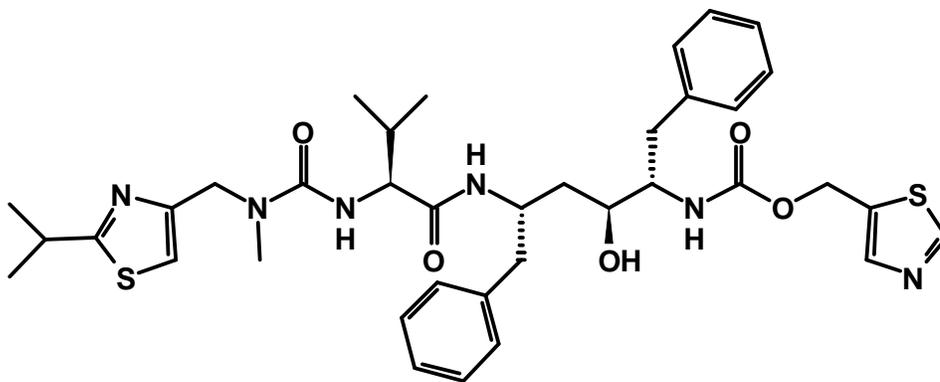


Fig. 4.2 Ritonavir

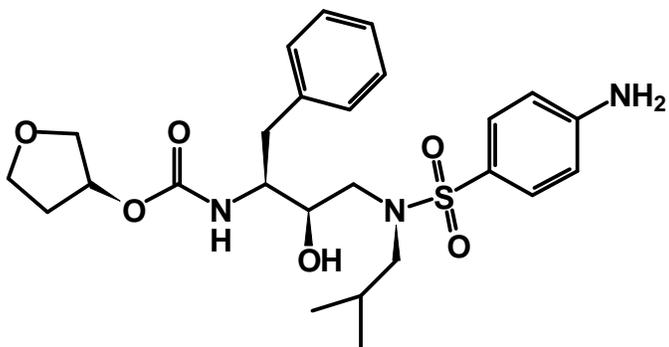


Fig. 4.3 Amprenavir

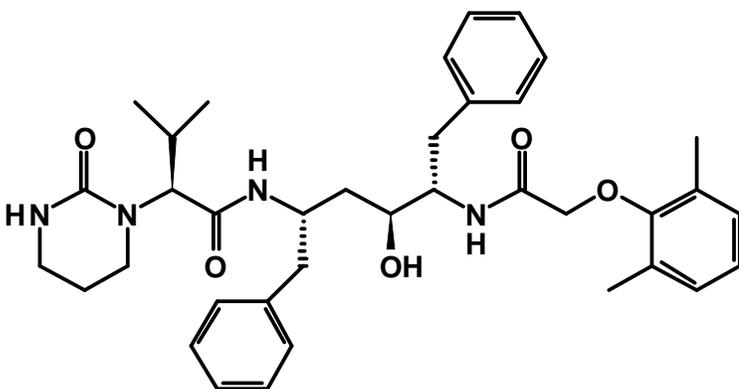


Fig. 4.4 Lopinavir

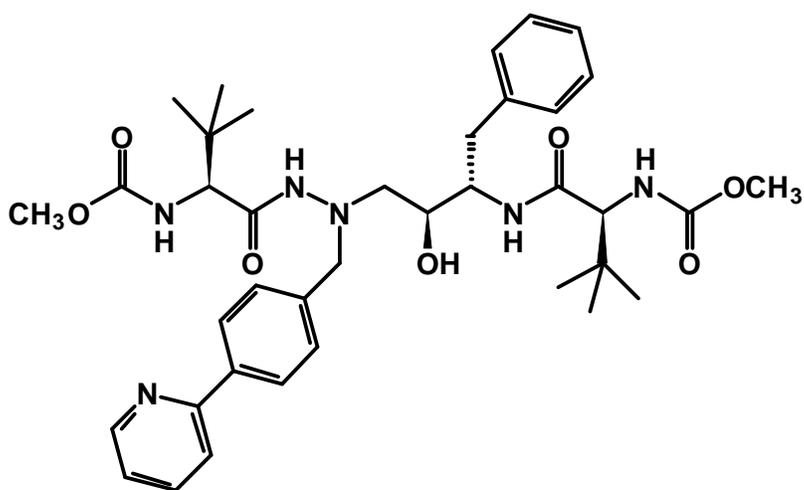


Fig. 4.5 Atazanavir

L'HIV-1 proteasi è una proteina codificata al 5' del gene pol ed è espressa come parte della poliproteina gag-pol. È una proteasi costituita da due subunità simmetriche di 99 amminoacidi ciascuna. Il sito attivo si trova all'interfaccia tra le due subunità e contiene due residui di aspartato (un residuo per subunità), fondamentali per l'attività dell'enzima, che sporgono nel canale del sito catalitico [127].

Il sito attivo della proteina è coperto da due strutture a  $\beta$ -hairpin (flaps) flessibili che governano l'accessibilità del sito durante ciclo catalitico [127].

L'HIV proteasi svolge un ruolo essenziale nel ciclo vitale dell'HIV. Come molti altri virus l'HIV sintetizza molte delle proprie proteine sotto forma di un solo lungo filamento nel quale le proteine sono legate in sequenza una dopo l'altra. L'HIV proteasi ha il compito di tagliare questa lunga poliproteina nelle varie proteine mature. Questo passaggio ha dei tempi critici. La poliproteina intatta è necessaria nei primi momenti del ciclo vitale del virus, quando aiuta la formazione del virus immaturo. Poi la poliproteina deve essere tagliata in frammenti della giusta lunghezza per costruire il virus maturo capace di infettare una nuova cellula.

Le reazioni di taglio devono avvenire perfettamente a tempo per permettere al virus di costruirsi nel modo corretto, prima che la poliproteina sia distrutta. A causa della sua funzione delicata ed essenziale, l'HIV proteasi è un eccellente bersaglio per una terapia farmacologica. Gli inibitori, agendo da falsi substrati, impediscono il legame della poliproteina alla proteasi bloccandone la maturazione, per cui il virus non è più in grado di trasformarsi nella sua forma matura infettiva.

Sebbene le cellule umane contengano numerose proteasi, queste riconoscono una sequenza di taglio diversa, per cui la loro attività non è sostituibile a quella delle proteasi virali e non è inibita dai farmaci anti-HIV [128].

I farmaci peptidomimetici inibitori della proteasi HIV sono stati disegnati sulla base del dipeptide Phe-Pro, situato nelle posizioni 167-168 della poliproteina gag-pol [123]; Dal punto di vista chimico-farmaceutico, questi farmaci sono peptidomimetici analoghi dello stato di transizione, in cui il

legame peptidico che mima quello che viene scisso nel substrato naturale, è sostituito da un isostero dello stato di transizione non idrolizzabile [124]. Questi composti contengono tre o più centri chirali, che devono essere preservati per l'esplicazione dell'attività [129].

#### ***4.1.1 Farmacocinetica***

Gli IP vengono generalmente somministrati per via orale, sotto forma di soluzione, capsule di gelatina rigida o molle; per questo la biodisponibilità è fortemente influenzata dall'assunzione di cibo e dall'effetto di primo passaggio nel fegato. Generalmente la somministrazione di questi composti dopo un pasto abbondante ne aumenta la biodisponibilità [130].

La distribuzione avviene attraverso il circolo sanguigno, dove gli antivirali sono fortemente legati alle proteine plasmatiche  $\alpha_1$ -glicoproteina acida e sieralbumina [129]; questa interazione influenza notevolmente la farmacocinetica in quanto riduce la quantità di farmaco libero nel sangue, pronto ad agire sui siti bersaglio.

Il metabolismo avviene nel fegato, ad opera dell'isoforma 34 del citocromo P450, mentre l'escrezione del farmaco inalterato e dei suoi metaboliti avviene attraverso l'urina e le feci. Gli antivirali sono sia substrati che inibitori del citocromo P450 e della glicoproteina P [131-134] entrambi coinvolti nella regolazione della biodisponibilità di numerosi xenobiotici. Ne consegue una possibile interferenza sulla farmacocinetica di altri farmaci, aumentandone l'emivita e determinando una prolungata esposizione dell'organismo ai loro effetti sia terapeutici che tossici [135].

Per far fronte alle difficoltà della scarsa biodisponibilità e della resistenza, che impongono la somministrazione di elevate dosi di farmaco giornaliera, si stanno sviluppando nuove formulazioni, che prevedono la combinazione di due o più farmaci inibitori della proteasi nella terapia anti-HIV [129].

## 4.2 SCOPO DEL LAVORO

Il presente lavoro è stato compiuto per chiarire le caratteristiche di legame di alcuni inibitori della proteasi HIV, alla sieralbumina umana (HSA), mediante l'utilizzo della biocromatografia.

A partire dal 1995, vari farmaci inibitori della proteasi HIV-1 sono divenuti di uso clinico. I dati disponibili in letteratura relativamente ai loro processi di distribuzione sono ancora frammentari e spesso in disaccordo [9, 136]; inoltre sembra che la presenza di HSA possa ridurre gli effetti farmacologici e questo fenomeno sarebbe particolarmente rilevante per i derivati con maggiore affinità per la proteina [10].

Una colonna impaccata con silice epoxy è stata derivatizzata con HSA. Successivamente la colonna è stata caratterizzata per verificare che la procedura di immobilizzazione non avesse modificato le caratteristiche di legame della proteina.

Dopo aver caratterizzato la colonna, è stata effettuata la determinazione della percentuale di legame all'HSA di cinque inibitori della proteasi HIV di uso clinico: i composti presi in esame sono stati Amprenavir, Atazanavir, Lopinavir, Ritonavir e Saquinavir.

Lo studio è stato infine indirizzato all'ottenimento di informazioni sui siti di legame dei farmaci antivirali all'HSA. Il problema è stato affrontato con la tecnica della cromatografia di spiazzamento. Il dicroismo circolare è stato infine impiegato per verificare potenziali interazioni degli antivirali con la bilirubina per il legame all'HSA.

## 4.3 MATERIALE UTILIZZATO

Per la derivatizzazione della colonna è stata usata HSA, Human Serum Albumin (PM=66500), senza acidi grassi (purezza  $\geq 96\%$ ), acquistata da Sigma Aldrich (Milano, Italia), ed utilizzata senza ulteriori purificazioni.

Per la determinazione della selettività ed efficienza della colonna sono stati usati:

- ◆ *rac*-N-benzoil-leucina
- ◆ *rac*-warfarin
- ◆ *rac*-oxazepam
- ◆ *rac*-ketoprofene

I campioni sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia); il *rac*-oxazepam è stato gentilmente fornito dal Prof. Lucacchini, Facoltà di Farmacia, Università di Pisa.

Per l'analisi frontale è stato usato L-triptofano.

Gli inibitori delle proteasi sono stati forniti dalla Prof.ssa Helena U. Danielson, University of Uppsala (Svezia):

- ◆ amprenavir
- ◆ atazanavir
- ◆ lopinavir
- ◆ ritonavir
- ◆ saquinavir

Per la preparazione dei tamponi sono stati utilizzati  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tutti acquistati da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia) e tutti di grado analitico.

Il solvente utilizzato come modificatore organico e per la preparazione delle soluzioni è 1-propanolo, acquistato da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

L'acqua usata per preparare i tamponi è stata bidistillata mediante sistema di Purificazione MILLI-RX20 (Millipore).

Per le prove di competizione ai principali siti di legame di HSA sono stati utilizzati i seguenti campioni, acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia):

- ◆ salicilato di sodio (marker del sito I)
- ◆ ibuprofene (marker del sito II)
- ◆ acido valproico (marker del sito della bilirubina)
- ◆ bilirubina

### **4.3.1 Strumentazione**

Il lavoro è stato eseguito mediante un sistema cromatografico costituito da una pompa Jasco (Tokio, Giappone) PU-980 Intelligent HPLC Pump, provvista di valvola di iniezione Rheodyne (modello 7161) con un loop da 20 $\mu\text{l}$ .

La rivelazione è stata ottenuta mediante uno spettrofotometro a fotodiodi Jasco MD-910 Multiwavelength Detector.

I risultati sono stati acquisiti mediante il programma Borwin-PDA (Jasco).

Per gli studi di dicroismo circolare è stato utilizzato uno spettropolarimetro JASCO J-810 (Tokio, Giappone) ed una cella di cammino ottico 1cm. Gli spettri sono stati acquisiti con Spectrum Measurement (Jasco) e analizzati col programma Spectra Analysis (Jasco).

## **4.4 DERIVATIZZAZIONE DI UNA COLONNA EPOXY KROMASIL CON HSA**

E' stata derivatizzata una colonna di dimensioni di 50 x 4.6 mm precedentemente impaccata con 1 g di silice epoxy kromasil, 200Å di diametro dei pori, 5µm di diametro delle particelle.

La soluzione di albumina è stata preparata alla concentrazione di 10 mg/mL (30 mL) in tampone fosfato di potassio 50 mM, contenente (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, pH 6.5.

L'immobilizzazione della proteina è stata ottenuta facendo passare una soluzione di albumina a ricircolo, per 24 ore, ad un flusso di 0.5 ml/min.

Sono stati fatti passare attraverso la colonna, in successione, 20 ml di tampone e 4 ml della soluzione di albumina a circuito aperto, poi il circuito è stato chiuso.

Durante la prima ora il senso circolatorio della soluzione attraverso la colonna è stato invertito ogni 15 min. Nelle 3 ore successive il senso è stato invertito ogni 30 min, quindi la soluzione di HSA è stata lasciata circolare per 24 ore, mantenendo la direzione di flusso equivalente alla direzione di utilizzo. A fine operazione, la colonna è stata lavata con 100 ml di tampone fosfato 50 mM pH 7, con un flusso di 1 ml/min. I gruppi epossidici che non hanno reagito con la proteina, sono stati disattivati facendo passare a ricircolo 50 ml di una soluzione glicina 1 M in tampone fosfato 67mM pH 7.4.

## **4.5 ANALISI FRONTALE**

L'analisi frontale è stata effettuata per misurare la quantità di HSA immobilizzata correttamente.

L'analisi è stata eseguita utilizzando una serie di soluzioni di L-triptofano a concentrazione nota, secondo il metodo descritto da D.Hage [8].

### **4.5.1 Soluzioni**

Lo studio è stato condotto utilizzando soluzioni di L-triptofano aventi concentrazioni pari 12.5-25-50-100  $\mu\text{M}$ .

Si è preparata una soluzione madre 100  $\mu\text{M}$  in tampone fosfato 67 mM pH 7.4, (PB) sciogliendo 2.04 mg di L-triptofano (PM=204.23) in 100 ml totali. Le altre soluzioni sono state preparate mediante diluizioni successive della madre.

### **4.5.2 Condizioni cromatografiche**

L'analisi è stata condotta utilizzando la colonna epoxy kromasil 50 x 0.4 mm, 200 Å, 5  $\mu\text{m}$  derivatizzata con HSA, precedentemente descritta.

La fase mobile utilizzata era tampone fosfato 67 mM pH 7.4 (PB).

Il flusso è stato impostato a 0.25 ml/min e le letture sono state effettuate alla lunghezza d'onda  $\lambda = 280$  nm, corrispondente al massimo d'assorbimento del triptofano.

Tutte le analisi sono state condotte alla temperatura ambiente, pari a circa 28 °C.

### **4.5.3 Procedimento**

Le soluzioni di L-triptofano sono state fatte scorrere attraverso la colonna ed il tempo di ritenzione è stato monitorato a partire dal pescante.

Poi è stato determinato il valore di  $t_0$ , cioè il tempo che l'analita ha impiegato ad attraversare il sistema escludendo la colonna. Per fare ciò la colonna è stata sostituita da una junction a volume zero e sono state ripetute le corse delle soluzioni 100 e 12.5  $\mu\text{M}$ .

Prima dell'analisi e tra una corsa e l'altra è stato fatto passare attraverso la colonna fase mobile, fino alla stabilizzazione della linea di base.

## 4.6 CONTROLLO DELL'EFFICIENZA SEPARATIVA DELLA COLONNA

Per valutare l'enantioselettività e l'efficienza separativa della colonna sono stati iniettati una serie di campioni racemi noti legare HSA in maniera enantioselettiva.

L'analisi è stata condotta nelle seguenti condizioni:

FM: tampone fosfato 50 mM pH 7/1-propanolo 96:4

Flusso: 0.8 ml/min

I campioni analizzati sono stati:

- ◆ *rac*-N-benzoilleucina c.ca 0.1 mg/ml (soluzione 1 mg/ml in 1-propanolo diluito 1:10 con fase mobile)
- ◆ *rac*-warfarin c.ca 0.005 mg/ml (soluzione 1 mg/ml in 1-propanolo diluito 1:200 con fase mobile).

Successivamente le stesse soluzioni sono state analizzate nelle seguenti condizioni:

FM: tampone fosfato 67 mM pH 7.4/1-propanolo 95:5

Flusso: 1 ml/min

Solo per uno degli analiti, *rac*-N-Benzoilleucina, è stato possibile ottenere i tempi di ritenzione.

In entrambi i casi precedenti gli analiti sono risultati eccessivamente trattenuti, per cui è stata ulteriormente aumentata la percentuale di modificatore organico nella fase mobile.

Le nuove condizioni sono state:

FM: tampone fosfato 67 mM pH 7.4/1-propanolo 90:10

I campioni analizzati sono stati:

- ◆ *rac*-N-Benzoilleucina c.ca 0.1 mg/ml (soluzione 1 mg/ml in 1-PrOH)

- diluito 1:10 in FM)
- ◆ *rac*-warfarin c.ca 0.005 mg/ml (soluzione 1 mg/ml in 1-PrOH diluito 1:200 in FM)
  - ◆ *rac*-oxazepam c.ca 0.04 mg/ml (soluzione 0.4 mg/ml in 1-PrOH diluito 1:10 in FM)
  - ◆ *rac*-ketoprofene c.ca 0.01 mg/ml (soluzione 0.1 mg/ml in 1-PrOH diluito 1:10 in FM)

Oxazepam e N-benzoilleucina sono stati iniettati sia con un flusso 0.8 ml/min che 1 ml/min, mentre warfarin e ketoprofene sono stati analizzati solo con flusso pari a 1 ml/min.

Tutte le analisi sono state condotte a temperatura ambiente, pari a c.ca 28°C.

## **4.7 ANALISI DEL LEGAME DI INIBITORI DELLA PROTEASI-HIV ALL'HSA**

### ***4.7.1 Determinazione della percentuale di legame tramite biocromatografia***

La colonna derivatizzata e caratterizzata, precedentemente descritta, è stata utilizzata per studiare l'entità del legame dei farmaci antivirali, inibitori della proteasi del virus HIV, alla proteina HSA.

I composti analizzati sono stati:

- ◆ amprenavir
- ◆ atazanavir
- ◆ lopinavir
- ◆ ritonavir
- ◆ saquinavir

Le soluzioni sono state preparate in 1-propanolo alla concentrazione di 1 mg/ml e successivamente diluite 1:10 in tampone fosfato 67 mM, pH 7.4.

Le analisi sono state condotte a temperatura ambiente (circa 28°C) utilizzando come fase mobile tampone fosfato 67 mM pH 7.4 contenente percentuali variabili di 1-propanolo ad un flusso di 1 ml/min. Poichè questi farmaci sono caratterizzati da un'elevata percentuale di legame alla proteina, non è stato possibile valutare direttamente l'entità del legame in condizioni pseudofisiologiche (tampone fosfato 67 mM, pH 7.4). Perciò l'analisi è stata ripetuta aggiungendo percentuali decrescenti di 1-propanolo (10-8-6-4-3.6-3-2-1-0.5-0.2-0%) alla fase mobile; è stato possibile condurre l'analisi in assenza di propanolo solo per amprenavir e atazanavir, i composti meno ritenuti, mentre per il ritonavir non si è scesi al di sotto del 1% di modificatore e per lopinavir e saquinavir non si è scesi al di sotto del 4%.

#### ***4.7.2 Studi di competizione tramite biocromatografia***

La colonna derivatizzata e caratterizzata è stata infine utilizzata per studi di competizione; gli spiazzatori utilizzati sono stati:

- ◆ acido valproico (PM=166.2), marker sito della bilirubina.
- ◆ salicilato di sodio (PM=160.1), marker sito I
- ◆ ibuprofene (PM=206.28), marker del sito II

Negli studi di competizione sono stati analizzati gli antivirali che sono risultati più affini negli esperimenti precedenti:

- ◆ lopinavir
- ◆ ritonavir
- ◆ saquinavir

Le soluzioni di lopinavir, ritonavir e saquinavir sono state preparate in 1-propanolo alla concentrazione di 1 mg/ml e diluite 1:10 in tampone fosfato 67 mM, pH 7.4, appena prima dell'iniezione.

Le analisi sono state condotte con le seguenti condizioni:

FM: tampone fosfato 67 mM, pH 7.4/1-propanolo 96:4 contenente concentrazioni variabili di competitore

Flusso: 1 ml/min

Tutte le analisi sono state condotte a temperatura ambiente, pari a c.ca 28°C.

Le concentrazioni di competitore utilizzate sono:

◇ [ibuprofene] = 0-2-5-10-50  $\mu$ M

◇ [salicilato] = 0-50-100-200  $\mu$ M

◇ [valproato] = 1-2-3-4-5 mM

#### ***4.7.3 Studi di competizione tramite dicroismo circolare***

Le registrazioni del segnale di dicroismo circolare a bassa energia del complesso HSA-bilirubina sono state effettuate nell'intervallo di lunghezza d'onda 235-530 nm, a temperatura ambiente ed in una cella di cammino ottico 1cm. Tutti gli spettri sono stati acquisiti con parametri strumentali identici per poter mettere a confronto i risultati ottenuti.

In questo esperimento il marker sito-specifico era la bilirubina che legando l'HSA da origine a un segnale di dicroismo circolare. A questo complesso sono state aggiunte quantità crescenti di competitore (ritonavir) ed è stata monitorata la variazione del segnale rispetto a quello in assenza di competitore.

Per le prove sono state utilizzate le seguenti soluzioni stock:

◇ Ritonavir: 10 mM in dimetilsolfossido (DMSO)

◇ Bilirubina: il solvente utilizzato per la preparazione della soluzione madre della bilirubina è una miscela (1 ml) di solventi aggiunti in sequenza, partendo da KOH 0.1 M (200  $\mu$ L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M (200  $\mu$ L) ed H<sub>2</sub>O. La concentrazione finale è 15 mM. La soluzione stock di bilirubina è instabile

alla luce, pertanto va preparata poco prima dell'uso.

◇ HSA 150  $\mu$ M in tampone fosfato 67 mM, pH 7.4.

Tutte le soluzioni dei complessi tra bilirubina e HSA sono state preparate in tampone fosfato (67 mM, pH 7.4) con un rapporto molare 1/1. A queste soluzioni, sono state aggiunte quindi quantità decrescenti di inibitore della proteasi-HIV.

Le soluzioni analizzate erano composte come segue: [HSA]/[bilirubina]/[ritonavir] in rapporti molarli di 1:1:0, 1:1:1, 1:1:2, 1:1:4, 1:1:6, 1:1:8.

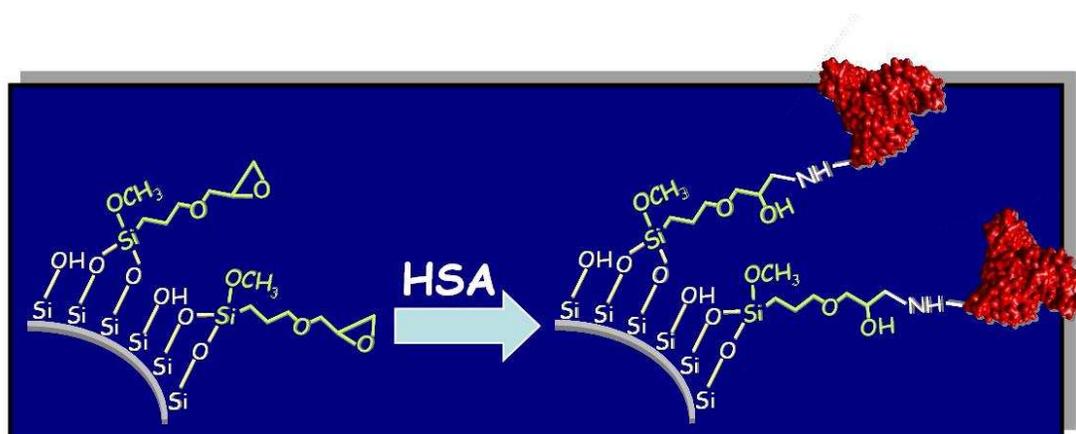
Gli spettri CD differenza sono stati ottenuti sottraendo la linea di base, misurata con un bianco opportuno, dallo spettro dei complessi [HSA]/[bilirubina] e [HSA]/[bilirubina]/[ritonavir].

## 4.8 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.8.1 Caratterizzazione della colonna

Una colonna impaccata con silice epoxy kromasil, 200Å, 5µm, avente le dimensioni 50 x 4.6 mm, è stata derivatizzata con la proteina HSA, secondo il procedimento descritto precedentemente da Aubry et al. [7], con alcune piccole modifiche.

La reazione è un'attacco nucleofilo da parte dei gruppi -NH<sub>2</sub>, -OH e -SH liberi della proteina sugli anelli epossidici della fase stazionari. In realtà il metodo di immobilizzazione è messo a punto in maniera da favorire l'attacco nucleofilo sui terminali amminici della proteina, in maniera da legare porzioni della proteina importanti per il legame dei farmaci (fig. 4.6).



**Fig. 4.6** Schema della reazione di immobilizzazione

Successivamente la colonna è stata caratterizzata, quantificando i siti attivi di proteina contenuti al suo interno e verificandone il funzionamento e l'efficienza.

#### 4.8.2 Titolazione dei siti di legame attivi

La titolazione dei siti di legame funzionali dell'albumina che erano stati immobilizzati all'interno della colonna è stata effettuata mediante analisi frontale. Lo stesso metodo permette di determinare la costante di affinità dell'interazione analita-ligando; questo rende tale analisi la tecnica di scelta per la caratterizzazione della colonna [5].

L'analisi è stata eseguita utilizzando una serie di soluzioni di L-triptofano a concentrazione nota, secondo il metodo descritto da D. Hage [8]. Tale analita lega selettivamente un unico sito della proteina (sito II), rendendo perciò più semplice l'interpretazione dei risultati; infatti in questo caso il numero dei siti di legame ottenuto tramite l'analisi corrisponde anche al numero di molecole di proteina immobilizzata correttamente.

I cromatogrammi ottenuti sono riportati in figura 4.7.

L'interpretazione dei risultati si è basata sulla misura delle moli apparenti di HSA immobilizzata ( $m_{\text{HSA app}}$ ); questo valore dipende da  $K_A$  e  $m_{\text{HSA}}$ , secondo la seguente equazione:

$$1/m_{\text{HSA app}} = 1/(K_A m_{\text{HSA}} [\text{L-Trp}] + 1/m_{\text{HSA}}) \quad (\text{eq. 2.5})$$

Poichè:

$$m_{\text{HSA app}} = V_{\text{eluizione}} [\text{L-Trp}] \quad (\text{eq. 4.1})$$

è stato necessario ricavare dalle curve i tempi corrispondenti ai punti di flesso dei cromatogrammi alle varie concentrazioni; per fare ciò è stata calcolata la derivata prima delle curve sigmoidali acquisite, in modo da ottenere dei picchi, il cui valore massimo corrisponde a  $t_R$ . Lo stesso è stato fatto per ricavare il  $t_0$ , cioè il tempo che l'analita passa all'interno del sistema HPLC, ad esclusione della colonna: per determinare tale valore sono state eseguite due iniezioni, una con la soluzione a concentrazione 100  $\mu\text{M}$ , l'altra con la soluzione 12.5  $\mu\text{M}$ ; dall'analisi delle derivate prime sono risultati tempi simili tra loro

( $t_{0(12.5\mu\text{M})}=7.47$  min,  $t_{0(100\mu\text{M})}=7.79$  min), ciò ha confermato che non ci sono state variazioni significative tra le varie corse.

Successivamente è stato costruito un grafico avente alle ordinate il valore  $1/m_{\text{HSA app}}$  in funzione di  $1/[\text{L-Trp}]$ . Il risultato è stato una retta, da cui è stato possibile calcolare il valore di  $K_A$  e di  $m_{\text{HSA}}$  (Fig. 4.8).

La retta ottenuta ha presentato un buon coefficiente di correlazione lineare, ( $r^2=0.996$ ). Il punto corrispondente alla soluzione 100  $\mu\text{M}$  devia leggermente dalla linearità: questo è molto probabilmente dovuto al fatto che a concentrazioni così alte di analita in colonna, si perde la condizione di equilibrio che sta alla base dell'equazione 2.5 per cui si ha una deviazione dalla linearità. Questa informazione permette di stabilire la concentrazione massima che è possibile iniettare in colonna senza avere variazioni dei tempi di iniezione [5]. L'equazione della retta è:  $y = 0.1029x + 2.9128$ ; dall'inverso dell'intercetta è stato possibile quantificare i siti attivi di proteina immobilizzata all'interno della colonna, mentre il rapporto tra intercetta e pendenza della retta corrisponde alla costante di affinità.

La quantità di HSA correttamente immobilizzata è pari a 22.8 mg, mentre  $K_A=2.8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ . Considerando una temperatura di 28°C, il dato di  $K_A$  ottenuto concorda con quelli riportati in letteratura [8]. Questo dato è una prima conferma che l'immobilizzazione non ha modificato le proprietà di legame dell'albumina e che pertanto i dati ottenuti con la colonna sono affidabili.

### ***4.8.3 Controllo dell'efficienza separativa***

Successivamente, per ottenere ulteriori conferme della corretta immobilizzazione, sono state analizzate una serie di racemi di molecole, note legare l'albumina in maniera enantioselettiva ai principali siti di legame.

L'analisi è stata eseguita utilizzando soluzioni di rac-oxazepam (sito II), rac-warfarin (sito I), rac-Ketoprofene (sito II), rac-N-Benzoilleucina (sito II).

Per prima cosa sono state effettuate delle prove per trovare le migliori condizioni di analisi, in particolare per quanto riguarda la percentuale di

modificatore organico aggiunto alla fase mobile. Le prime due fasi utilizzate, che contenevano rispettivamente il 4% e il 5% di 1-propanolo, hanno comportato dei tempi di ritenzione eccessivamente lunghi, fatta eccezione per l'iniezione di rac-N-benzoil-leucina, eseguita con il 5% di modificatore ed un flusso pari a 1 ml/min ( $t_1=7.5$ ,  $t_2=15.4$ ).

Infine, è stato ritenuto opportuno utilizzare una fase mobile composta da tampone fosfato 67 mM pH 7.4/1-propanolo 90:10.

Sono state ottenute separazioni caratterizzate da buona selettività ed efficienza (Figg. 4.9, 4.10, 4.11), fatta eccezione per rac-Ketoprofene che non è stato risolto in maniera efficiente, pur mostrando una buona selettività (Fig. 4.12).

I cromatogrammi ottenuti dalle acquisizioni sono stati analizzati, ricavando da essi il valore dei parametri caratteristici delle separazioni cromatografiche e valutando la qualità della colonna derivatizzata.

La selettività della colonna è risultata buona per tutti i racemi analizzati, ed ha confermato la buona qualità della colonna (Tab. 4.1) che pertanto è adatta all'uso per scopi biocromatografici. Inoltre la buona efficienza e risoluzione ottenuta nella maggior parte dei casi permette di utilizzare tale colonna anche per scopi separativi.

#### ***4.8.4 Interazione degli inibitori della proteasi-HIV con HSA***

La colonna derivatizzata è stata utilizzata nella caratterizzazione del legame HSA di alcuni dei farmaci che fanno parte della classe degli inibitori della proteasi virale.

In particolare lo studio è stato volto alla determinazione della percentuale di legame dei farmaci antivirali alla proteina. Dalla letteratura è noto che le interazioni tra i composti analizzati ed il ligando sono caratterizzate da un'alta percentuale di legame [125, 126]. A causa di questa caratteristica, non è stato possibile valutare direttamente l'entità del legame in condizioni pseudofisiologiche (tampone fosfato 67 mM pH 7.4), in quanto i composti sarebbero stati eccessivamente trattenuti in colonna. Di conseguenza sono state eseguite una serie di analisi in cui alla fase mobile venivano aggiunte quantità

decrementi di un modificatore organico, l'1-propanolo, che avrebbe ridotto i tempi di ritenzione degli analiti.

Per i due composti meno ritenuti, l'amprenavir e l'atazanavir, è stato possibile eseguire l'analisi anche senza modificatore, per il ritonavir è stato necessario utilizzare almeno l'1% di 1-propanolo, mentre per il saquinavir e il lopinavir l'analisi si è conclusa in presenza del 4% di modificatore della fase mobile.

L'analisi dei risultati è stata rivolta al calcolo della percentuale di farmaco che si lega alla proteina in assenza di solventi organici.

Per prima cosa è stato necessario ricavare il valore del fattore di capacità  $k$ , che, secondo l'eq. 2.3, è direttamente correlato alla percentuale di farmaco legato.

Per amprenavir e atazanavir è stato possibile calcolare il valore di  $k$  in assenza di modificatore organico, direttamente dai tempi di ritenzione ottenuti nelle analisi eseguite in assenza di propanolo; per gli altri tre composti, invece, è stato necessario estrapolarne il valore in base all'andamento delle rette rappresentanti la variazione di  $\log k$  in funzione della percentuale di modificatore utilizzato (Fig. 4.13).

Nella figura si può osservare che i punti ottenuti per tutti i farmaci approssimano delle rette; per percentuali di 1-PrOH che vanno dal 10% al 4% tali rette presentano approssimativamente la stessa pendenza e sono tra loro parallele. Per concentrazioni di modificatore minori (3.6-3-2-1-0.5-0.2-0%) l'andamento del grafico cambia, è nuovamente lineare ma con pendenza maggiore. Di conseguenza è possibile affermare che, per concentrazioni maggiori del 4% di 1-propanolo, si verificano delle variazioni nel microambiente farmaco-proteina, che influenzano la loro interazione in maniera significativa. In letteratura è riportato che il solvente organico, in dipendenza della natura e della concentrazione, può modificare la conformazione della proteina [137].

Visti i risultati ottenuti per i tre composti meno trattenuti è ipotizzabile un comportamento simile anche per lopinavir e saquinavir, anche se non si hanno

dati per concentrazioni di modificatore inferiori al 4% e non è possibile provare se effettivamente si verifica un cambiamento nell'andamento del grafico rappresentante il valore  $\log k$ , analogo agli altri.

Inoltre, dall'osservazione della variazione di  $k$  al variare della concentrazione di propanolo dal 4% al 10%, si può notare che tutti e cinque i farmaci mostrano la stessa variazione di affinità al variare delle condizioni. La stessa osservazione vale anche a concentrazioni minori del 4% di propanolo per i tre farmaci che è stato possibile analizzare. Questo lascia supporre che i cinque antivirali possano legare lo stesso sito sull'HSA, oppure che leghino a siti che vengono influenzati nella stessa maniera dalla presenza del propanolo.

I risultati ottenuti per la valutazione della percentuale di legame dei vari farmaci alla proteina sono rappresentati in Tabella 4.2. L'estrapolazione del coefficiente di capacità  $k$  per i farmaci più trattenuti è stata effettuata sulla base dei dati ottenuti, ma, tenendo conto delle precedenti considerazioni, si può ipotizzare che nella realtà lopinavir e saquinavir siano legati in maggior misura. I risultati sono stati anche confrontati con i dati di letteratura, dai quali non sono state rilevate variazioni significative, ad eccezione dell'atazanavir che sembra legare l'albumina con maggiore affinità di quanto riportato in letteratura (Tab. 4.2).

Il legame degli antivirali alle proteine di trasporto condiziona il comportamento di questi farmaci, come dimostrato dalla significativa riduzione dell'attività inibitoria osservata in presenza di HSA [10]. La riduzione è risultata infatti più importante per gli antivirali che mostrano più alta affinità per la proteina di trasporto.

Recentemente è stato inoltre dimostrato che la struttura degli antivirali condiziona, oltre che l'affinità di legame all'HSA, anche la cinetica del meccanismo d'interazione, con inevitabile influenza sul processo di distribuzione [9].

#### ***4.8.5 Studi di competizione tramite biocromatografia***

La colonna derivatizzata con HSA è stata utilizzata infine nello studio di competizione tra alcuni inibitori della proteasi virale e degli spiazzatori.

Gli studi di spiazzamento sono stati effettuati utilizzando lo stesso sistema, usato nello studio della percentuale di legame dei farmaci antivirali all'HSA, però con delle modificazioni: la FM in questo caso è tampone fosfato 67 mM pH 7.4/ 1-PrOH 96:4, nella colonna con HSA immobilizzata, in assenza ed in presenza di modificatori selettivi noti legare con alta affinità a siti specifici della proteina.

Il primo competitore usato è stato il salicilato, che lega con alta affinità al sito I dell'albumina [14], successivamente l'ibuprofene, che lega al sito II, e infine il valproato che lega al sito della bilirubina.

Gli inibitori della proteasi-HIV analizzati sono stati lopinavir, saquinavir e ritonavir.

L'analisi dei risultati è stata rivolta al calcolo della costante di dissociazione  $K_D$  degli spiazzatori utilizzati al sito di legame degli antivirali e il confronto con i dati presenti in letteratura.

Per prima cosa è stato necessario ricavare il valore del coefficiente di capacità alla presenza del 4% di propanolo,  $k_{4\%}$ , dalla media dei tempi di ritenzione dei farmaci antivirali,  $t_R$  e dal tempo morto,  $t_0$  tramite la seguente equazione:

$$k_{4\%} = (t_r - t_0) / t_0 \quad (\text{eq. 4.2})$$

Gli esperimenti sono stati effettuati con il 4% di propanolo, e i dati sono stati estrapolati in assenza di propanolo e messi in un grafico che mette in relazione l'inverso del coefficiente di capacità ( $1/k$ ) con la concentrazione dello spiazzatore, come si vede dalle figg. 4.14-4.19, che mostrano i profili di

spiazzamento di lopinavir, ritonavir e saquinavir da parte del salicilato e dell'ibuprofene.

Successivamente si è calcolato il logaritmo del fattore di capacità al 4% e allo 0% di propanolo in presenza di competitore, tramite la seguente relazione:

$$\mathbf{Log\ k\ A_{4\%} : Log\ k\ A_{0\%} = Log\ k\ B_{4\%} : Log\ k\ B_{0\%}} \quad (\text{eq.4.3})$$

dove con A ci si riferisce alla presenza del competitore e con B all'assenza del competitore.

Dai grafici si può facilmente osservare che l'aggiunta di competitore alla fase mobile non modifica in maniera significativa l'affinità degli antivirali per l'albumina, pertanto queste molecole non legano l'albumina a livello dei suoi due siti principali.

Per il valproato invece notiamo dai grafici (figg. 4.20-4.22) una maggiore pendenza della retta, rispetto agli altri competitori, questo effetto è assimilabile ad un legame anti-cooperativo.

Da questi grafici, dalla pendenza e dall'intercetta delle rette, si è ricavato il valore del coefficiente di dissociazione  $K_D$  degli spiazzatori utilizzati per il sito di legame degli analiti, tramite la seguente equazione [5]:

$$\mathbf{1/k_A = (V_M K_I [I]) / (K_A m_L) + V_M / (K_A m_L)} \quad (\text{eq. 4.4})$$

da cui si ottiene:

$$\mathbf{\text{intercetta/pendenza} = 1/K_I = K_D} \quad (\text{eq. 4.5})$$

dove  $V_M$ = volume morto;  $m_L$ = moli di HSA presenti;  $k_A$ = coefficiente di capacità;  $[I]$  = concentrazione spiazzatore;  $K_A$  = costante di associazione del farmaco in esame;  $K_I$  = costante di associazione dello spiazzatore per il sito di legame del farmaco;  $K_D$  = costante di dissociazione dello spiazzatore per il sito di legame del farmaco.

Dal confronto delle le  $K_D$  misurate e i valori di  $K_D$  dei competitori per i loro siti specifici presenti in letteratura (Tab. 4.3), si evince che nessuno dei tre competitori si lega al sito di legame degli antivirali studiati, pertanto questi farmaci non si legheranno ai siti I, II, e neanche a quello della bilirubina.

Questo risultato sarebbe in disaccordo con un lavoro di Bocedi et al. [38], in cui viene suggerita la possibilità che atazanavir, ritonavir e saquinavir possano legare al sito I. In un lavoro successivo degli stessi autori [138], invece, viene escluso che atazanavir possa legarsi al sito I, mentre sembrerebbe probabile che possa legarsi a livello del dominio IIB nella zona corrispondente al sito FA6 degli acidi grassi. I risultati ottenuti tramite gli esperimenti biocromatografici non confermano, ne smentiscono quest'ultima ipotesi.

#### ***4.8.6 Studi di competizione tramite dicroismo circolare***

Dato che gli esperimenti di competizione in cui il valproato (marker del sito della bilirubina) è stato usato come spiazzatore, hanno evidenziato un certo comportamento anticooperativo del competitore per il legame degli antivirali, è stato effettuato anche uno studio di dicroismo circolare per verificare se lo stesso comportamento si ottiene anche con la bilirubina, in soluzione.

In questa analisi è stato analizzato un solo inibitore della proteasi HIV, il ritonavir (RTN), che tra i farmaci analizzati è quello che lega con maggiore affinità l'HSA. In questo caso il ritonavir è utilizzato come competitore e la bilirubina è il marker.

Dal confronto degli spettri CD ottenuti (fig. 4.23), si nota un leggero spiazzamento della bilirubina dal suo sito fino alla concentrazione HSA/BIL/RTN 1:1:6, dopodiché, ulteriori aggiunte di farmaco non comportano alcun effetto. Questo risultato suggerisce che il RTN non si lega al sito di legame della bilirubina, ma ha solo un debole effetto anticooperativo. Questo risultato conferma quello ottenuto con gli studi di spiazzamento tramite biocromatografia

## 4.9 CONCLUSIONI

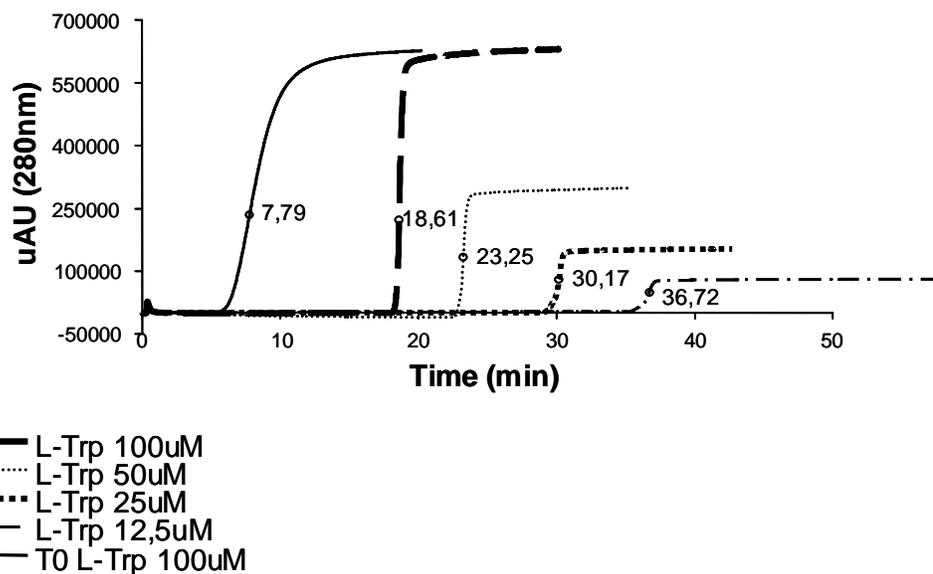
Il metodo di immobilizzazione alla matrice silicea si è dimostrato efficiente nel conservare le proprietà di legame dell'HSA mostrate in soluzione.

La tecnica biocromatografica è risultata affidabile per la determinazione della percentuale di farmaco legato, come dimostrato dall'ottimo accordo dei dati ottenuti con la letteratura.

I composti analizzati hanno mostrato un'alta percentuale di legame all'albumina: in particolare ritonavir, lopinavir, saquinavir raggiungono livelli superiori al 95%. I valori di legame ottenuti sono in linea con quelli disponibili in letteratura ad eccezione dell'atazanavir che sembra legarsi all'HSA più intensamente (Tab. 4.2).

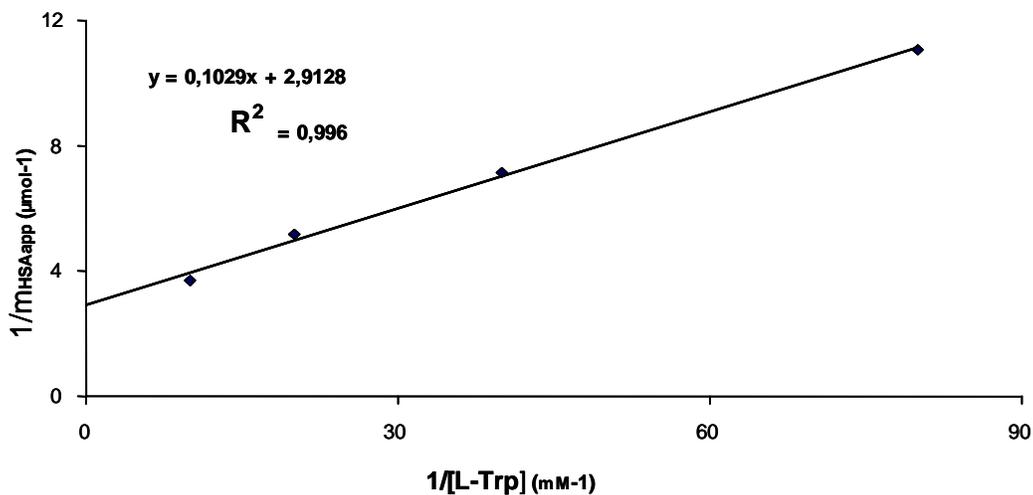
L'utilizzo della biocromatografia, ha inoltre permesso di caratterizzare i siti di legame degli antivirali all'HSA, mediante l'utilizzo degli spiazzatori salicilato, ibuprofene e valproato, e di evidenziare un legame indipendente degli antivirali esaminati ai siti I e II e un debole effetto anticooperativo con il sito della bilirubina; quest'ultimo fenomeno è stato confermato da esperimenti di dicroismo circolare effettuati in soluzione. Questa è un'ulteriore conferma che la tecnica biocromatografica rappresenta un modello affidabile per lo studio delle interazioni tra molecole e HSA.

### ANALISI FRONTALE Acquisizioni



**Fig. 4.7** Curve di acquisizione ottenute dalle prove di analisi frontale eseguite con la colonna derivatizzata.

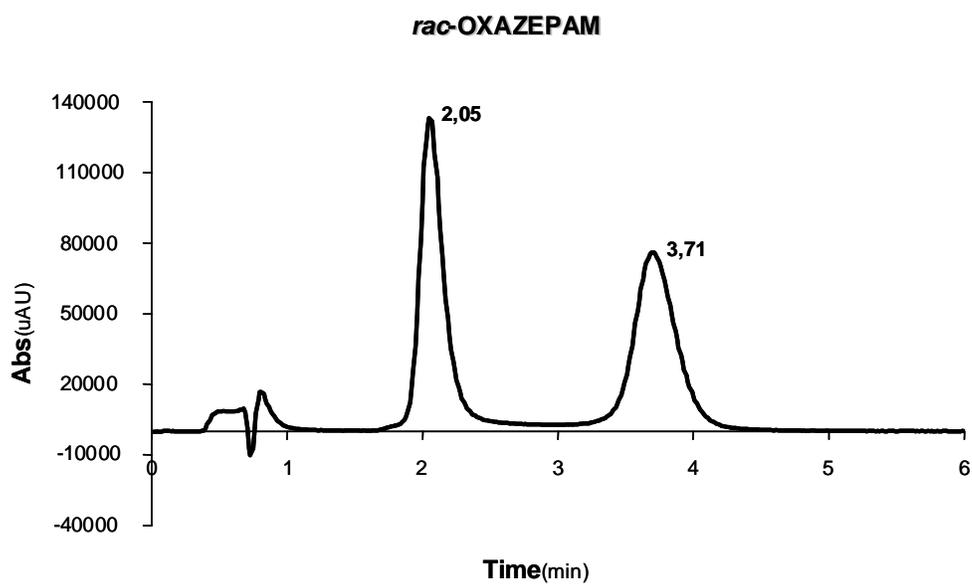
### ANALISI FRONTALE Risultati



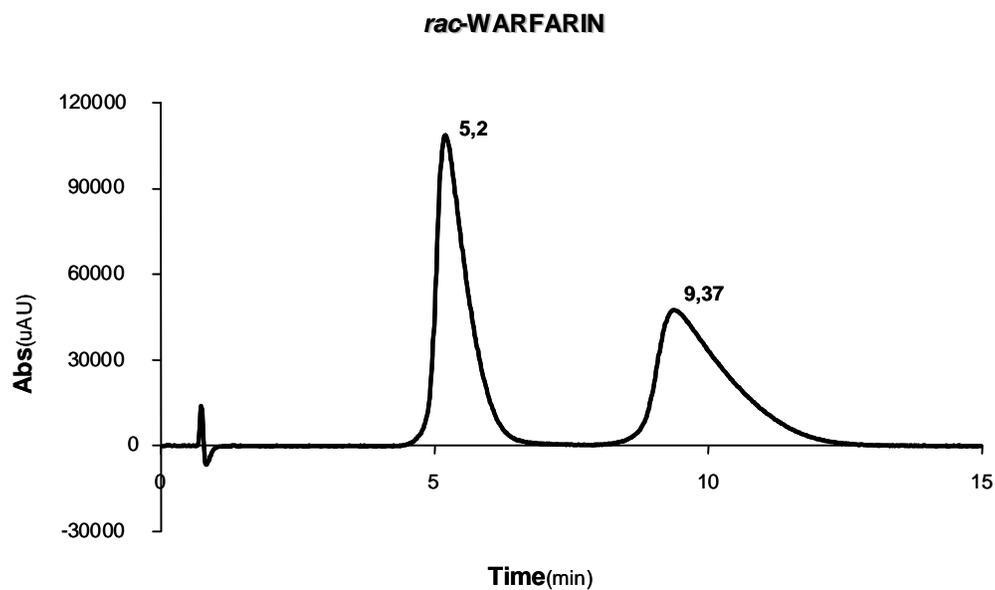
$$1/m_{Lapp} = 1/(K_A m_L [A]) + 1/m_L$$

$$m_{HSA} \text{ (mg)} = 22.8 ; K_A \text{ (M}^{-1}\text{)} = 2.8 \cdot 10^4$$

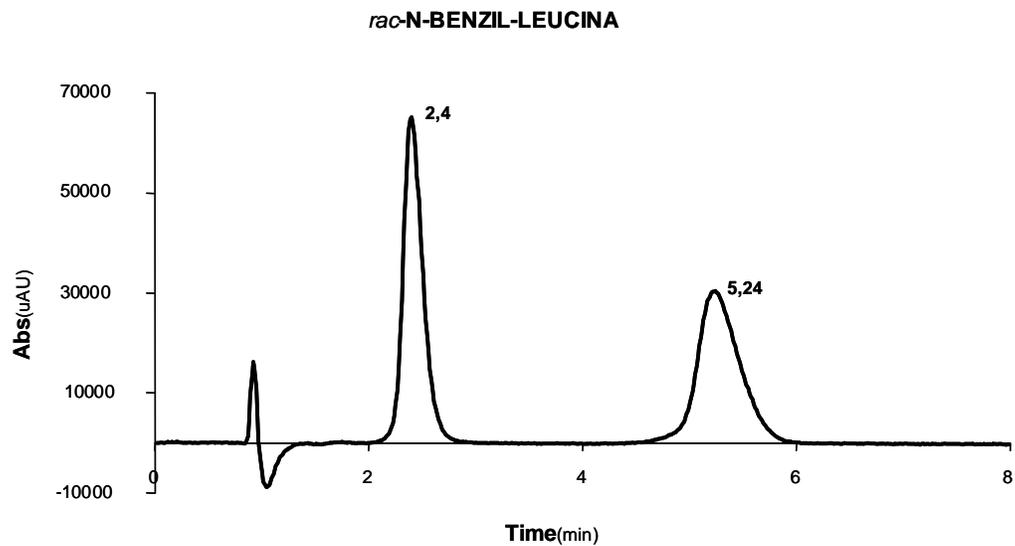
**Fig. 4.8** Risultati ottenuti dall'analisi frontale; valutazione di  $m_{HSA}$  e  $K_A$ .



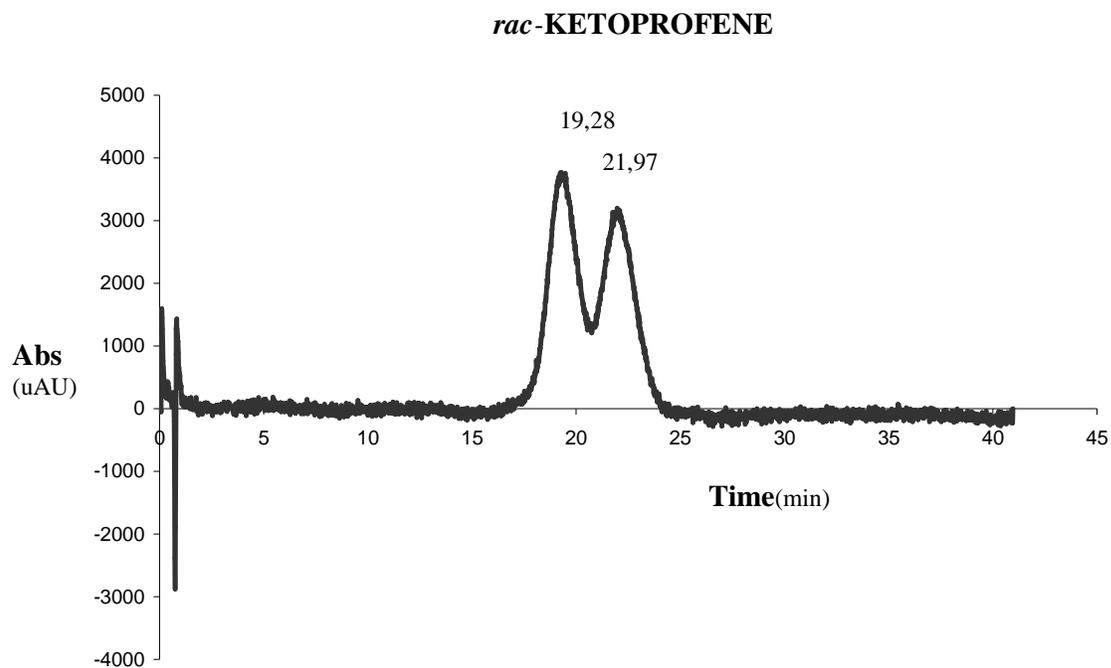
**Fig. 4.9** Separazione di *rac*-oxazepam ottenuta con FM: PB 67 mM pH 7.4/1-propanolo 90:10, flusso 1 ml/min.



**Fig. 4.10** Separazione di *rac*-Warfarin ottenuta con FM: PB 67 mM pH 7.4/1-propanolo 90:10, flusso 1 ml/min.



**Fig. 4.11** Separazione di *rac*-N-benzoil-leucina ottenuta con FM: PB 67 mM pH 7.4/1-PrOH 90:10, flusso 0.8 ml/min.



**Fig. 4.12** Separazione di *rac*-Ketoprofene ottenuta con FM : PB 67 mM pH 7.4/1-propanolo 90:10, flusso 1 ml/min

| CAMPIONE     | FM<br>(tampono fosfato<br>67mM pH7.4/1PrOH) | Flusso*<br>(mL/min) | $k_1$ | $\alpha$    | Neff <sub>1</sub> | Neff <sub>2</sub> | R <sub>s</sub> |
|--------------|---|---------------------|-------|-------------|-------------------|-------------------|----------------|
| WARFARIN     | 95:5  | 1                   | 26,74 | <b>2,27</b> | 207,11            | 156,23            | <b>2,53</b>    |
|              | 90:10                                       | 1                   | 5,99  | <b>1,94</b> | 257,85            | 195,28            | <b>2,33</b>    |
| OXAZEPAM     | 90:10                                       | 0,8                 | 2,29  | <b>2,19</b> | 280,37            | 454,27            | <b>3,66</b>    |
|              | 90:10                                       | 1                   | 1,76  | <b>2,26</b> | 223,80            | 403,53            | <b>3,52</b>    |
| N-Bz-LEUCINA | 90:10                                       | 0,8                 | 2,05  | <b>2,76</b> | 304,08            | 686,13            | <b>5,41</b>    |
|              | 90:10                                       | 1                   | 1,54  | <b>2,94</b> | 289,76            | 1139,74           | <b>6,65</b>    |
| KETOPROFENE  | 90:10                                       | 1                   | 24,91 | <b>1,15</b> | 627,43            | 650,27            | <b>0,86</b>    |

\* Per le iniezioni eseguite a flusso 0.8 ml/min  $t_0=0.787$ min, per le iniezioni eseguite a flusso 1 ml/min  $t_0=0.744$  min.

Tab. 4.1 Dati di selettività e risoluzione ottenuti con la colonna derivatizzata con HSA.

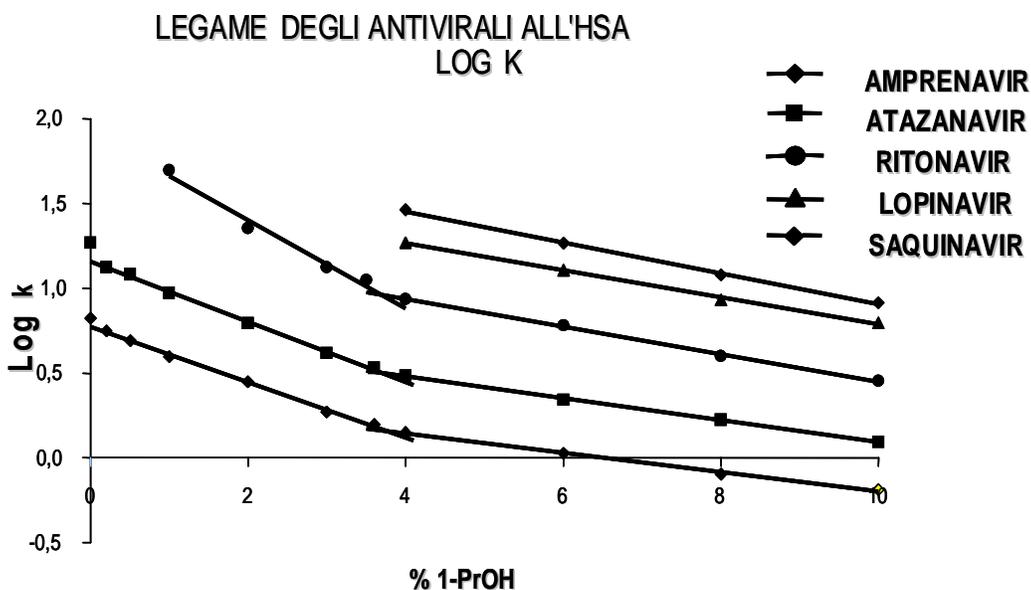
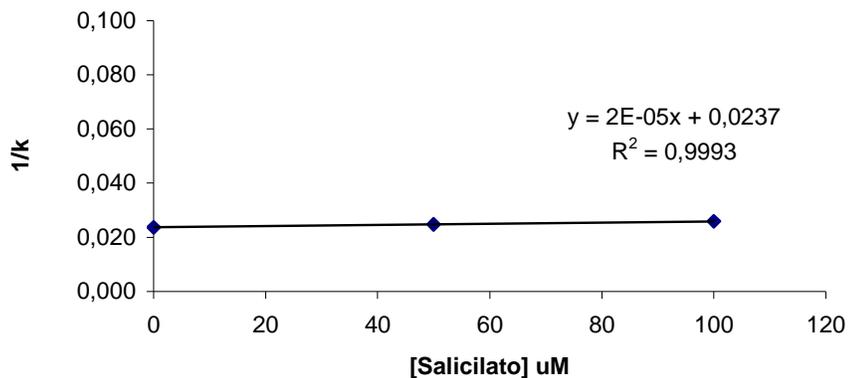


Fig. 4.13 Andamento del valore di log k al variare della percentuale di 1-PrOH aggiunta fase mobile.

| Campione   | k            | % legame all'HSA | % legame all'HSA da letteratura | Deviazione da letteratura |
|------------|--------------|------------------|---------------------------------|---------------------------|
| <b>AMP</b> | <b>6,66</b>  | <b>86,9%</b>     | <b>90%</b>                      | <b>- 3,4%</b>             |
| <b>ATZ</b> | <b>18,63</b> | <b>94,9%</b>     | <b>86%</b>                      | <b>+ 10,3%</b>            |
| <b>RTN</b> | <b>84,59</b> | <b>98,8%</b>     | <b>98/99%</b>                   | <b>+0,8% /- 0,2%</b>      |
| <b>LPN</b> | <b>38,35</b> | <b>97,5%</b>     | <b>98/99%</b>                   | <b>-0,5% /-1,5%</b>       |
| <b>SQN</b> | <b>66,53</b> | <b>98,5</b>      | <b>97%</b>                      | <b>+ 1,5%</b>             |

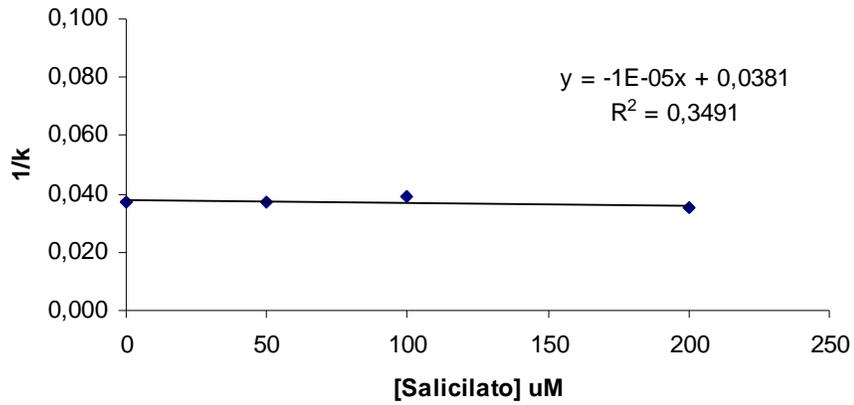
**Tab. 4.2** Valutazione del legame dei farmaci inibitori della proteasi virale all'HSA ricavate dalle prove di biocromatografia e confronto con la letteratura

#### Spiazzamento con Salicilato



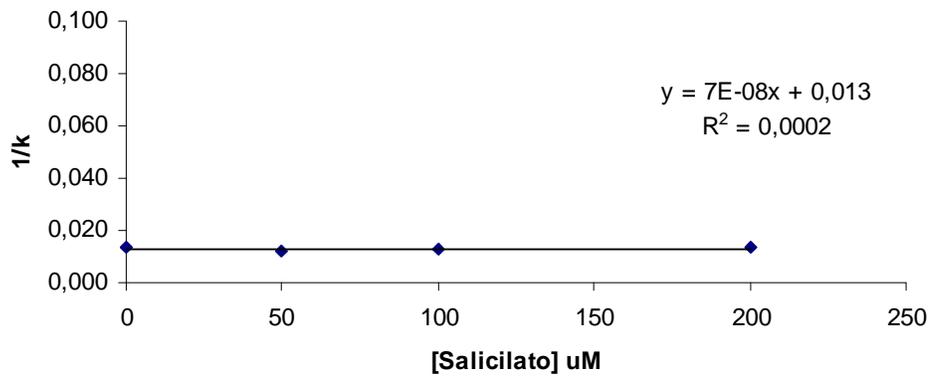
**Fig. 4.14** Spiazzamento del LOPINAVIR con Salicilato ottenuto con FM: PB 67 mM pH 7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.

### Spiazzamento con Salicilato



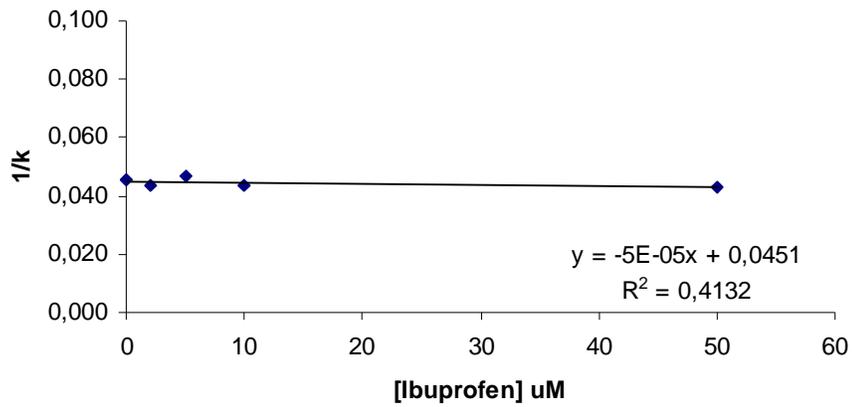
**Fig. 4.15** Spiazzamento del RITONAVIR con Salicilato ottenuto con FM: PB 67 mM pH 7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.

### Spiazzamento con Salicilato



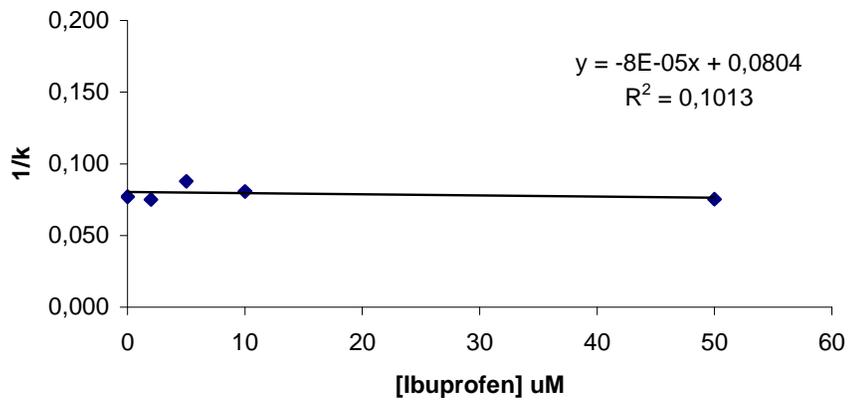
**Fig. 4.16** Spiazzamento del SAQUINAVIR con Salicilato ottenuto con FM: PB 67 mM pH 7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.

### Spiazzamento con Ibuprofene



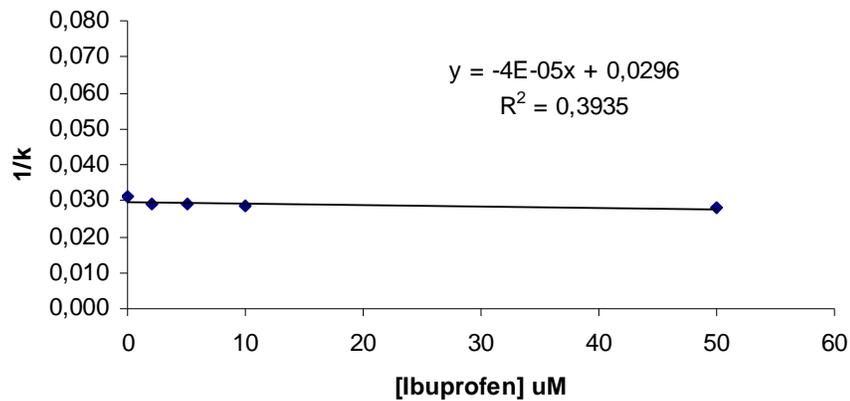
**Fig. 4.17** Spiazzamento del LOPINAVIR con Ibuprofene ottenuto con FM: PB 67 mM  
pH 7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.

### Spiazzamento con Ibuprofene



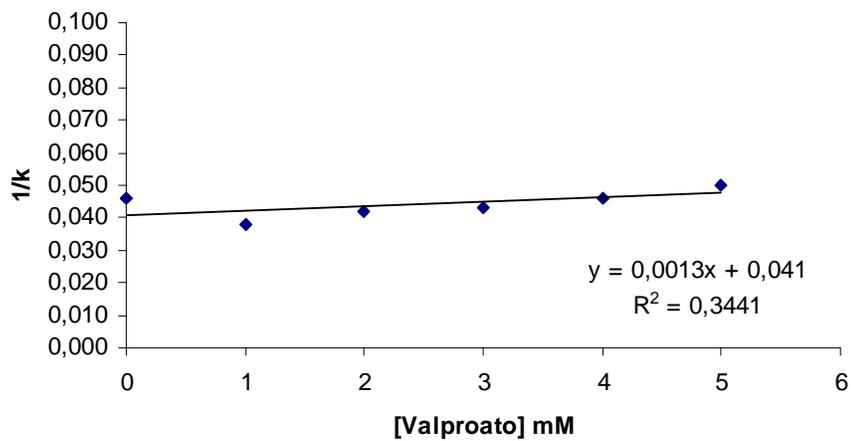
**Fig. 4.18** Spiazzamento del RITONAVIR con Ibuprofene ottenuto con FM: PB 67 mM  
pH 7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.

### Spiazzamento con Ibuprofene

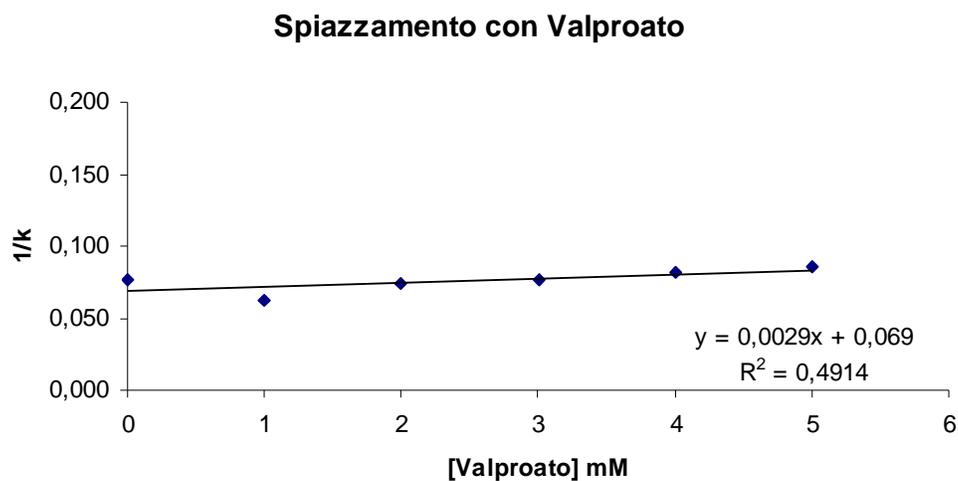


**Fig. 4.19** Spiazzamento del SAQUINAVIR con Ibuprofene ottenuto con FM: PB 67 mM  
pH 7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.

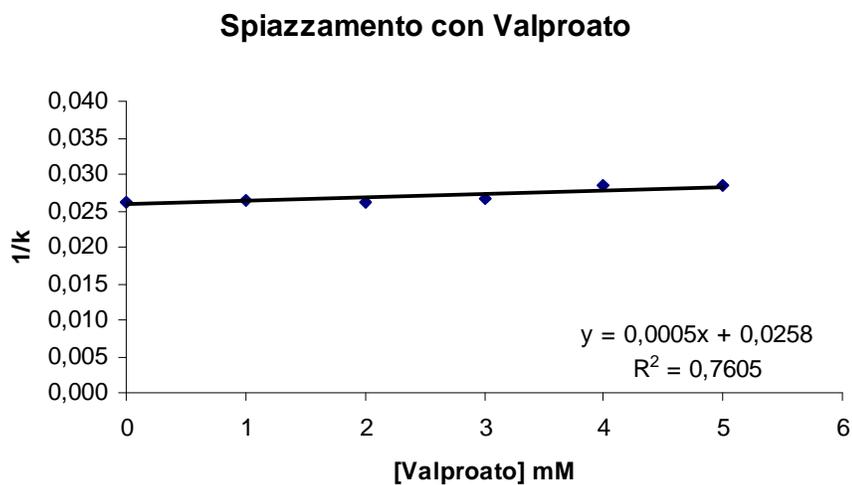
### Spiazzamento con Valproato



**Fig. 4.20** Spiazzamento del LOPINAVIR con Valproato ottenuto con FM: PB 67 mM pH  
7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.



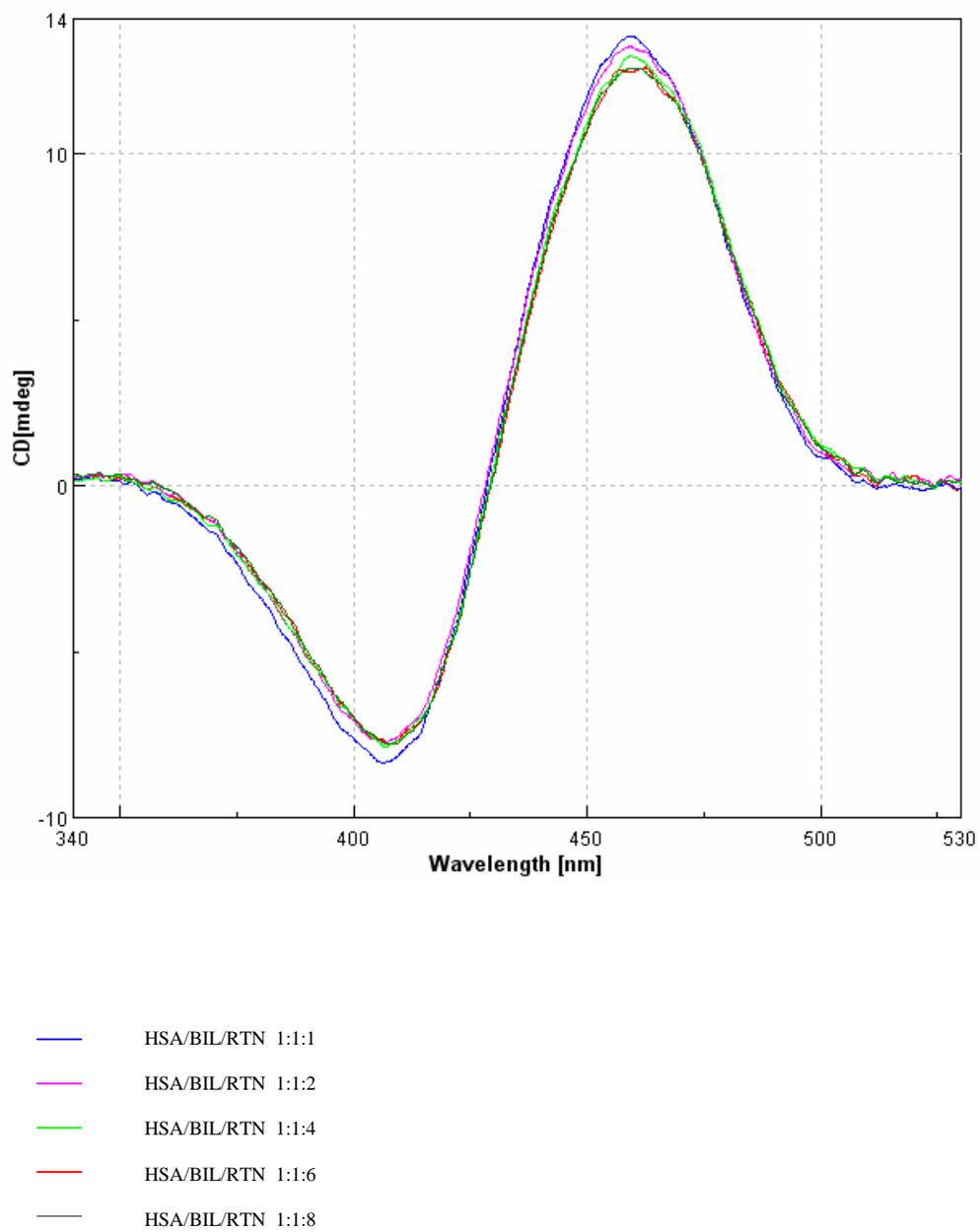
**Fig. 4.21** Spiazzamento del RITONAVIR con Valproato ottenuto con FM: PB 67 mM pH 7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.



**Fig. 4.22** Spiazzamento del SAQUINAVIR con Valproato ottenuto con FM: PB 67 mM pH 7.4/1-PrOH 96:4, flusso 1 ml/min.

| Competitore | K <sub>D</sub> misurata (M) |                        |                        | K <sub>D</sub> lett.(M) |
|-------------|-----------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
|             | RTN                         | LPN                    | SQN                    |                         |
| SALICILATO  | 3.8 x 10 <sup>-3</sup>      | 1.2 x 10 <sup>-3</sup> | 1.8 x 10 <sup>-3</sup> | 4.5 x 10 <sup>-6</sup>  |
| IBUPROFENE  | 1.0 x 10 <sup>-2</sup>      | 0.9 x 10 <sup>-3</sup> | 0.7 x 10 <sup>-3</sup> | 3.7 x 10 <sup>-7</sup>  |
| VALPROATO   | 2.3 x 10 <sup>-2</sup>      | 3.1 x 10 <sup>-2</sup> | 5.1 x 10 <sup>-2</sup> | 1.7 x 10 <sup>-5</sup>  |

**Tab. 4.3** Confronto K<sub>D</sub> apparenti misurate e i dati dei competitori presenti in letteratura [14].



**Fig. 4.23** Spettri CD ottenuti con gli esperimenti di competizione tra bilirubina e ritonavir

## **CAPITOLO 5**

# **DETERMINAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI LEGAME ALLA SIEROALBUMINA UMANA DI UNA SERIE DI POLIAMMINOCHINONI**



# **DETERMINAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI LEGAME ALLA SIEROALBUMINA UMANA DI UNA SERIE DI POLIAMMINOCHINONI**

## **5.1 INTRODUZIONE**

La malattia di Alzheimer rappresenta di gran lunga la più importante causa di demenza nell'età senile: nel 50% dei casi di demenza sopra i 65 anni sottoposti a riscontro autoptico, infatti, viene formulata questa diagnosi. In realtà, la malattia è relativamente frequente anche in età tardo-adulta e presenile, cioè tra i 45 e i 65 anni: la paziente descritta da Alzheimer nel 1907 morì, infatti, all'età di 51 anni.

La malattia esordisce in genere con modesti disturbi di memoria, che successivamente si fanno sempre più gravi, fino ad interferire gravemente con la vita quotidiana del paziente. Il deficit riguarda sia la memoria verbale che quella visuospatiale e interferisce in particolar modo con l'apprendimento di nuove informazioni (memoria recente); successivamente, tuttavia, diviene deficitaria anche la rievocazione di informazioni precedentemente ben apprese. Contemporaneamente a questi sintomi, se ne possono presentare altri, quali depressione e alterazioni comportamentali, come passività, apatia, irritabilità e agitazione tali da confondere il quadro diagnostico. Caratteristica è la comparsa di disorientamento spazio-temporale. Con il procedere della malattia si ha la compromissione di altre facoltà cognitive. Di primaria importanza è la dissoluzione progressiva del linguaggio, deficit di comprensione e utilizzo di parole sbagliate (parafasie).

La durata della malattia è piuttosto variabile: in media è di 7-8 anni, ma sono noti casi di decorso inferiore a 1 anno o superiore ai 20 anni. Il paziente muore ormai in condizioni vegetative, di solito per infezioni urinarie o polmonari concomitanti.

Dal punto di vista macroscopico, la malattia di Alzheimer, essendo una malattia degenerativa cerebrale, porta a un'atrofia generalizzata e simmetrica del

cervello. L'atrofia si associa con una notevole perdita dei grossi neuroni corticali e un restringimento (shrinkage) dei neuroni superstiti [139]. Anche diversi nuclei localizzati nel tronco dell'encefalo sono colpiti dalla perdita neuronale; tra questi in particolare, il nucleo basale di Meynert che è la principale fonte delle fibre nervose colinergiche che proiettano alla neocorteccia. Il riscontro di tale alterazione aveva fatto sorgere "l'ipotesi colinergica" della AD: si era cioè supposto che la AD fosse legata alla degenerazione selettiva delle cellule colinergiche.

Ma, l'atrofia corticale, sebbene rappresenti una caratteristica anatomopatologica relativamente costante dell'AD, può variare da caso a caso, per cui non può essere considerata come un marker diagnostico affidabile.

La diagnosi anatomopatologica di AD si basa dunque sulla presenza di peculiari lesioni istologiche. I due principali tipi di lesione istologica sono la degenerazione neurofibrillare ("grovigli" neurofibrillari: Neurofibrillary Tangles: NFT) e le placche senili (Senile Plaques: SP) o amiloidee. La degenerazione neurofibrillare è costituita da masse di filamenti anormali aventi forma globosa o a fiamma, situate a livello del citoplasma intorno al nucleo del neurone e spesso si estendono fino ai prolungamenti cellulari.

I depositi intracellulari derivano dalla proteina tau, che è una proteina neuronale accessoria della tubulina che si lega ai microtubuli e normalmente aumenta la loro stabilità ma, in condizioni patologiche, a seguito di una iperfosforilazione, è rilasciata nel citosol dove può andare incontro ad aggregazione.

Le placche senili (SP) sono strutture di forma sferoidale; la composizione e configurazione delle SP varia a seconda del loro stadio di sviluppo: le placche "classiche" o "tipiche" sono costituite da un core centrale di sostanza amiloide, circondato da un alone chiaro intorno al quale ci sono prolungamenti neuronali rigonfi.

La sostanza amiloidea, componente essenziale delle SP, è costituita da peptidi di 40 amminoacidi, detti peptidi  $\beta$ -amiloidei 1-40 ( $A\beta$ 1-40); una frazione minore è costituita da peptidi  $\beta$ -amiloidei più lunghi di due amminoacidi (Ile e

Ala), A $\beta$ 1-42. Questi peptidi sono più idrofobici e particolarmente propensi all'autoaggregazione.

I peptidi  $\beta$ -amiloidei derivano dal taglio sequenziale di una proteina transmembrana, la proteina precursore amiloide (APP), da parte di due enzimi: la  $\beta$ - e la  $\gamma$ -secretasi.

Numerosi studi hanno, tuttavia, dimostrato che la  $\beta$ -amiloide, in forma solubile, viene rilasciata costitutivamente dalle cellule in condizioni normali; essa è stata, infatti, ritrovata nel fluido cerebrospinale e nel plasma di soggetti sani. Tuttavia, recentemente ha preso piede l'idea che la vera specie tossica sia rappresentata proprio dai piccoli aggregati oligomerici solubili, piuttosto che dalle grandi strutture fibrose [140, 141]. Sebbene le funzioni dell'APP e dei suoi derivati siano ancora da chiarire, studi su culture cellulari hanno reso possibile l'attribuzione a questi polipeptidi di molteplici ruoli potenziali. Indicazioni sempre più numerose suggeriscono che APP abbia una funzione neuroprotettiva e giochi un ruolo nella crescita dei neuriti, nella plasticità sinaptica e nell'adesione cellulare.

Per quanto riguarda i peptidi A $\beta$ , nonostante la loro attività citotossica a concentrazioni micromolari sia ormai appurata, per concentrazioni più basse, dell'ordine del picomolare e del nanomolare, diversi studi hanno rivelato un potenziale ruolo fisiologico correlato alla plasticità e alla sopravvivenza neuronale. L'incapacità dei neuroni di mantenere l'equilibrio omeostatico del Ca<sup>2+</sup>, rappresenta un aspetto della malattia che sembra strettamente collegato alla disfunzione e alla morte dei neuroni stessi. Secondo alcuni autori, i peptidi A $\beta$  potrebbero contribuire a questo malfunzionamento formando dei canali permeabili al Ca<sup>2+</sup> sulle membrane dei neuroni [142, 143]

L'eccesso intracellulare del Ca<sup>2+</sup> potrebbe spiegare anche l'attivazione di certe chinasi che possono contribuire all'iperfosforilazione e quindi all'aggregazione della proteina tau.

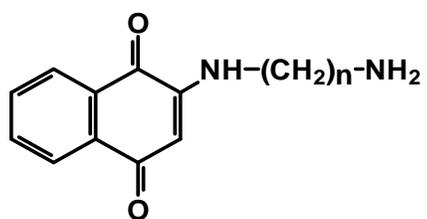
Oggi purtroppo non esistono farmaci in grado di fermare e far regredire la malattia e tutti i trattamenti disponibili puntano a contenerne i sintomi. Per alcuni pazienti, in cui la malattia è in uno stadio lieve o moderato, farmaci come

tacrina, rivastigmina e galantamina possono aiutare a limitare l'aggravarsi dei sintomi per alcuni mesi. Questi principi attivi agiscono da inibitori dell'acetilcolinesterasi, un enzima che metabolizza l'acetilcolina, il neurotrasmettitore carente nel cervello dei malati di Alzheimer. In questo modo si rende disponibile una quantità maggiore di neurotrasmettitore che porta a un miglioramento delle funzioni mnesiche.

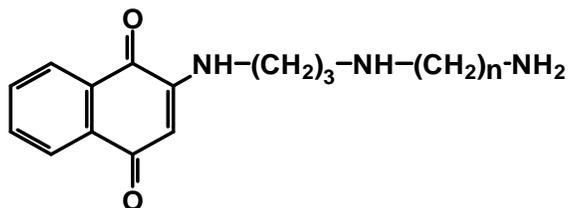
La messa a punto di nuovi farmaci per la demenza di Alzheimer è oggi un campo in grande sviluppo, nei laboratori di ricerca si sta lavorando a principi attivi che aiutino a prevenire, a rallentare la malattia e a ridurre i sintomi. Altra via di ricerca attiva è quella che punta sullo sviluppo di una risposta immunologica contro la malattia cercando di sviluppare un vaccino in grado di contenere la produzione di  $\beta$ -amiloide.

Recentemente è stato osservato che i benzochinoni e i naftochinoni hanno attività inibitoria nei confronti del processo di aggregazione dei peptidi A $\beta$ ; inoltre le poliammine riescono a legare ioni metallici, come  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , che svolgono un ruolo nel processo di autoaggregazione di A $\beta$  modulandone la formazione. Da queste evidenze deriva il razionale per la sintesi di molecole ibride che contenessero entrambe le funzioni.

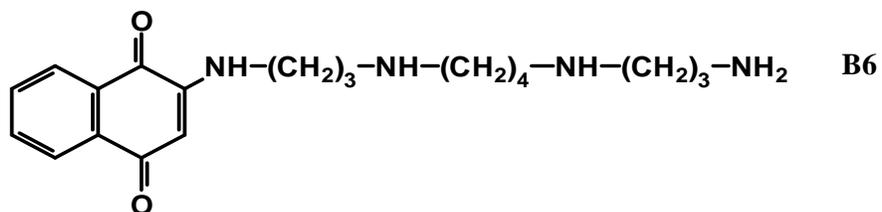
Così, i poliamminochinoni possono essere considerati come il punto di partenza dello sviluppo di una nuova classe di composti contro il morbo di Alzheimer.



**B7**  $n=7$   
**B1**  $n=8$   
**B2**  $n=9$   
**B3**  $n=10$



**B8**  $n=3$   
**B4**  $n=4$   
**B5**  $n=5$



**Fig. 5.1** Strutture dei poliamminochinoni studiati in questo lavoro.

## 5.2 SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di sviluppare un metodo per la caratterizzazione del legame di molecole a struttura poliamminochinonica, sviluppate nell'ambito di una ricerca sulla malattia di Alzheimer, alla sieralbumina umana (HSA).

La tecnica scelta è stata la biocromatografia, un particolare tipo di cromatografia liquida, che utilizza una colonna avente come fase stazionaria una proteina per valutare il legame a molecole di interesse biologico; tale studio viene condotto su un sistema HPLC, che presenta svariati vantaggi come la rapidità, la selettività e l'efficienza analitica.

La sieralbumina umana è stata immobilizzata covalentemente al supporto siliceo monolitico della colonna HPLC. La fase stazionaria così ottenuta è stata caratterizzata per confermare che la proteina immobilizzata mantenesse le proprietà di legame della proteina in soluzione e per verificare la possibilità di utilizzare il supporto monolitico al posto dei classici supporti impaccati.

Sono state eseguite delle prove con composti di riferimento per verificare il corretto funzionamento della colonna. A tale scopo sono state utilizzate miscele raceme di warfarin, oxazepam, N-benzoilleucina e ketoprofene, e sono stati calcolati i parametri caratteristici di una separazione cromatografica.

Infine sono stati effettuati studi sull'entità del legame dei poliamminochinoni all'HSA.

## 5.3 MATERIALE UTILIZZATO

Per la derivatizzazione della colonna è stata usata HSA, Human Serum Albumin, senza acidi grassi (purezza  $\geq 96\%$ ), acquistata da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

La colonna utilizzata è un prototipo di silice epoxy monolitico 50 x 4.6 mm gentilmente fornito dal Dr D. Lubda (Merck KGaA, LSP R&D MDA, Darmstadt, Germany).

Per la determinazione di selettività ed efficienza della colonna sono stati usati i seguenti campioni di riferimento:

- *rac*-warfarin
- *rac*-ketoprofene
- *rac*-N-benzoil leucina

Sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

- *rac*-oxazepam è stato gentilmente fornito dal Prof. Lucacchini, Facoltà di Farmacia, Università di Pisa.

Per la convalida del metodo sono stati utilizzati i campioni:

- paracetamolo
- furosemide
- fenilbutazone
- salicilato di sodio

Acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

- diazepam è stato gentilmente fornito dal Prof. Lucacchini, Facoltà di Farmacia, Università di Pisa

Per l'analisi frontale è stato usato L-triptofano (Sigma, Milano, Italia).

Per lo studio di legame all'HSA sono stati usati i seguenti campioni sintetizzati presso il laboratorio del prof. Melchiorre (Università degli studi di Bologna). (Fig.4)

- B1
- B2
- B3
- B4
- B5
- B6
- B7
- B8

Per le prove di competizione ai principali siti di legame di HSA sono stati utilizzati i seguenti campioni, acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia):

- ◆ salicilato di sodio (marker del sito I)
- ◆ ibuprofene (marker del sito II)
- ◆ acido valproico (marker del sito della bilirubina)

Per la preparazione dei tamponi sono stati utilizzati  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tutti acquistati da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia) e tutti di grado analitico.

Il solvente usato come modificatore organico e per la preparazione delle soluzioni è 1-propanolo, acquistato da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

L'acqua usata per preparare i tamponi è stata bidistillata mediante Sistema di Purificazione MILLI-RX20 (Millipore).

Quando non in uso, la colonna derivatizzata con HSA è stata lavata con tampone fosfato di potassio 67 mM, pH 7.4/1-propanolo 90:10 e conservata a 4°C.

### ***5.3.1 Strumentazione***

Il lavoro è stato eseguito mediante un sistema cromatografico costituito da una pompa Jasco (Tokio, Giappone) PU-980 Intelligent HPLC Pump, provvista di valvola di iniezione Rheodyne (modello 7161) con un loop da 20 $\mu$ l.

La rivelazione è stata ottenuta mediante uno spettrofotometro a fotodiodi Jasco MD-910 Multiwavelength Detector.

I risultati sono stati acquisiti mediante il programma Borwin-PDA (Jasco).

Per gli studi di dicroismo circolare è stato utilizzato uno spettropolarimetro JASCO J-810 (Tokio, Giappone) ed una cella di cammino ottico 1cm. Gli spettri sono stati acquisiti con Spectrum Measurement (Jasco) e analizzati col programma Spectra Analysis (Jasco).

## **5.4 DERIVATIZZAZIONE DI UNA COLONNA MONOLITICA DI SILICE EPOXY CON HSA**

La colonna utilizzata è una colonna Merck epoxy monolitica 50 x 0.46 mm.

La soluzione di albumina è stata preparata alla concentrazione di 10 mg/mL (30 mL) in tampone fosfato di potassio 50 mM, contenente (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M, pH 6.5.

L'immobilizzazione della proteina è stata ottenuta facendo passare una soluzione di albumina a ricircolo, per 24 ore, ad un flusso di 0.5 ml/min.

Sono stati fatti passare attraverso la colonna, in successione, 20 ml di tampone e 4 ml della soluzione di albumina a circuito aperto, poi il circuito è stato chiuso.

Durante la prima ora il senso circolatorio della soluzione attraverso la colonna è stato invertito ogni 15 min. Nelle 3 ore successive il senso è stato invertito ogni 30 min, quindi la soluzione di HSA è stata lasciata circolare per 24 ore, mantenendo la direzione di flusso equivalente alla direzione di utilizzo. A fine operazione, la colonna è stata lavata con 100 ml di tampone fosfato 50 mM pH 7, con un flusso di 1 ml/min. I gruppi epossidici che non hanno reagito con la

proteina, sono stati disattivati facendo passare a ricircolo 50 ml di una soluzione glicina 1 M in tampone fosfato 67mM pH 7.4.

## **5.5 ANALISI FRONTALE**

L'analisi frontale è stata effettuata per misurare la quantità di HSA immobilizzata correttamente.

L'analisi è stata eseguita utilizzando una serie di soluzioni di L-triptofano a concentrazione nota, secondo il metodo descritto da D. Hage [8].

### ***5.5.1 Soluzioni***

Lo studio è stato condotto utilizzando soluzioni di L-triptofano aventi concentrazioni pari 12.5-25-50-100  $\mu$ M.

Si è preparata una soluzione madre 100  $\mu$ M in tampone fosfato 67 mM pH 7.4, (PB) sciogliendo 2.04 mg di L-triptofano (PM=204.23) in 100 ml totali. Le altre soluzioni sono state preparate mediante diluizioni successive della madre.

### ***5.5.2 Condizioni cromatografiche***

L'analisi è stata condotta utilizzando la colonna epoxy kromasil 50 x 0.4 mm, 200 Å, 5  $\mu$ m derivatizzata con HSA, precedentemente descritta.

La fase mobile utilizzata era tampone fosfato 67 mM pH 7.4 (PB).

Il flusso è stato impostato a 0.25 ml/min e le letture sono state effettuate alla lunghezza d'onda  $\lambda = 280$  nm, corrispondente al massimo d'assorbimento del triptofano.

Tutte le analisi sono state condotte a temperatura ambiente, pari a circa 28 °C.

### ***5.5.3 Procedimento***

Le soluzioni di L-triptofano sono state fatte scorrere attraverso la colonna ed il

tempo di ritenzione è stato monitorato a partire dal pescante.

Poi è stato determinato il valore di  $t_0$ , cioè il tempo che l'analita ha impiegato ad attraversare il sistema escludendo la colonna. Per fare ciò la colonna è stata sostituita da una junction a volume zero ed è stata ripetuta la corsa della soluzione 100  $\mu$ M.

Prima dell'analisi e tra una corsa e l'altra è stato fatto passare attraverso la colonna fase mobile, fino alla stabilizzazione della linea di base.

## 5.6 CONTROLLO DELL'EFFICIENZA SEPARATIVA DELLA COLONNA

Per valutare l'enantioselettività e l'efficienza separativa della colonna sono stati iniettati una serie di campioni racemi di riferimento, noti legare enantioselettivamente l'HSA: *rac*-warfarin e *rac*-N-benzoil leucina per il sito I, *rac*-oxazepam e *rac*-ketoprofene per il sito II. Le prove sono state eseguite con il flusso di 1 ml/min e sono riassunte nella tabella seguente:

| CAMPIONE            | FM<br>(tampono fosfato 67 mM<br>pH 7.4/1-PrOH) |
|---------------------|--|
| <b>Oxazepam</b>     | 90:10  |
|                     | 92:8   |
|                     | 95:5   |
| <b>Warfarin</b>     | 90:10  |
|                     | 92:8   |
|                     | 95:5   |
| <b>Ketoprofene</b>  | 90:10  |
|                     | 92:8   |
|                     | 95:5   |
| <b>N-Bz leucina</b> | 92:8   |
|                     | 95:5   |

Le concentrazioni utilizzate per il *rac*-oxazepam, *rac*-warfarin e *rac*-ketoprofene sono di c.ca 0.01 mg/ml (soluzione 0.1 mg/ml in 1-PrOH diluito

1:10 in FM); mentre per la N-benzoil leucina di c.ca 0.005 mg/ml (soluzione 1 mg/ml in PrOH diluita 1:200 in FM).

Tutte le analisi sono state condotte a temperatura ambiente, pari a c.ca 28°C.

## **5.7 ANALISI DEL LEGAME DI UNA SERIE DI POLIAMMINOCHINONI ALL'HSA**

### ***5.7.1 Determinazione della percentuale di legame tramite biocromatografia***

La colonna derivatizzata e caratterizzata è stata infine utilizzata per studiare l'entità del legame dei poliamminochinoni alla proteina HSA.

Sono stati analizzati otto poliamminochinoni (B1-B8). Inoltre, al fine di controllare il buon funzionamento della colonna, sono stati aggiunti al protocollo sperimentale, alcuni farmaci dalle caratteristiche di legame note: paracetamolo, diazepam, furosemide, fenilbutazone, salicilato di sodio.

Tutte le soluzioni madri dei poliamminochinoni sono state preparate alla concentrazione di 1mM, ad eccezione del B6 che, per problemi di solubilità, è stato preparato 500µM in 1-propanolo e conservate al buio a 4°C.

Prima dell'analisi le soluzioni madri sono state diluite alla concentrazione di 10µM con tampone fosfato 67 mM pH 7.4.

Le analisi sono state condotte con un flusso di 1 ml/min e con fasi mobili composte da tampone fosfato 67 mM, pH 7.4 e 1-propanolo in diverse proporzioni.

Poiché questi farmaci sono caratterizzati da un'elevata percentuale di legame alla proteina, non è stato possibile valutare direttamente l'entità del legame in condizioni pseudofisiologiche (tampone fosfato 67 mM, pH 7.4). Perciò le analisi sono state condotte in presenza di percentuali crescenti di modificatore organico 1-propanolo (0-15%); è stato possibile condurre l'analisi in assenza di 1-propanolo solo nel caso di B7.

### ***5.7.2 Studi di competizione tramite dicroismo circolare***

La soluzione del complesso B3/HSA è stata ottenuta miscelando opportunamente una soluzione stock 1 mM di B3 in 1-propanolo ed una soluzione stock di HSA 500  $\mu$ M in tampone fosfato di potassio, pH 7.4, portando a volume con tampone fosfato di potassio, pH 7.4. E' stato registrato lo spettro di dicroismo circolare del complesso [B3]/[HSA] 2:1 (concentrazione HSA 30  $\mu$ M) nell'intervallo 250-425 nm con una cella cilindrica da CD con cammino ottico 1 cm (~3 ml di volume). Da questo spettro è stato ottenuto lo spettro di dicroismo circolare indotto, sottraendo il contributo dovuto all'albumina e al solvente. Il contributo della quota di B3 non legata ad HSA è stato considerato nullo, in quanto la molecola è achirale e pertanto non ha un spettro di dicroismo circolare proprio.

Al complesso [B3]/[HSA] 2:1 sono state quindi aggiunte aliquote di soluzioni stock di marker specifici dei principali siti di legame dell'albumina ed è stato monitorato l'effetto della presenza del competitore sullo spettro di dicroismo circolare indotto iniziale. I marker utilizzati sono stati: salicilato di sodio (stock 54 mM in 1-propanolo), ibuprofene (stock 54 mM in 1-propanolo) e valproato di sodio (stock 1,5 M in acqua), La variazione di volume dovuta all'aggiunta del competitore è stata considerata trascurabile.

## **5.8 VALUTAZIONE DELLA STABILITÀ DELLA COLONNA**

Al fine di verificare la stabilità della colonna all'usura e al tempo, alcune delle molecole utilizzate come riferimento durante lo studio biocromatografico dei poliamminochinoni (rac-warfarin, rac-oxazepam, rac-N-benzoilleucina e rac-ketoprofene), sono stati analizzati nuovamente, nelle stesse condizioni sperimentali, dopo circa 8 mesi e oltre 800 iniezioni. La percentuale di legame misurata è stata quindi confrontata con quella determinata con la colonna appena funzionalizzata.

## 5.9 RISULTATI E DISCUSSIONE

### *5.9.1 Caratterizzazione della colonna*

La colonna monolitica è stata derivatizzata covalentemente con la proteina HSA; nonostante i gruppi epossidici possano reagire con tutti i gruppi nucleofili presenti sulla proteina, nelle condizioni utilizzate si può ragionevolmente supporre che l'attacco nucleofilo avvenga principalmente sui gruppi  $\text{—NH}_2$  dei terminali amminici, e che il resto della proteina, non venga coinvolto nella reazione (fig 4.6). In tal modo l'operazione di immobilizzazione non varia le proprietà di legame della proteina. Questa assunzione è avvalorata dalla buona correlazione dei parametri di legame ottenuti per i composti di controllo con la colonna, quando confrontati con gli stessi parametri ottenuti studiando la proteina in soluzione.

Successivamente è stata stimata la quantità di HSA attiva immobilizzata sul supporto.

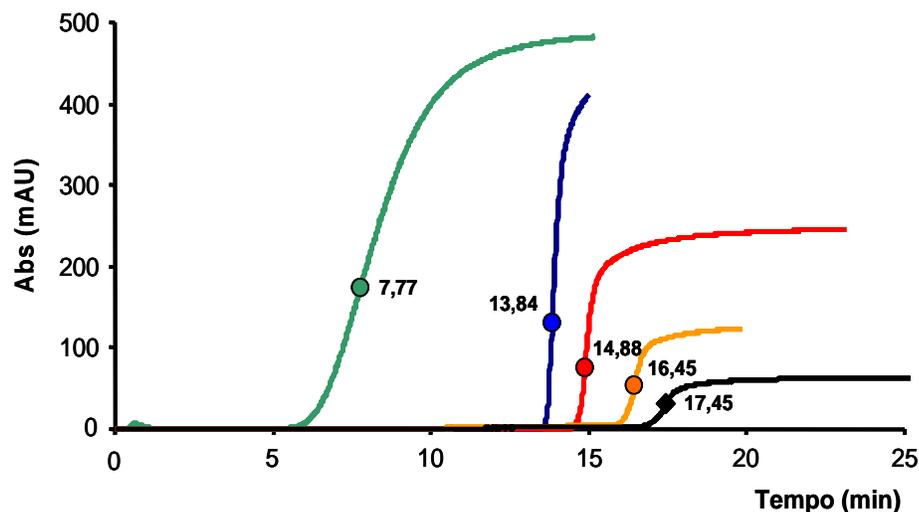
### *5.9.2 Titolazione dei siti di legame attivi*

La titolazione dei siti attivi dell'HSA immobilizzata al supporto siliceo è stata effettuata mediante analisi frontale.

Lo stesso metodo permette anche di calcolare la costante di affinità dell'interazione analita-ligando; questo rende tale analisi la tecnica di scelta per la caratterizzazione della colonna [8].

Per il nostro scopo è stato utilizzato L-Trp, vantaggioso perchè è noto legare un unico sito dell'HSA (sito II), e questo permette una più semplice analisi dei risultati: infatti in questo caso il numero di siti attivi sarà uguale al numero di molecole di albumina correttamente immobilizzate.

Con quest'analisi si ottengono dei caratteristici cromatogrammi di forma sigmoidale. (Fig 5.2).



**Fig.5.2** Curve di acquisizione ottenute dalle prove di analisi frontale eseguite con la colonna derivatizzata.

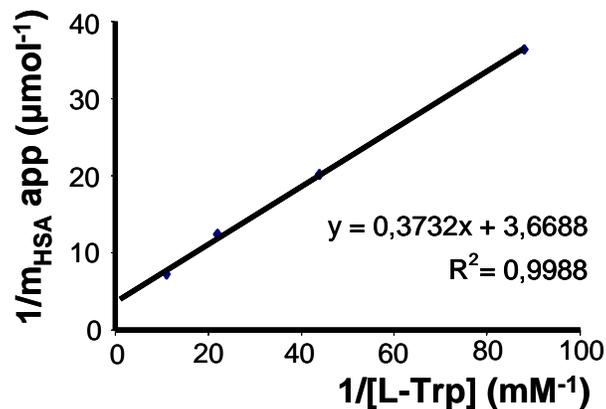
L'interpretazione dei risultati si è basata sul calcolo delle moli apparenti di HSA immobilizzata  $m_{\text{HSA app}}$ , dalle quali, secondo l'equazione 1.10, dipendono i fattori  $K_a$  e  $m_{\text{HSA}}$ .

Sapendo che

$$m_{\text{HSA app}} = V_{\text{eluizione}} [\text{L-Trp}]$$

è stato necessario ricavare dalle curve i tempi di ritenzione dell'analita alle varie concentrazioni; per fare ciò è stata calcolata la derivata prima delle curve sigmoidali acquisite, in modo da ottenere dei picchi, il cui valore massimo corrisponde al  $t_R$ . Lo stesso è stato fatto per ricavare il  $t_0$ ; per determinare tale valore è stata fatta fluire una soluzione di L-Triptofano a concentrazione  $100\mu\text{M}$ , dopo aver sostituito la colonna con una union a volume zero.

Successivamente è stato costruito un grafico avente alle ordinate il valore  $1/m_{\text{HSA app}}$  in funzione di  $1/[\text{L-Trp}]$ . Il risultato è una retta da cui è stato possibile calcolare il valore di  $K_A$  e di  $m_L$  (Fig.5.3).



**Fig.5.3** Grafico ottenuto dall'analisi frontale di L-Trp

La retta ottenuta ha mostrato un buon coefficiente di correlazione,  $R^2 = 0,9988$ . L'equazione della retta è:  $y = 0,3732x + 3,6688$ ; dall'inverso dell'intercetta è stato possibile quantificare i siti attivi di proteina immobilizzata all'interno della colonna, mentre il rapporto tra intercetta e pendenza della retta corrisponde alla costante di affinità.

Concludendo la quantità di HSA attiva che si è legata è pari a 18,1 mg, mentre la  $K_A$  di L-Trp ( $K_A = 9,8 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ) è risultata dello stesso ordine di grandezza di quella riportata in letteratura ( $K_A = 32 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  a 25°C) [8].

### 5.9.3 Controllo dell'efficienza separativa

La capacità separativa della colonna è stata verificata facendo una serie di test con campioni di riferimento noti legare l'albumina in maniera enantioselettiva.

Le soluzioni utilizzate sono state: *rac*-oxazepam, *rac*-warfarin, *rac*-ketoprofene, *rac*-N-benzoil leucina.

Le iniezioni dei composti sono state eseguite con diverse percentuali di modificatore organico aggiunto alla fase mobile: 5-8-10% di 1-propanolo. I risultati delle analisi con una fase mobile composta da tampone fosfato 67mM pH 7.4/1-PrOH 90:10 sono stati dei cromatogrammi con picchi molto stretti e separati alla linea di base tranne per il *rac*-ketoprofene.

Dai tempi di ritenzione ottenuti sono stati ricavati i parametri caratteristici delle separazioni cromatografiche che sono indicativi della qualità della colonna

Selettività, efficienza e risoluzione sono risultate buone ed hanno confermato l'affidabilità della colonna (Tab.5.1); perciò è stato possibile utilizzarla per lo studio biocromatografico delle interazioni della proteina HSA con i composti poliamminochinonici.

| CAMPIONE     | FM<br>(tampone fosfato 67 mM<br>pH 7.4/1-PrOH) | $k_1$ | $\alpha$ | $N_{eff1}$ | $N_{eff2}$ | $R_s$ |
|--------------|--|-------|----------|------------|------------|-------|
| Oxazepam     | 90:10  | 1,33  | 1,30     | 256,73     | 349,19     | 1,12  |
|              | 92:8   | 1,81  | 1,35     | 362,68     | 543,82     | 1,57  |
|              | 95:5   | 2,48  | 2,13     | 254,75     | 205,79     | 2,68  |
| Warfarin     | 90:10  | 1,68  | 1,77     | 254,96     | 200,59     | 2,06  |
|              | 92:8   | 2,89  | 1,84     | 243,27     | 118,45     | 1,80  |
|              | 95:5   | 7,61  | 2,24     | 162,35     | 81,85      | 1,90  |
| Ketoprofene  | 90:10  | 8,42  | 1,12     | 237,71     | 299,14     | 0,47  |
|              | 92:8   | 9,85  | 1,16     | 272,72     | 328,42     | 0,63  |
|              | 95:5   | 23,69 | 1,15     | 150,84     | 166,43     | 0,43  |
| N-Bz-Leucina | 92:8   | 1,22  | 2,45     | 320,59     | 581,89     | 4,60  |
|              | 95:5   | 2,53  | 1,81     | 270,53     | 142,53     | 1,91  |

**Tab.5.1** Dati di selettività e risoluzione ottenuti con la colonna derivatizzata; il flusso impiegato è di 1 ml/min.

#### ***5.9.4 Interazione dei poliamminochinoni con la sieralbumina umana***

Lo studio biocromatografico è stato condotto utilizzando la colonna con sieralbumina umana (HSA) immobilizzata, precedentemente caratterizzata. Sono stati analizzati otto poliamminochinoni (B1-B8, Fig. 5.1) per determinarne l'affinità relativa alla sieralbumina umana.

Sono state eseguite una serie di analisi in cui alla fase mobile venivano aggiunte quantità decrescenti di un modificatore organico, l'1-propanolo, per ridurre i tempi di ritenzione degli analiti.

Solamente il composto B7 è stato analizzato in condizioni pseudofisiologiche (tampone fosfato 67 mM pH 7.4), in quanto tutti gli altri composti sarebbero stati trattenuti eccessivamente in colonna.

L'analisi dei risultati è stata rivolta al calcolo della percentuale di farmaco legato alla proteina in assenza di modificatore organico.

Costruendo un grafico con i parametri cromatografici ottenuti, per ciascun farmaco (**Fig. 5.4**) è stato estrapolato il valore del coefficiente di capacità ( $k$ ) in assenza di modificatore organico e, tramite la relazione

$$B\% = \frac{k}{k+1} \cdot 100$$

si è ottenuta la percentuale di farmaco legato all'HSA ( $B\%_{\text{ext}}$ , tab. 4). Per uno dei composti, il B7, è stato possibile misurare direttamente il valore di  $k$  in assenza di modificatore organico ( $B\%_{\text{meas}}$ , tab.4). I risultati ottenuti con i composti di riferimento sono stati confrontati con i dati in letteratura.

Per il gruppo B1-B2-B3-B7, che presenta la stessa struttura in cui cambia solo la lunghezza della catena laterale (rispettivamente 8, 9, 10, 7 atomi di carbonio) è stato ottenuto un aumento dell'affinità all'aumentare della lunghezza della catena laterale. Inoltre, si è anche osservato che i quattro composti presentano la stessa variazione di affinità per la proteina al variare della concentrazione di propanolo (Fig. 5.4). Lo stesso fenomeno era stato osservato in precedenza nel caso degli inibitori della proteasi HIV (vedi). Inoltre, anche in questo caso, a basse percentuali di 1-propanolo l'andamento del grafico cambia, è nuovamente lineare ma con pendenza maggiore, come si può vedere al B7, l'unico per cui è stata effettuata un'analisi in assenza di modificatore organico.

Nel caso dei composti B4-B5-B8, è stato possibile analizzare il loro comportamento fino ad una percentuale di propanolo pari al 3%. In questo caso la dipendenza dell'affinità dalla lunghezza della catena laterale non è significativa. Come visto prima per gli analoghi senza il gruppo amminico secondario all'interno della catena laterale, i tre composti presentano profili simili della variazione dell'affinità in funzione della concentrazione di 1-propanolo. In questo caso, però l'affinità per la proteina sembra poco influenzata dalla presenza del solvente organico, infatti la loro affinità subisce solo una lieve diminuzione passando dal 3% al 10% di 1-propanolo.

Queste evidenze sperimentali suggeriscono che, nel caso dei composti con la funzione amminica secondaria nella catena laterale, l'interazione con HSA sia dovuta più a interazioni ioniche o a legami ad idrogeno piuttosto che a legami

idrofobici. Pertanto, anche il sito di legame di questi composti potrebbe essere diverso da quello dei composti B1-B2-B3-B7.

Un'altra importante osservazione che si può fare è che l'ordine relativo delle affinità delle molecole analizzate varia fortemente in funzione della concentrazione di propanolo nella fase mobile. Ad esempio compiendo l'analisi con il 10% di 1-propanolo nella fase mobile, il composto B5 mostra una percentuale di legame più alta rispetto al composto B3. Riducendo la concentrazione del propanolo al 5% l'ordine di affinità si inverte. La maggior parte dei lavori biocromatografici presenti in letteratura viene eseguita ad un'unica concentrazione di solvente organico. I risultati ottenuti con questo lavoro dimostrano che tale approccio è eccessivamente semplicistico e può portare ad errori di valutazione significativi. Ovviamente le condizioni ottimali di analisi sarebbero quelle in cui viene utilizzato solo tampone a pH fisiologico come fase mobile. Gli elevatissimi tempi di analisi che spesso sarebbero necessari, impongono però l'aggiunta di solventi che facilitino l'eluizione dei campioni. Il metodo impiegato in questo lavoro rappresenta un ottimo equilibrio tra la velocità di analisi e affidabilità dei risultati, in quanto permette di osservare differenze nei comportamenti di legame delle molecole analizzate. Anche con questo metodo, comunque, resta un certo grado di incertezza dovuto al fatto che la frazione legata viene generalmente calcolata per estrapolazione e non misurata. E' quindi auspicabile la messa a punto di metodi alternativi che permettano di eseguire questo tipo di analisi senza la necessità di utilizzare solventi organici, mantenendo comunque una buona rapidità di esecuzione.

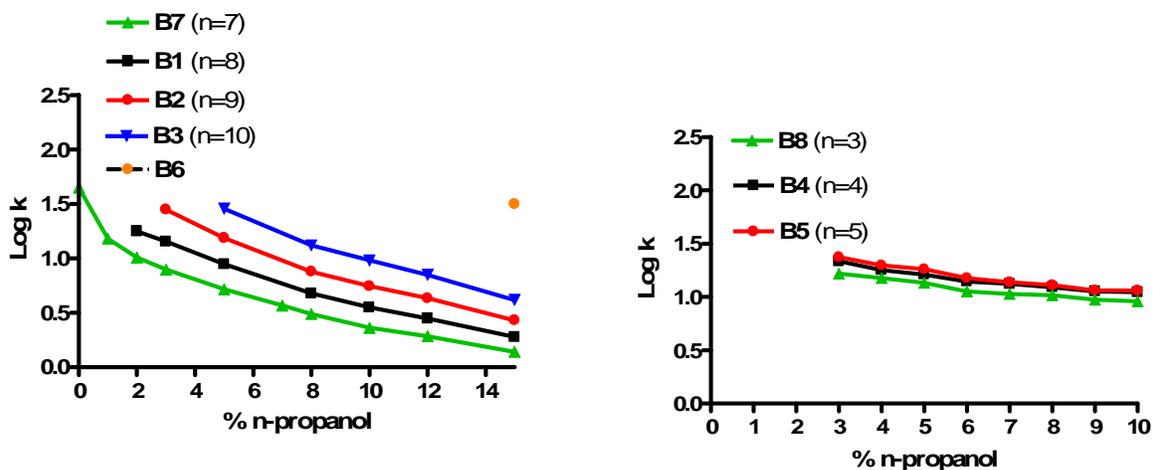


Fig.5.4 Andamento del valore di log k al variare della percentuale di 1-ProOH aggiunta alla fase mobile.

| CAMPIONE          | B% <sub>ext</sub> | B% <sub>meas</sub> | B% letteratura |
|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|
| Paracetamolo      | 15,1              | 15,8               | <20            |
| D-Benzoil Leucina | 77,2              | 81,9               | -              |
| L-Benzoil Leucina | 83,7              | 85,9               | -              |
| R-Ketoprofene     | 98,6              | -                  | 99,2±0,1       |
| S-Ketoprofene     | 99,1              | -                  | 99,2±0,1       |
| S-Oxazepam        | 92,4              | 94,2               | 98,8±1,8       |
| R-Oxazepam        | 85,9              | 90,0               | 98,8±1,8       |
| Diazepam          | 94,7              | 96,7               | 98,7±0,2       |
| S-Warfarin        | 99,1              | -                  | 99±1           |
| R-Warfarin        | 98,5              | -                  | 99±1           |
| Furosemide        | 97,4              | -                  | 98,8±0,2       |
| Fenilbutazone     | 98,6              | -                  | 96,1±1,1       |
| Acido salicilico  | 80,1              | 81,4               | 80-95          |

| SAMPLE | B% <sub>ext</sub> | B% <sub>meas</sub> |
|--------|-------------------|--------------------|
| B7     | 95,5              | 97,7               |
| B1     | 96,5              | -                  |
| B2     | 98,6              | -                  |
| B3     | 99,0              | -                  |
| B8     | 96,1              | -                  |
| B4     | 97,0              | -                  |
| B5     | 97,3              | -                  |
| B6     | >99               | -                  |

Tab.5.2 Valutazione del legame dei poliamminochinoni e dei campioni di riferimento all'HSA ricavate dalle prove di biocromatografia. Per i campioni di riferimento è riportato il confronto con la letteratura [144, 145].

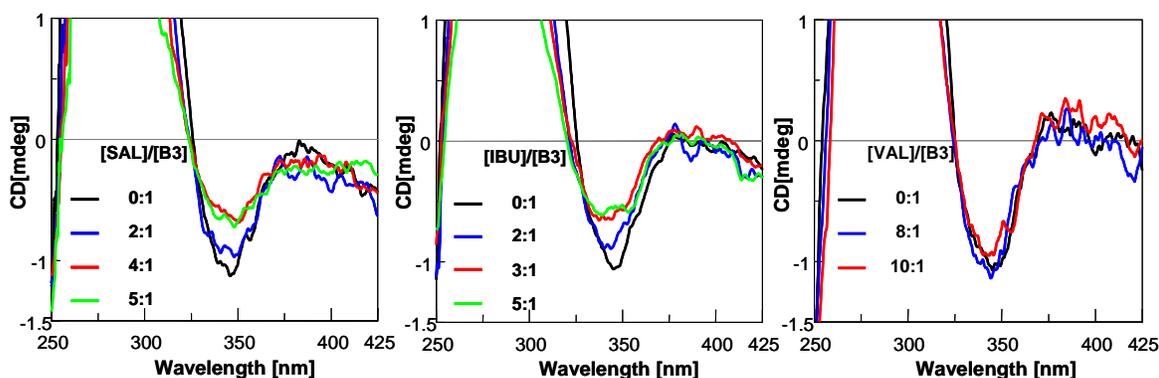
### ***5.9.5 Studi di competizione tramite dicroismo circolare***

Il segnale di dicroismo circolare indotto di un complesso tra una molecola achirale e una macromolecola chirale è attribuibile alla stabilizzazione di una delle possibili conformazioni che la molecola può assumere in soluzione, nel momento in cui si lega alla macromolecola. Di conseguenza il segnale CD che viene registrato permette di monitorare il complesso molecola-proteina senza bisogno di separarlo dalle frazioni non legate. La variazione di questo segnale nel momento in cui viene aggiunto un'altra molecola è lo specchio di un'interazione delle due molecole per il legame alla proteina.

La molecola B3 è stata scelta come rappresentativa della serie di poliamminochinoni, in quanto è quella che, ha mostrato una più alta affinità negli studi biocromatografici. In realtà la molecola più affine è risultata B6, ma la sua scarsa solubilità nei solventi compatibili con le misure spettroscopiche ne ha impedito l'impiego.

Il complesso B3/HSA mostra un debole segnale di dicroismo circolare indotto nel range 250-400 nm (Fig. 5.5). A questo complesso sono state aggiunte aliquote di competitori dal sito di legame per l'albumina noto, con lo scopo di scoprire se il B3 lega ad uno dei principali siti di legame di HSA. I competitori scelti sono stati il salicilato di sodio (SAL) come marker del sito I, l'ibuprofene (IBU), come marker del sito II e il valproato di sodio (VAL) come marker del sito della bilirubina. I competitori sono stati selezionati, oltre che per il loro legame specifico per un particolare sito di legame, anche perché non mostrano segnali di dicroismo circolare indotto nel intervallo di lunghezze d'onda indagato, rendendo così più semplice l'interpretazione dei risultati.

L'aggiunta di salicilato di sodio (SAL, marker del sito I dell'HSA), determina una riduzione del segnale proporzionale alla concentrazione di SAL fino ad un rapporto  $[SAL]/[B3]$  4:1 (Fig. 5.5). Ulteriori aggiunte di competitore non provocano variazioni e non si raggiunge un completo annullamento del segnale. Questo comportamento è riconducibile ad una interazione di tipo anticooperativo, in cui il legame del salicilato al sito I riduce l'affinità di B3 al proprio sito di legame (e viceversa). Il B3 ha quindi comportamento anticooperativo al sito I.



**Fig. 5.5** Esperimenti di competizione eseguiti sul complesso [B3]/[HSA] 2:1. HSA=30 $\mu$ M. Cella 1cm

Anche aggiungendo IBU si osserva un iniziale decremento del segnale CD indotto del complesso B3/HSA fino ad un rapporto [IBU]/[B3] 3:1 (Fig. 5.5), mentre ulteriori eccessi non provocano variazioni. Il B3 mostra quindi anticooperatività anche al sito II.

L'aggiunta di VAL, invece, non provoca variazioni significative del segnale CD indotto del complesso B3-HSA neanche arrivando ad eccessi [VAL]/[B3] 10:1 (Fig. 5.5). Pertanto, in base a questi risultati, il B3 lega ad un sito indipendente da quello della bilirubina.

### **5.9.6 Valutazione della stabilità della colonna**

Al fine di valutare l'attendibilità di risultati ottenuti utilizzando la colonna derivatizzata con HSA a distanza di tempo e dopo un uso estensivo, sono state analizzate una serie di molecole di riferimento che erano state precedentemente analizzate con la stessa colonna appena dopo la derivatizzazione.

Il confronto delle percentuali di legame ottenute con la colonna fresca e dopo un uso estensivo (più di 800 iniezioni eseguite in circa 8 mesi) è riportato nella tabella 5.3.

| CAMPIONE            | B% tempo 0 | B% dopo 8 mesi | Variazione assoluta |
|---------------------|------------|----------------|---------------------|
| D-N-Benzoil leucina | 81,9       | 79,4           | -2,5                |
| L-N-Benzoil leucina | 85,9       | 85,5           | -0,4                |
| R-ketoprofene       | 98,6*      | 97,9           | -0,7                |
| S-ketoprofene       | 99,1*      | 97,9           | -1,2                |
| S-oxazepam          | 94,2       | 93,0           | -1,2                |
| R-oxazepam          | 90,0       | 87,3           | -2,7                |
| S-warfarin          | 99,1*      | 98,8*          | -0,3                |
| R-warfarin          | 98,5*      | 98,1           | -0,4                |

Tab. 5.3 Variazione della percentuale di legame misurata di alcuni composti di riferimento analizzati a distanza di circa 8 mesi e a seguito di circa 800 iniezioni.

\* Valori ottenuti per estrapolazione dal grafico log k contro concentrazione di 1-propanolo

Da questa analisi risulta che, per i composti di riferimento utilizzati, c'è una perdita di capacità ritentiva della colonna in seguito all'uso e al tempo. La variazione media della frazione legata misurata è -1,2%. Tenendo conto solamente dei valori ottenuti per gli enantiomeri più affini di ciascuna coppia, la variazione scende a -0,8%. Questa piccola variazione dopo un uso estensivo della colonna e a distanza di molto tempo, dimostra che le condizioni di lavoro utilizzate mantengono la proteina funzionale e stabile ed inoltre che la colonna può essere impiegata per almeno 800 iniezioni e 8 mesi, senza mostrare variazioni significative dei risultati.

## 5.10 CONCLUSIONI

La colonna preparata è risultata efficiente nella risoluzione di farmaci noti legare enantioselettivamente l'HSA, per cui il metodo di immobilizzazione non ha modificato le proprietà di legame della proteina, e il supporto monolitico si è dimostrato adatto all'immobilizzazione della proteina.

Il metodo di determinazione della percentuale di legame mediante biocromatografia è stato convalidato mediante analisi di una serie di composti di

riferimento. I dati di legame di questi composti, ottenuti con il metodo biocromatografico, sono risultati in buon accordo con i dati di letteratura.

Le molecole in studio hanno mostrato un'elevata percentuale di legame all'albumina, superiore al 95%; in particolare il B6, che è stato eluito solo nelle condizioni più drastiche utilizzate (15% di propanolo). Il metodo di estrapolazione lineare utilizzato determina una sottostima della percentuale di legame, come si vede dal confronto del dato estrapolato da quello misurato in assenza di 1-propanolo del campione B7. Confrontando i dati ottenuti per estrapolazione, si nota una correlazione tra caratteristiche della catena laterale (lunghezza e numero di gruppi amminici) e la percentuale di legame.

Gli studi di competizione utilizzando il composto B3 come rappresentativo della serie hanno evidenziato un comportamento anticooperativo con siti I e II e un legame indipendente con il sito della bilirubina.

L'albumina immobilizzata sul supporto monolitico è rimasta stabile nelle condizioni utilizzate per oltre 8 mesi e 800 iniezioni, dimostrando l'affidabilità del metodo impiegato in questo studio e la stabilità del supporto cromatografico impiegato.

## **CAPITOLO 6**

# **SVILUPPO DI UN METODO HIGH-THROUGHPUT- SCREENING PER LA CARATTERIZZAZIONE DEL LEGAME DEI FARMACI ALLA HSA**



# **SVILUPPO DI UN METODO HIGH-THROUGHPUT-SCREENING PER LA CARATTERIZZAZIONE DEL LEGAME DEI FARMACI ALLA SIEROALBUMINA UMANA**

## **6.1 INTRODUZIONE**

Negli ultimi anni si è sviluppato un crescente interesse, sia da parte del mondo accademico che di quello dell'industria farmaceutica, nella messa a punto di strategie analitiche capaci di determinare le caratteristiche ADMET (assorbimento, distribuzione, metabolismo, escrezione, tossicità) dei farmaci in via di sviluppo, in maniera rapida ed affidabile. Questa tendenza origina dalla consapevolezza che circa la metà dei farmaci in via di sviluppo non possono essere immessi sul mercato a causa di problemi farmacocinetici e che, tra quelli che vengono commercializzati, almeno la metà presenta, comunque, qualche carenza dal punto di vista farmacocinetico [1].

In effetti, per quanto un farmaco possa essere attivo e specifico per un determinato target, non diventerà mai un farmaco se non viene ben assorbito, distribuito al sito d'azione, metabolizzato in maniera non troppo rapida, ne troppo lenta, e completamente eliminato. Inoltre, il farmaco e i suoi metaboliti non dovrebbero essere tossici per l'organismo.

Da queste argomentazioni, è chiaro come una rapida determinazione dei parametri ADMET in fasi precoci dello sviluppo del farmaco, porti ad un risparmio sia economico che di tempo, permettendo di focalizzare gli sforzi solo sulle molecole più promettenti e lasciando perdere quelle che, a causa di carenti proprietà farmacocinetiche, non diverranno mai farmaci.

## 6.2 SCOPO DEL LAVORO

La biocromatografia rappresenta un efficiente metodo per studiare l'interazione farmaco-proteina. Questo particolare tipo di cromatografia di affinità presuppone di immobilizzare la proteina su un supporto cromatografico, con una procedura che permetta di mantenerne inalterate le caratteristiche biologiche. In tal modo, dai parametri cromatografici è possibile caratterizzare l'interazione tra la proteina e il farmaco in studio (vedi Cap.2).

Nella maggior parte dei casi gli esperimenti biocromatografici vengono condotti in presenza di una certa quota di solvente organico nella fase mobile, con lo scopo ridurre i tempi di analisi che altrimenti risulterebbero troppo lunghi e incompatibili col sistema cromatografico. E' comunemente accettato che piccole concentrazioni di solvente organico nella fase mobile abbiano poco o nessun effetto sul legame dei farmaci alla sieralbumina umana [4, 11, 13, 106, 107] (o quantomeno che, confrontando molecole diverse, l'ordine di affinità relativo rimanga lo stesso) e che, pertanto, uno screening effettuato in presenza del solvente organico, permetta di ottenere risultati equivalenti allo stesso screening effettuato senza solvente organico. Questa assunzione è supportata anche da dati sperimentali ottenuti nell'ambito di questa tesi (vedi Cap.4 e Cap. 5), ma, come sottolineato nel Cap. 5, altri dati sperimentali, suggeriscono che, in alcuni casi, possa non essere verificata. Nel precedente lavoro (cap. 5) infatti, l'ordine di affinità di una serie di composti ottenuto col 10% di solvente organico nella fase mobile risultava diverso a quello ottenuto col 5%, e probabilmente quello in assenza di sovente organico, sarebbe risultato differente da entrambi. Come già sottolineato, il metodo che prevede di analizzare i campioni in diverse condizioni di fase mobile (Cap. 5), permette di riconoscere questi casi, ma necessita di tempi di analisi più lunghi per ottenere il risultato finale.

Lo scopo di questo lavoro era di sviluppare un metodo biocromatografico che permettesse di ottenere risultati affidabili in maniera rapida, e che permettesse di evitare l'uso del solvente organico.

L'idea è piuttosto semplice e si basa sull'utilizzo di una colonna di dimensioni ridotte (10 mm) al posto di una colonna di dimensioni standard (50-100 mm).

In teoria, dall'equazione 2.3, risulta che la percentuale di legame dipende esclusivamente dal coefficiente di capacità  $k$ . Questo termine è un parametro termodinamico che, in condizioni di equilibrio è indipendente dalla lunghezza della colonna impiegata. La lunghezza della colonna, invece influisce sul valore del  $t_0$ , pertanto, essendo  $k = (t_R - t_0)/t_0$ , (dove  $t_R$  rappresenta il tempo di ritenzione e  $t_0$  rappresenta il tempo di eluizione di una sostanza non ritenuta), riducendo il valore di  $t_0$  attraverso l'impiego di una colonna più corta, per far sì che il valore di  $k$  resti costante, è necessario che si riduca anche il valore di  $t_R$ . Il risultato è un minore tempo di ritenzione degli analiti, e quindi una riduzione dei tempi di analisi, mantenendo la stessa qualità dei risultati.

## 6.3 MATERIALE UTILIZZATO

Per la derivatizzazione della colonna è stata usata HSA, Human Serum Albumin, senza acidi grassi (purezza  $\geq 96\%$ ), acquistata da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

La colonna utilizzata è un prototipo di silice epoxy monolitico 10 x 4.6 mm gentilmente fornito dal Dr D. Lubda (Merck KGaA, LSP R&D MDA, Darmstadt, Germany).

Per la preparazione delle soluzioni sono stati utilizzati:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , tutti acquistati da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia) e tutti di grado analitico. L'acqua usata per preparare i tamponi è stata bidistillata mediante sistema di purificazione MILLI-RX20 (Millipore). I tamponi sono stati preparati quotidianamente e filtrati con filtro a cut-off 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore) prima dell'uso.

Per la determinazione di selettività ed efficienza della colonna sono stati usati: rac-warfarin, rac-N-benzoilleucina, che sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia), rac-oxazepam è stato ottenuto dal Prof. Lucacchini dell'Università di Pisa.

Per l'analisi frontale è stato usato L-triptofano acquistato da Sigma-Aldrich (Milano, Italia).

Per la messa a punto del metodo, la determinazione della percentuale di legame all'HSA e gli studi di spiazzamento sono stati usati i seguenti campioni: rac-oxazepam, nitrazepam, diazepam, flunitrazepam, N-ter-butylbenzodiazepina, clonazepam (forniti dal Prof. Antonio Lucacchini, Università di Pisa), rac-N-benzoilleucina, salicilato di sodio, furosemide, fenilbutazone e paracetamolo (acquistati da Sigma Aldrich); B7, B1, B8 (forniti dal Prof. Carlo Melchiorre, Università di Bologna), (fig. 5.1) mexiletina (BO1), BO2 e BO3 e tocinide (BO4), (forniti dalla Prof.ssa Corbo dell'Università di Bari), I1-I12 (forniti dal Dott. Arturo Battaglia, CNR, Bologna). La fase mobile utilizzata era costituita da tampone fosfato 67 mM, pH 7.4 (PB).

Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato o triplicato, valutando la ripetibilità dei dati.

Quando non in uso la colonna è stata lavata con una miscela di tampone fosfato di potassio 67 mM, pH 7.4/1-propanolo 90:10 e conservata in frigorifero a 4°C.

### ***6.3.1 Strumentazione***

Il lavoro è stato eseguito mediante un sistema cromatografico costituito da una pompa Jasco (Tokio, Giappone) PU-980 Intelligent HPLC Pump, provvista di valvola di iniezione Rheodyne (modello 7161) con un loop da 20µl.

La rivelazione è stata ottenuta mediante uno spettrofotometro a fotodiodi Jasco MD-910 Multiwavelength Detector. La costante di tempo del rivelatore è stata impostata su 100 msec.

## **6.4 DERIVATIZZAZIONE DI UNA COLONNA MONOLITICA DI SILICE EPOXY CON HSA**

La colonna utilizzata è una colonna Merck epoxy monolitica 10 x 4.6 mm.

La soluzione di albumina è stata preparata alla concentrazione di 10 mg/mL (15 mL) in tampone fosfato di potassio 50 mM, contenente  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1M, pH 6.5.

L'immobilizzazione della proteina è stata ottenuta facendo passare una soluzione di albumina a ricircolo, per 24 ore, ad un flusso di 0.5 ml/min.

Sono stati fatti passare attraverso la colonna, in successione, 20 ml di tampone e 4 ml della soluzione di albumina a circuito aperto, poi il circuito è stato chiuso.

Durante la prima ora il senso circolatorio della soluzione attraverso la colonna è stato invertito ogni 15 min. Nelle 3 ore successive il senso è stato invertito ogni 30 min, quindi la soluzione di HSA è stata lasciata circolare per 24 ore, mantenendo la direzione di flusso equivalente alla direzione di utilizzo. A fine operazione, la colonna è stata lavata con 100 ml di tampone fosfato 50 mM pH 7, con un flusso di 1 ml/min. I gruppi epossidici che non hanno reagito con la proteina, sono stati disattivati facendo passare a ricircolo 50 ml di una soluzione glicina 1 M in tampone fosfato 67mM pH 7.4.

## **6.5 ANALISI FRONTALE**

L'analisi frontale è stata effettuata per misurare la quantità di HSA immobilizzata correttamente.

L'analisi è stata eseguita utilizzando una serie di soluzioni di L-triptofano a concentrazione nota, secondo il metodo descritto da D.Hage [8].

### **6.5.1 Soluzioni**

Lo studio è stato condotto utilizzando soluzioni di L-triptofano aventi concentrazioni pari 1, 2.5, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ .

Si è preparata una soluzione stock 5 mM in tampone fosfato 67 mM pH 7.4, (PB). Le altre soluzioni sono state preparate mediante diluizioni della stock con PB.

### **6.5.2 Condizioni cromatografiche**

L'analisi è stata condotta utilizzando la colonna monolitica di silice epoxy 10 x 4.6 mm, derivatizzata con HSA, precedentemente descritta.

Il flusso è stato impostato a 0.25 ml/min e le letture sono state effettuate alla lunghezza d'onda  $\lambda = 280$  nm, corrispondente al massimo d'assorbimento del triptofano.

Tutte le analisi sono state condotte a temperatura ambiente, pari a circa 28-30 °C.

### **6.5.3 Procedimento**

Le soluzioni di L-triptofano sono state fatte scorrere attraverso la colonna ed il volume necessario a saturare i siti di legame presenti in colonna è stato monitorato a partire dal pescante.

Poi è stato determinato il valore di  $t_0$ , cioè il tempo che l'analita impiega ad attraversare il sistema escludendo la colonna. Per fare ciò la colonna è stata sostituita da una junction a volume zero ed è stata ripetuta la corsa della soluzione 20  $\mu\text{M}$ .

Prima dell'analisi e tra una corsa e l'altra la colonna è stata equilibrata con PB, fino a stabilizzazione della linea di base.

## 6.6 CONTROLLO DELL'EFFICIENZA SEPARATIVA DELLA COLONNA

### 6.6.1 Procedimento

Per valutare l'enantioselettività e l'efficienza separativa della colonna sono stati iniettati nel sistema cromatografico una serie di campioni racemi di riferimento, noti legare enantioselettivamente l'HSA: *rac*-warfarin e *rac*-N-benzoilleucina per il sito I e *rac*-oxazepam per il sito II. Le prove sono state eseguite utilizzando come fase mobile un tampone fosfato 67 mM, pH 7.4 (PB) con o senza l'aggiunta del 4% (v/v) di 1-propanolo, al flusso di 1 mL/min. Dalle soluzioni stock in 1-propanolo si sono ricavate varie soluzioni diluite in tampone fosfato 67 mM, pH 7.4.

Le concentrazioni utilizzate sono: *rac*-oxazepam (rivelazione a 228 nm) 10  $\mu$ M e 0,005 mg/mL, *rac*-warfarin (rivelazione a 308 nm) 0,02 mg/mL, *rac*-N-benzoilleucina (rivelazione a 228 nm) 0,0025 mg/mL.

Tutte le analisi sono state condotte alla temperatura ambiente (circa 28°C).

Dai tempi di ritenzione ottenuti sono stati calcolati i parametri caratteristici delle separazioni cromatografiche, indicativi della qualità della colonna: il coefficiente di selettività  $\alpha = k_2 / k_1 = (t_{R2} - t_M) / (t_{R1} - t_M)$ , con  $k_2 > k_1$  e la risoluzione,  $R_s = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_2 + w_1)$ .

## 6.7 STUDIO DELLA FRAZIONE LEGATA MISURATA AL VARIARE DEL FLUSSO DELLA FASE MOBILE

Per individuare la velocità di flusso ottimale, corrispondente ad un minimo tempo di eluizione, ma senza variazioni significative della percentuale di legame misurata, sono stati effettuati esperimenti biocromatografici su 9 composti aumentando di volta in volta solo questo parametro. I flussi utilizzati sono stati: 1 mL/min., 1,2 mL/min., 1,4 mL/min., 1,6 mL/min., 1,8 mL/min. e 2 mL/min.

I campioni utilizzati sono: fenilbutazone, nitrazepam, flunitrazepam, diazepam, furosemide, tocinide (BO1), BO2, BO3 e mexiletina (BO4). Le soluzioni degli analiti sono state ottenute da soluzioni stock da 1 a 3 mM in 1-Propanolo, diluite a 10  $\mu$ M con tampone fosfato 67 mM, pH 7.4.

La fase mobile impiegata utilizzata è tampone fosfato di potassio 67 mM, pH 7.4.

Gli esperimenti sono effettuati alla temperatura ambiente (circa 30°C). Ogni analita è stato iniettato in duplicato.

Dai parametri cromatografici è stato ottenuto il valore di  $k'$  e, tramite l'equazione 2.3 è stata determinata la frazione legata all'HSA.

## **6.8 HIGH-THROUGHPUT-SCREENING DI UNA SERIE DI MOLECOLE PER IL LEGAME ALL'HSA**

### ***6.8.1 Determinazione della percentuale di legame***

La colonna derivatizzata e caratterizzata è stata utilizzata per studiare l'entità del legame di diversi farmaci alla proteina HSA.

In totale, sono stati analizzati 17 potenziali farmaci, tra cui alcuni poliamminochinoni sviluppati per la terapia della malattia di Alzheimer (Cap.5), una serie di antitumorali di nuova generazione, alcuni derivati della tocinide e della mexiletina ad attività antiaritmica.

Al fine di controllare il buon funzionamento della colonna, inoltre, sono stati aggiunti al protocollo sperimentale 11 tra farmaci e molecole, dalla frazione legata all'HSA nota: paracetamolo, diazepam, furosemide, salicilato di sodio, nitrazepam, flunitrazepam, N-ter-butilbenzodiazepina, clonazepam, fenilbutazone, mexiletina (BO1), tocinide (BO4).

La fase mobile impiegata utilizzata è tampone fosfato di potassio 67 mM, pH 7.4.

Tutti gli analiti sono stati iniettati alla concentrazione di 10  $\mu$ M.

Le analisi sono state condotte ad un flusso di 2 mL/min a temperatura ambiente (circa 30°C).

Dai parametri cromatografici è stato ottenuto il valore di  $k'$  e, tramite l'equazione 2.3 è stata determinata la frazione legata all'HSA.

Ogni analita è stato iniettato in duplicato.

### ***6.8.2 Studi di competizione al sito I***

Gli studi di spiazzamento sono stati condotti ripetendo l'esperimento descritto nel paragrafo 6.8.1, aggiungendo alla fase mobile composta da tampone fosfato 67 mM, pH 7.4, concentrazioni note di salicilato di sodio (SAL).

Le concentrazioni di SAL impiegate sono state 25, 50 e 100  $\mu$ M

In questa serie di esperimenti, gli analiti sono stati iniettati ad una concentrazione di 20  $\mu$ M.

Lo studio è stato effettuato su i composti B7, B1, B8, BO2, BO3, I1, I2, I4, I6, I8, I9, I10, I11, I12.

La furosemide è stata utilizzata come controllo all'interno della serie di composti analizzati per verificare il buon funzionamento della colonna.

I restanti parametri sperimentali sono gli stessi descritti nel paragrafo 6.8.1.

### ***6.8.2 Stabilità della colonna***

Al fine di stabilire quante analisi era possibile eseguire sulla stessa colonna, senza perdere l'affidabilità dei risultati, lo stesso esperimento descritto al paragrafo 6.8.2 è stato ripetuto a intervalli regolari su alcune delle molecole utilizzate in questo lavoro ed è stata analizzata la variabilità delle percentuali di legame misurate nel corso del tempo.

## 6.9 RISULTATI E DISCUSSIONE

### *6.9.1 Caratterizzazione della colonna*

La colonna monolitica è stata derivatizzata covalentemente con la proteina HSA; nonostante i gruppi epossidici possano reagire con tutti i gruppi nucleofili presenti sulla proteina, nelle condizioni utilizzate si può ragionevolmente supporre che l'attacco nucleofilo avvenga principalmente sui gruppi  $\text{—NH}_2$  dei terminali amminici, e che il resto della proteina, non venga coinvolto nella reazione (fig 4.6). In tal modo l'operazione di immobilizzazione non varia le proprietà di legame della proteina. Questa assunzione è avvalorata dalla buona correlazione dei parametri di legame ottenuti per i composti di controllo con la colonna, quando confrontati con gli stessi parametri ottenuti studiando la proteina in soluzione.

Successivamente è stata stimata la quantità di HSA attiva immobilizzata sul supporto.

### *6.9.2 Titolazione dei siti di legame attivi*

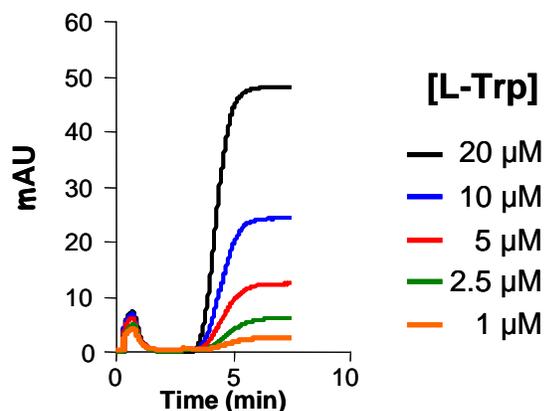
La titolazione dei siti attivi dell'HSA immobilizzata al supporto siliceo è stata effettuata mediante analisi frontale.

Lo stesso metodo permette anche di calcolare la costante di affinità dell'interazione analita-ligando; questo rende tale analisi la tecnica di scelta per la caratterizzazione della colonna [8].

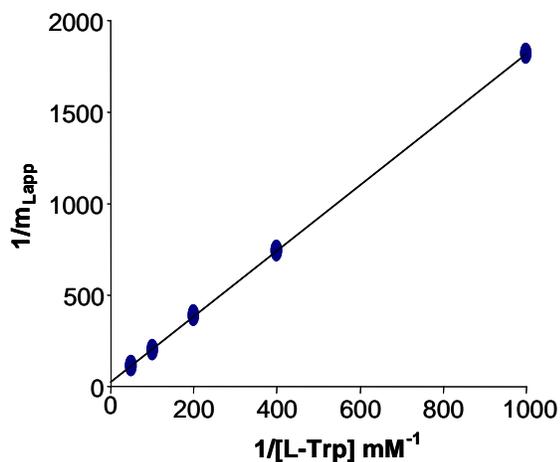
Per il nostro scopo è stato utilizzato L-Trp, vantaggioso perchè è noto legare un unico sito dell'HSA (sito II), e questo permette una più semplice analisi dei risultati: infatti in questo caso il numero di siti attivi sarà uguale al numero di molecole di albumina correttamente immobilizzate.

Con quest'analisi si ottengono dei caratteristici cromatogrammi di forma sigmoidale. (Fig 6.1). Determinando il punto di flesso di queste curve è possibile costruire un grafico (Fig. 6.2), la cui funzione è una retta descritta dall'equazione 2.5. Dall'equazione della retta interpolata è possibile calcolare le

moli di siti di legame per L-Trp presenti in colonna ( $m_L$ ) e la  $K_A$  di L-Trp per tali siti di legame.



**Fig. 6.1** Curve di acquisizione ottenute dalle prove di analisi frontale eseguite con la colonna monolitica 10 x 4.6 mm derivatizzata con HSA.



**Fig. 6.2** Grafico ottenuto dalle prove di analisi frontale eseguite con la colonna monolitica 10 x 4.6 mm derivatizzata con HSA (l'equazione della retta interpolata è:  $y = 1,7956x + 22,483$ ,  $r^2 = 1$ ).

Per cui, con una singola analisi si può valutare quanta HSA è stata immobilizzata in maniera corretta e confrontando il valore di  $K_A$  misurato con il

valore presente in letteratura, si può anche valutare l'affidabilità dei risultati ottenuti con la colonna.

Dall'analisi è risultato che sono stati immobilizzati correttamente 3,0 mg di HSA, quindi circa un quinto della quantità immobilizzata su una colonna dello stesso tipo lunga 50 mm (Cap. 5). La  $K_A$  di L-Trp è risultata  $1.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , un valore dello stesso ordine di grandezza di quelli riportati in letteratura [8, 14]; questo dato preliminare conferma la buona riuscita della procedura di immobilizzazione.

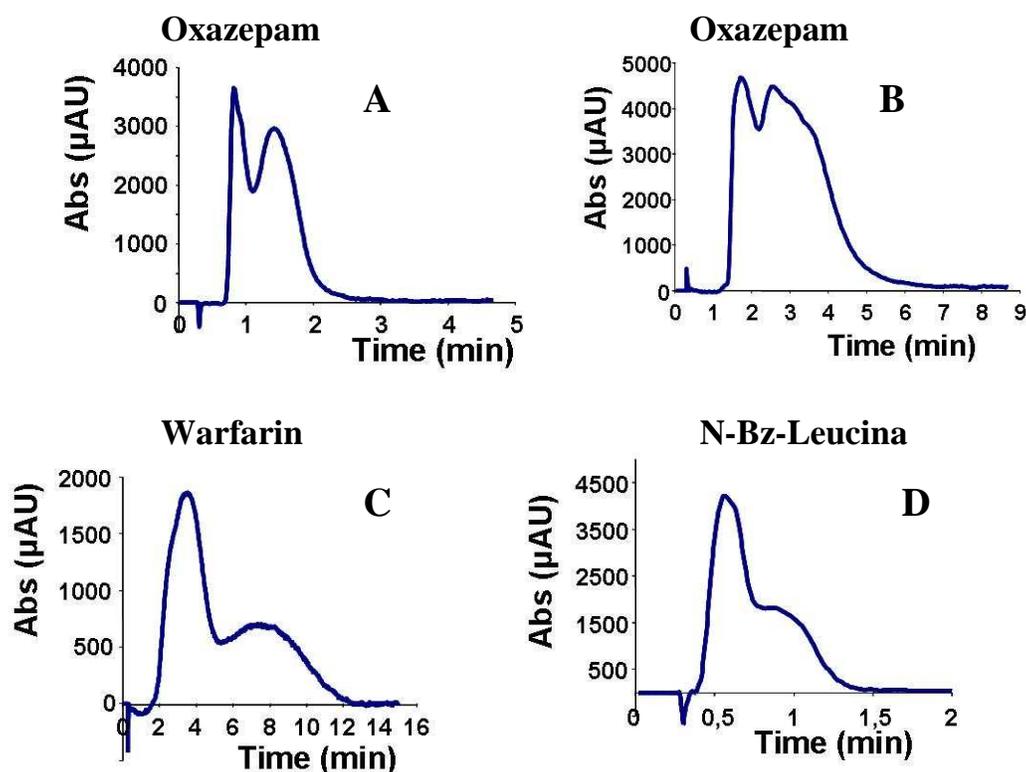
### ***6.9.3 Controllo dell'efficienza separativa della colonna***

La capacità separativa della colonna è stata verificata iniettando in colonna una serie di soluzioni racemiche di campioni di riferimento noti legate l'albumina in maniera enantioselettiva (Fig 6.3).

Come si può facilmente notare dai cromatogrammi e dai dati di risoluzione in tabella 6.1, dal punto di vista prettamente cromatografico, non sono stati ottenuti buoni risultati, infatti la separazione dei picchi cromatografici è piuttosto scarsa. Dal punto di vista biocromatografico, invece, i risultati ottenuti da questi esperimenti sono piuttosto confortanti.

|          | <i>Rac</i> -Oxazepam in<br>PB:1-PrOH 96:4 | <i>Rac</i> -Oxazepam in<br>PB | <i>Rac</i> -Warfarin in<br>PB:1-PrOH 96:4 | <i>Rac</i> -N-Bz-Leu in<br>PB:1-PrOH 96:4 |
|----------|---|-------------------------------|---|---|
| $\alpha$ | 2,13                                      | 1,60                          | 2,23                                      | 2,00                                      |
| $R_s$    | 0,80                                      | 0,35                          | 0,70                                      | 0,25                                      |

**Tab. 6.1** Parametri cromatografici delle separazioni ottenute con i racemi utilizzati come controllo



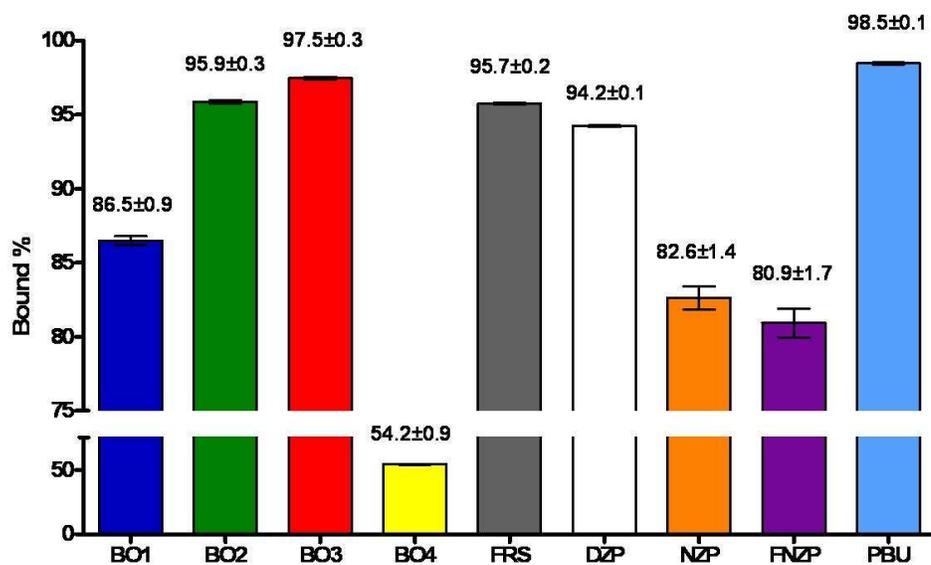
**Fig. 6.3** Controllo dell'enantioselettività della colonna. (A) *rac*-Oxazepam 0,005 mg/ml, analizzato con fase mobile PB/1-propanolo 96:4; (B) *rac*-Oxazepam 10  $\mu$ M, analizzato con fase mobile PB 100%; (C) *rac*-Warfarin 0,02 mg/ml, analizzato con fase mobile PB/1-propanolo 96:4; (D) *rac*-N-Benzoilleucina 0,0025 mg/ml, analizzato con fase mobile PB/1-propanolo 96:4

Infatti, l'enantioselettività, espressa dal parametro  $\alpha$ , è risultata alta per tutti i campioni esaminati; questo significa che l'HSA immobilizzata all'interno della colonna è capace di discriminare gli enantiomeri delle molecole iniettate, proprio come la proteina libera in soluzione e pertanto la colonna può essere utilizzata per gli studi successivi.

#### **6.9.4 Studio della frazione legata misurata al variare del flusso della fase mobile**

Al fine di ridurre al minimo i tempi di analisi, è stata approntata una serie di esperimenti per valutare quale fosse il flusso della fase mobile che consentisse il minore tempo di analisi, mantenendo una buona affidabilità dei risultati. I dati

ottenuti confermano che il valore del coefficiente di capacità (k), e quindi la percentuale di legame misurata, non sono influenzati in maniera significativa dal flusso, almeno fino a 2 mL/min (Fig. 6.4). Dai risultati degli esperimenti effettuati si è notato che passando da 1 a 2 mL/min, si ha pressappoco un dimezzamento dei tempi di analisi. Ad esempio il diazepam (Fig. 6.5), analizzato con un flusso di 1 mL/min necessita di circa 9-10 min per essere analizzato, mentre con un flusso di 2 mL/min sono sufficienti 5-6 min. L'utilizzo di flussi più elevati di 2 mL/min non sono stati presi in considerazione perché ci sarebbe stato il rischio di danneggiare la colonna, senza ottenere grossi vantaggi in termini di tempi di analisi. Pertanto, per gli esperimenti successivi è stato selezionato il flusso di 2 mL/min.



**Fig. 6.4** Dati di percentuale di legame alla HSA ottenuti utilizzando flussi di 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 e 2 mL/ min (media ± SD) . BO1, mexiletina; BO4, tocinide; FRS, furosemide; DZP, diazepam; NZP, nitrazepam; FNZP, flunitrazepam; PBU, fenilbutazone.

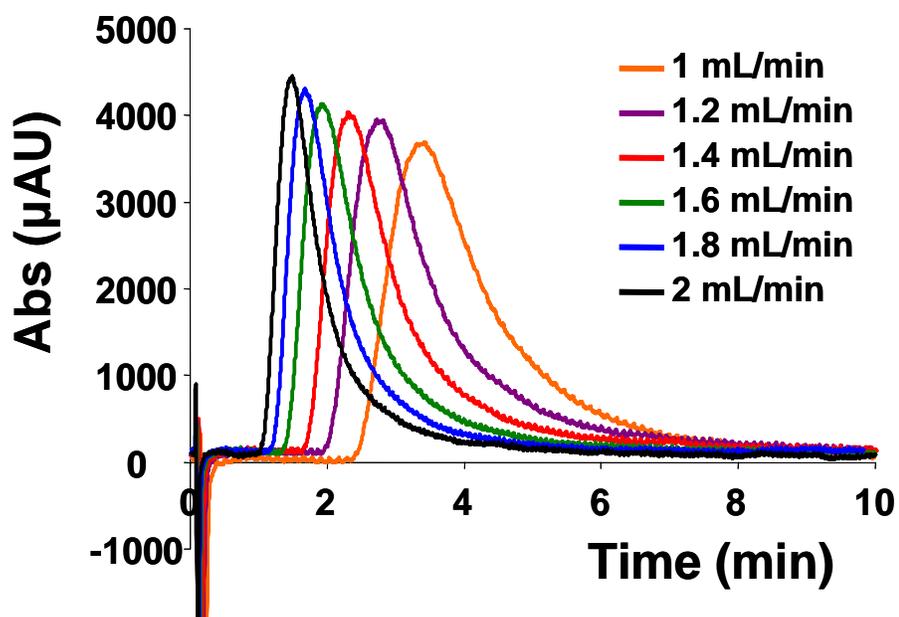


Fig. 6.5 Cromatogrammi ottenuti analizzando una soluzione di diazepam 10  $\mu$ M a flussi compresi tra 1 e 2 mL/min, utilizzando come fase mobile tampone fosfato 67 mM, pH 7.4.

### 6.9.5 High-throughput-screening di una serie di molecole per il legame all'HSA

La determinazione della frazione legata delle 28 molecole selezionate per questo studio è stato effettuato in un'unica giornata (circa 8 ore), iniettando ciascuna molecola in duplicato. Per una miglior analisi dei risultati, i dati ottenuti sono stati confrontati, oltre che con i dati presenti in letteratura, anche con i risultati ottenuti con la colonna descritta nel cap. 5 (Tab. 6.2). Tale colonna differisce da quella utilizzata in questo studio solamente per la lunghezza (50 mm, anziché 10 mm), pertanto il confronto dei dati ottenuti con queste due colonne permette di valutare le variazioni dovute all'uso di una colonna così corta, isolandole da quelle insite nel metodo biocromatografico. Il confronto tra i cromatogrammi ottenuti per il diazepam utilizzando le due colonne è riportato in fig. 6.6 a titolo esemplificativo. Come si può facilmente notare, la colonna da 10 mm permette di eseguire l'analisi in molto meno tempo; infatti, l'analisi condotta con la colonna da 50 mm richiede circa 50-60 minuti di tempo, mentre, a parità di flusso (1mL/min), l'analisi effettuata con la colonna da 10 mm richiede solamente 10 minuti. Il tempo d'analisi si riduce ulteriormente a 5-6

min se il flusso viene raddoppiato (Fig. 6.6), mentre il dato di frazione legata resta approssimativamente lo stesso (Tab. 6.2).

La stessa osservazione può essere estesa a tutte le sostanze analizzate di cui erano disponibili i dati relativi alla colonna da 50 mm, per cui viene dimostrato il sostanziale vantaggio derivante dall'uso di una colonna così corta.

In realtà, si è notato che l'analisi, quando eseguita su molecole poco affini alla HSA, come il paracetamolo, tende a dare sovrastime, anche piuttosto importanti. Anche l'analisi compiuta su mexiletina e tocinide ha mostrato lo stesso problema. Questo comportamento è dovuto al fatto che sostanze con percentuali di legame molto basse, hanno tempi di ritenzione molto vicini al  $t_0$  (nel caso di questa colonna il  $t_0 = 0.08$  min, ed una sostanza con una frazione legata del 60% avrebbe un tempo di ritenzione di 0.2 min), per cui il loro segnale si sovrappone parzialmente a quello dell'iniezione, riducendo l'accuratezza della misura. Inoltre, lavorando in un intervallo di tempi così corto, piccoli errori nella misura dei tempi da parte del sistema cromatografico si trasformano in grandi variazioni della percentuale di legame misurata. Questo effetto si riduce all'aumento della frazione legata alla proteina. Infine, una fonte importante di errore è insita nel metodo di misura della frazione legata; infatti, osservando l'equazione 2.3, si può notare che sostanze caratterizzate da percentuali di legame alla HSA relativamente basse (< del 80%), escono con tempi di ritenzione molto simili. Ad esempio, con la colonna utilizzata in questo lavoro, due sostanze con una frazione legata del 20% e 60%, hanno dei tempi di ritenzione di 0.1 e 0.2 min, rispettivamente. Anche questa fonte di errore si riduce all'aumentare della percentuale di legame: per esempio una molecola con una frazione legata del 95% ha un tempo di ritenzione di 1,6 min, mentre una con il 96% di frazione legata ha un tempo di ritenzione di 2 min.

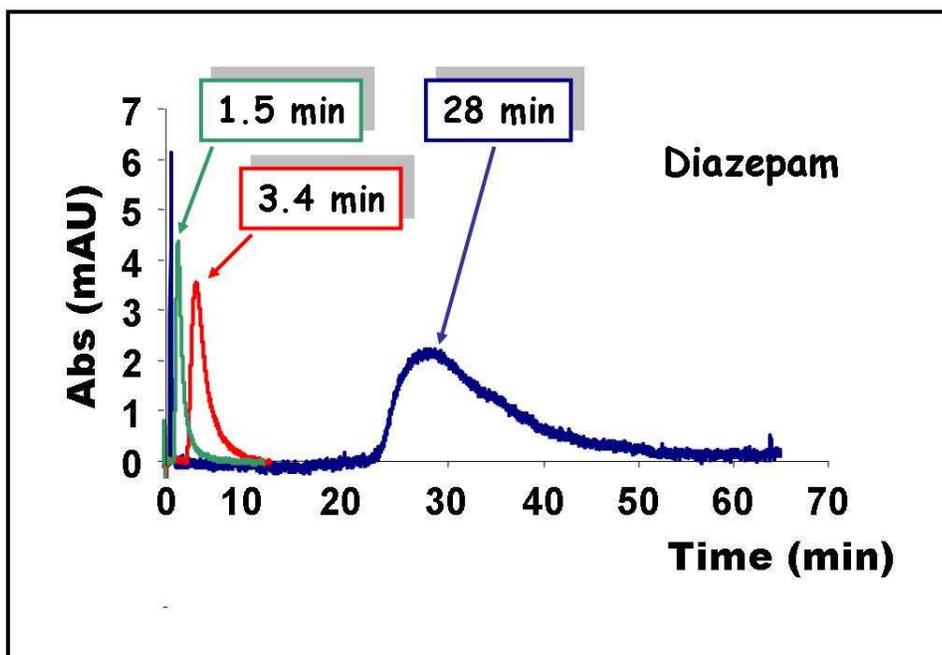
Riassumendo, questo sistema di analisi diventa sempre più accurato man mano che le percentuali di legame degli analiti aumentano. Questo è il grosso vantaggio che ha la biocromatografia rispetto ai metodi classici come ad esempio la dialisi all'equilibrio, dove il trend è esattamente l'opposto.

Infatti è più importante poter distinguere tra valori molto vicini quando le frazioni legate sono molto alte, cioè quando le frazioni libere, quelle capaci di raggiungere il target, sono molto piccole.

| CAMPIONE      | t <sub>R</sub> 1cm | k 1cm  | B% 1cm | B% 5cm | B% letteratura <sup>A</sup> |
|---------------|--------------------|--------|--------|--------|-----------------------------|
| B7            | 2,306              | 27,82  | 96,5   | 97,7   | -                           |
| B1            | 4,020              | 49,25  | 98,0   | 96,5*  | -                           |
| B8            | 6,070              | 74,88  | 98,7   | 98,6*  | -                           |
| I1            | 1,749              | 20,86  | 95,4   | 95,3   | -                           |
| I2            | 13,614             | 169,18 | 99,4   | 98,4*  | -                           |
| I3            | 0,190              | 1,38   | 57,9   | 41,5   | -                           |
| I4            | 0,558              | 5,98   | 85,7   | 83,8   | -                           |
| I5            | 0,175              | 1,18   | 54,2   | 55,4   | -                           |
| I6            | 1,116              | 12,95  | 92,8   | 92,1   | -                           |
| I7            | 1,252              | 14,65  | 93,6   | 93,3   | -                           |
| I8            | 4,960              | 61,00  | 98,4   | 97,4*  | -                           |
| I9            | 2,545              | 30,81  | 96,9   | 95,0*  | -                           |
| I10           | 13,967             | 173,59 | 99,4   | 98,9*  | -                           |
| I11           | 2,093              | 25,16  | 96,2   | 96,1   | -                           |
| I12           | 1,605              | 19,06  | 95,0   | 95,0   | -                           |
| DIAZEPAM      | 1,372              | 16,14  | 94,5   | 96,7   | 98.7±0.2 <sup>B</sup>       |
| NTBUBDZ       | 4,196              | 51,44  | 98,1   | -      | -                           |
| NITRAZEPAM    | 0,539              | 5,73   | 85,1   | -      | 87±1 <sup>B</sup>           |
| FNZP          | 0,470              | 4,88   | 83,0   | -      | 77-79 <sup>B</sup>          |
| CLONAZEPAM    | 0,657              | 7,21   | 87,8   | -      | 86±0.5 <sup>B</sup>         |
| A. SALICILICO | 0,328              | 3,10   | 75,6   | 81,4   | 80-95 <sup>B</sup>          |
| FUROSEMIDE    | 2,395              | 28,94  | 96,7   | 97,4*  | 98.8±0.2 <sup>B</sup>       |
| MEXILETINA    | 0,564              | 6,05   | 85,8   | -      | 63±15 <sup>C</sup>          |
| BO2           | 1,625              | 19,31  | 95,1   | -      | -                           |
| BO3           | 2,285              | 27,56  | 96,5   | -      | -                           |
| TOCAINIDE     | 0,223              | 1,788  | 64,1   | -      | 10±15 <sup>B</sup>          |
| FENILBUTAZONE | 6,237              | 60,60  | 98,4   | 98,6*  | 96.1±1.1 <sup>B</sup>       |
| PARACETAMOLO  | 0,142              | 0,78   | 43,7   | 15,8   | <20 <sup>C</sup>            |

**Tab. 6.2** Risultati ottenuti con la colonna da 10 mm paragonati con quelli di una colonna da 50 mm e con quelli in letteratura. <sup>A</sup> In plasma intero; <sup>B</sup> [144]; <sup>C</sup> [145];

\* Dato estrapolato.



**Fig. 6.6** Confronto dei cromatogrammi relativi all'analisi del diazepam, ottenuti con le colonne da 10 mm e da 50 mm. Colonna 50 mm, flusso 1 ml/min (blu); colonna 10 mm, flusso 1 ml/min (rosso); colonna 10 x 4.6, flusso 2 ml/min (verde). Nei fumetti sono indicati i relativi tempi di ritenzione.

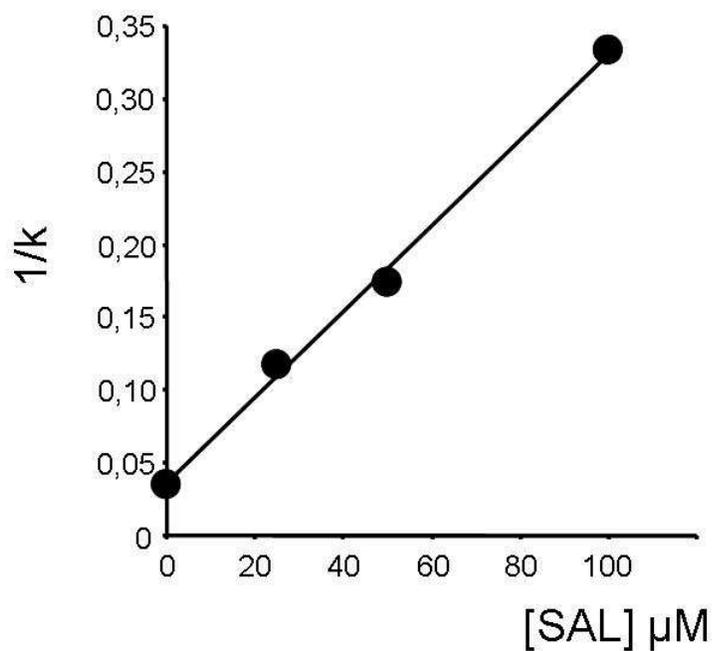
Ad esempio se due molecole hanno una frazione legata del 99% e del 98%, rispettivamente, significa che la frazione libera del secondo è il doppio di quella del primo, mentre se il primo ha una frazione legata del 80%, per avere la stessa variazione in termini di frazione libera, il secondo deve averla del 60%.

In ogni caso, la colonna da 50 mm si è dimostrata più affidabile nel determinare frazioni legate piccole, rispetto a quella da 10 mm. Inoltre, anche senza l'uso di solventi organici all'interno della fase mobile, la colonna da 50 mm consente analisi molto rapide (< 15 min per analisi) nel caso di molecole con una percentuale di legame  $\leq 90\%$ . Per questi motivi, si potrebbe proporre l'uso della colonna da 10 mm come metodo di studio per effettuare screening rapidi di grandi librerie di molecole; successivamente, se necessario, le molecole che mostrano una percentuale di legame  $\leq 90\%$  con tale colonna, possono essere analizzate nuovamente con la colonna da 50 mm per meglio distinguere le differenze tra molecole con scarsa affinità per la HSA.

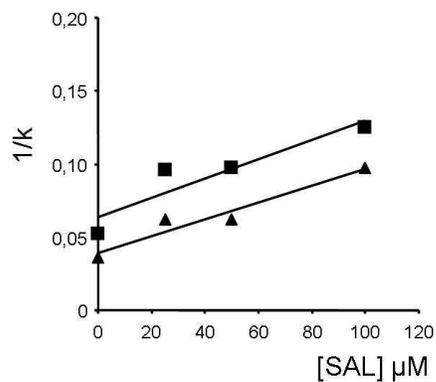
### **6.9.6 Studio di competizione al sito I**

Una volta appurata l'affidabilità della colonna per effettuare screening rapidi per l'affinità di legame alla HSA, è stato approntato uno studio di competizione per verificare se una colonna così corta, consentisse anche questo tipo di applicazione. Inoltre, visto che molte delle molecole utilizzate in questo studio non erano mai state caratterizzate per il loro legame alla HSA prima d'ora, era interessante verificare se legassero ad uno dei principali siti di legame presenti sulla proteina. La furosemide è stata selezionata come controllo interno ed è stata analizzata durante tutte le sessioni sperimentali insieme alle altre molecole. Questo diuretico è noto legare alla HSA, al sito I, pertanto, effettuando uno studio di competizione con salicilato (SAL, marker del sito I), se la colonna si fosse mantenuta affidabile, doveva venire evidenziata una competizione diretta.

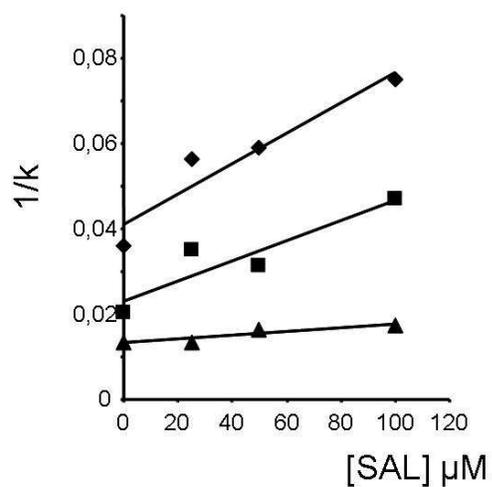
I risultati dell'esperimento di spiazzamento della furosemide con il SAL sono riportati nella figura 6.7. La furosemide ha effettivamente mostrato di essere spiazzata con una competizione diretta dal SAL. Inoltre applicando l'equazione 2.4 alla retta ottenuta per interpolazione dei dati, si ottiene un valore di  $K_A$  del SAL per il sito di legame della furosemide di  $8.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , un valore dello stesso ordine di grandezza di quello del SAL per il sito I,  $1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  [14]. Pertanto, grazie a questa evidenza sperimentale, si può considerare che la colonna abbia mantenuto l'affidabilità dei risultati durante tutto il corso degli esperimenti di competizione e quindi anche i risultati ottenuti per le altre molecole possono essere considerati validi. Bisogna ricordare comunque che il modello utilizzato per l'interpretazione dei dati descrive l'interazione di due molecole, aventi un unico sito di legame ad alta affinità, per lo stesso sito. In tutti i casi in cui si hanno composti che legano a più di un sito e/o interazioni allosteriche, il modello diventa insufficiente a descrivere esattamente il fenomeno, e lascia quindi un più ampio margine di errore nell'interpretazione del dato.



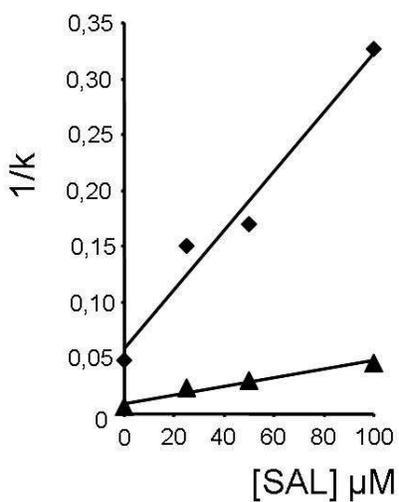
**Fig. 6.7** Grafico relativo alla competizione tra furosemide e salicilato. L'equazione della retta interpolata è  $y = 0.0029x + 0.0358$ ,  $r^2 = 0.9967$



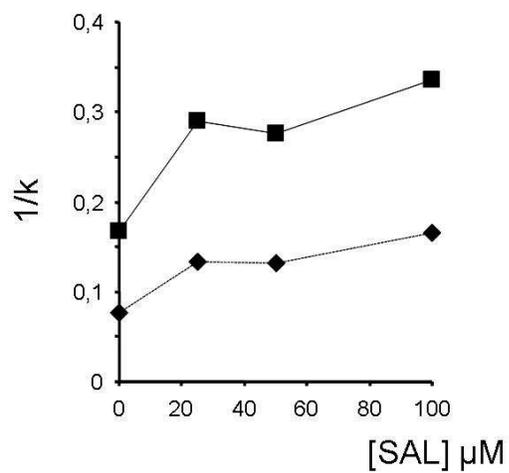
**Fig 6.8** Studio di competizione tra salicilato e: BO2 ( ■ ), BO3( ▲ ). Le equazioni delle rette interpolate sono  $y = 0.0007x + 0.0637$   $r^2 = 0.8541$  per BO2 e  $y = 0.0006x + 0.0394$   $r^2 = 0.9384$  per BO3



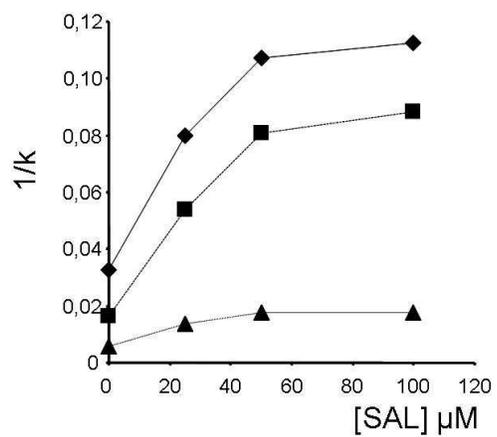
**Fig 6.9** Studio di competizione tra salicilato e: B7 (◆), B1 (■), B8 (▲). Le equazioni delle rette interpolate sono  $y = 0.0004x + 0.041$   $r^2 = 0.9085$  per B7,  $y = 0.0002x + 0.0231$   $r^2 = 0.8407$  per B1 e  $y = 0.00004x + 0.0132$   $r^2 = 0.8573$  per B8.



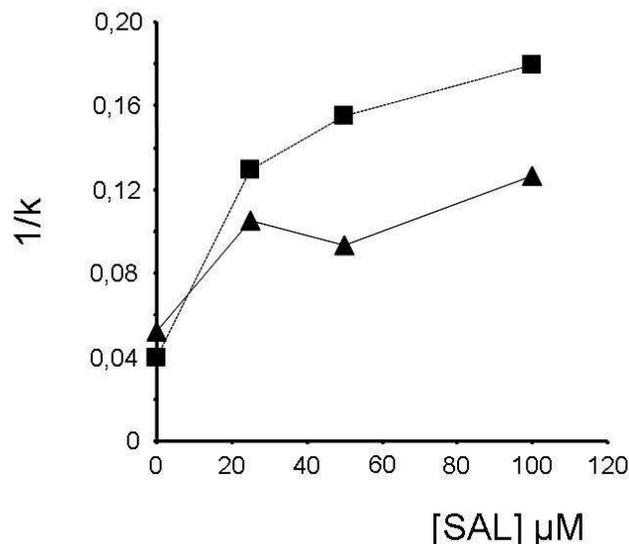
**Fig 6.10** Studio di competizione tra salicilato e: I1 (◆) I2 (▲). Le equazioni delle rette interpolate sono  $y = 0.0027x + 0.0577$   $r^2 = 0.9681$  per I1 e  $y = 0.0004x + 0.0094$   $r^2 = 0.9622$  per I2.



**Fig 6.11** Studio di competizione tra salicilato e: I4 ( ■ ), I6 ( ◆ ).



**Fig 6.12** Studio di competizione tra salicilato e: I8 ( ■ ), I9 ( ◆ ), I10 ( ▲ ).



**Fig 6.13** Studio di competizione tra salicilato e: I11 ( ■ ), I12 ( ▲ ).

Dall'analisi dei risultati emerge che la presenza del salicilato influenza, in maniera più o meno significativa, il legame alla sieralbumina umana di tutti i composti analizzati.

I composti BO2 e BO3 (Fig. 6.8) mostrano una riduzione del valore di  $k$  proporzionale alla concentrazione di salicilato presente nella fase mobile. Tuttavia, i valori di  $K_A$  del salicilato calcolato tramite l'equazione 2.4 risultano  $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  e  $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  per BO2 e BO3, rispettivamente, cioè circa un'ordine di grandezza inferiore a quello del salicilato per il sito I. Pertanto questi composti mostrano un legame di tipo anticooperativo per il sito I.

Anche i composti B7 e B1 (Fig.6.9) mostrano una riduzione del valore di  $k$  proporzionale alla concentrazione del salicilato. I valori di  $K_A$  del SAL calcolato tramite l'equazione 2.4, risultano  $8.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  per B7 e B1, rispettivamente, pertanto un ordine di grandezza inferiori a quello del salicilato per il proprio sito di legame. L'entità dell'effetto anticooperativo è quindi molto simile per questi due composti. Il legame del composto B8 (Fig. 6.9), invece, resta pressoché inalterato dalla presenza del competitore ed infatti, la  $K_A$  calcolata per il salicilato risulta  $3.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , cioè due ordini di grandezza inferiore a quella del salicilato per il sito I. Questa similitudine di

comportamento tra B7 e B1 era già stata osservata in altri esperimenti in cui veniva variata la concentrazione di un solvente organico nella fase mobile (cap. 5). Anche in quel caso il composto B8 mostrava un comportamento diverso dagli altri due composti. Queste evidenze rafforzano l'idea che i composti B7 e B1 (e gli altri analoghi della serie) possano legare lo stesso sito (o gli stessi siti) sulla proteina, mentre il composto B8 (e gli altri analoghi della serie) possano legare ad un sito diverso. In ogni caso, sembra che il sito I non sia il sito di legame principale per nessuno di questi composti e che il sito di legame del composto B8 sia indipendente da tale sito.

I composti I1 e I2 (Fig. 6.10) mostrano un profilo di competizione proporzionale alla concentrazione del salicilato. Il loro comportamento è comunque ambiguo. La  $K_A$  del salicilato calcolata tramite l'equazione 2.4 per questi due composti risulta  $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  e  $4.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , per I1 e I2, rispettivamente, un valore inferiore di circa 4 volte da quello del salicilato per il sito I. Questo suggerisce che queste molecole possano legare ad un sito molto vicino e strettamente connesso a quello del salicilato, ma non esattamente allo stesso sito. Considerando la complessità della struttura del sito I (Cap. 1), è possibile che queste molecole leghino ad un sottosito del sito I diverso da quello del salicilato, per cui il loro legame viene fortemente influenzato dalla presenza del competitore, ma la  $K_A$  del salicilato calcolata tramite l'equazione 2.4, che non tiene conto di questi effetti (Cap. 2), risulta leggermente inferiore a quella del salicilato per il proprio sito di legame.

L'affinità di legame dei composti I4, I6 (fig. 6.11) e I12 (Fig. 6.13) per l'albumina è ridotto dalla presenza del salicilato, ma la competizione è di scarsa entità e non proporzionale alla concentrazione del competitore. Effettuando comunque una correlazione lineare tra i valori nel grafico (non mostrato nelle figure) ed applicando l'equazione 2.4, si ottengono valori di  $K_A$  del salicilato di un ordine di grandezza inferiore a quello del salicilato per il sito I ( $7.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ,  $8.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  e  $9.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ , per I4, I6 e I12 rispettivamente). Questi composti presentano quindi un comportamento anticooperativo al sito I.

I composti I8, I9, I10 (Fig. 6.12) e I11 (Fig. 6.13) mostrano un comportamento di competizione diretta analogo a quello mostrato dai composti I1 e I2 fino ad una concentrazione di salicilato di  $50 \mu\text{M}$ , mentre un ulteriore

aumento della concentrazione di competitore non sembra avere effetti significativi sull'affinità dei tre composti per la proteina. Applicando l'equazione 2.4 sulla porzione lineare del grafico (non mostrato nelle figure), si ottengono valori di  $K_A$  del salicilato di  $4.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $7.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ,  $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  e  $4.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  per I8, I9, I10, I11, rispettivamente, valori molto vicini a quelli del salicilato per il sito I, anche se inferiori. Questo comportamento ha una stretta analogia con quello osservato per i composti I1 e I2 ed è pertanto compatibile con una competizione diretta al sito I. Ciononostante, l'ulteriore incremento di salicilato nella fase mobile non riduce l'affinità di questi composti per la proteina come accadeva per i composti I1 e I2. In questo caso, quindi, si può supporre un modello più complesso, in cui questi composti abbiano più di un sito di legame dei quali uno è rappresentato dal sito I.

### ***6.9.7 Stabilità della colonna***

Le percentuali di legame misurate a intervalli regolari sono riassunte nella tabella 6.3.

Come si può notare, si ha una perdita continua di capacità ritentiva da parte della colonna con l'uso. È da sottolineare che la colonna è stata sottoposta ad un uso intensivo quotidiano ed inoltre è stata utilizzata per eseguire studi di competizione, in cui grandi volumi di soluzioni di molecole affini alla proteina, vengono fatte passare in continuo attraverso la colonna. Ciononostante, osservando la colonna in cui è stato riportato il ranking relativo, si può notare che l'ordine di affinità all'interno della libreria di composti analizzata resta pressoché invariato, ad eccezione di piccole variazioni tra molecole con percentuali di legame molto simili. Pertanto la colonna utilizzata in questo lavoro può essere utilizzata in condizioni sperimentali stressanti per almeno 900 iniezioni per eseguire rapidi ranking di librerie di composti per quanto concerne la loro frazione legata alla proteina. Inoltre, inserendo all'interno della libreria alcune molecole dalla percentuale di legame nota è anche possibile stimare il valore assoluto della frazione legata, anche dopo che la colonna ha iniziato a perdere capacità ritentiva.

| A       |      |         | B       |      |         | C       |      |         |
|---------|------|---------|---------|------|---------|---------|------|---------|
| Cmpd    | B%   | Ranking | Cmpd    | B%   | Ranking | Cmpd    | B%   | Ranking |
| B7      | 96,5 | 9       | B7      | 92,6 | 9       | B7      | 84,4 | 10      |
| B1      | 98,0 | 6       | B1      | 95,8 | 6       | B1      | 89,8 | 6       |
| B8      | 98,7 | 3       | B8      | 98,1 | 3       | B8      | 95,5 | 3       |
| I1      | 95,4 | 12      | I1      | 90,8 | 11      | I1      | 82,8 | 11      |
| I2      | 99,4 | 2       | I2      | 98,6 | 2       | I2      | 97,1 | 2       |
| I4      | 85,7 | 18      | I4      | 80,6 | 17      | I4      | 55,1 | 20      |
| I6      | 92,8 | 16      | I6      | 84,7 | 16      | I6      | 68,4 | 16      |
| I8      | 98,4 | 4       | I8      | 96,8 | 4       | I8      | 92,8 | 4       |
| I9      | 96,9 | 7       | I9      | 94,5 | 7       | I9      | 89,0 | 7       |
| I10     | 99,4 | 1       | I10     | 98,9 | 1       | I10     | 97,8 | 1       |
| I11     | 96,2 | 11      | I11     | 91,2 | 10      | I11     | 85,9 | 9       |
| I12     | 95,0 | 14      | PTX     | 88,1 | 14      | PTX     | 78,2 | 13      |
| DZP     | 94,2 | 15      | DZP     | 87,4 | 15      | DZP     | 77,6 | 15      |
| NtBuBDZ | 98,1 | 5       | NtBuBDZ | 96,1 | 5       | NtBuBDZ | 92,5 | 5       |
| NZP     | 85,1 | 19      | NZP     | 72,3 | 19      | NZP     | 64,0 | 18      |
| FNZP    | 83,0 | 20      | FNZP    | 67,3 | 20      | FNZP    | 56,3 | 19      |
| CZP     | 87,8 | 17      | CZP     | 77,4 | 18      | CZP     | 66,2 | 17      |
| SAL     | 75,6 | 21      | SAL     | 56,4 | 21      | SAL     | 47,4 | 21      |
| FRS     | 96,7 | 8       | FRS     | 93,5 | 8       | FRS     | 87,4 | 8       |
| BO2     | 95,1 | 13      | BO2     | 88,9 | 13      | BO2     | 79,6 | 12      |
| BO3     | 96,5 | 10      | BO3     | 90,2 | 12      | BO3     | 77,7 | 14      |

**Tab.6.3** Percentuale di legame determinata tramite colonna da 10 mm derivatizzata con HSA effettuata ad intervalli regolari e ranking relativo in ordine di affinità; fase mobile tampone fosfato di potassio 67 mM, pH 7.4 (A) dopo circa 450 iniezioni; (B) dopo circa 600 iniezioni; (C) dopo circa 900 iniezioni.

## 6.10 CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata dimostrata la possibilità di utilizzare una colonna derivatizzata con HSA di dimensioni ridotte, per lo screening rapido di librerie di molecole per quanto riguarda la loro percentuale di legame alla proteina. Il metodo sviluppato, se automatizzato, permette di analizzare, in duplicato, almeno 50 composti in 24 ore, senza ricorrere all'uso di solventi organici. Inoltre la colonna si è dimostrata affidabile anche per eseguire studi di competizione. Infine, pur perdendo capacità ritentiva, la colonna ha dimostrato di mantenere inalterata la capacità di distinguere le affinità relative, per cui l'ordine di affinità ottenuto è rimasto costante durante gli esperimenti di screening, per oltre 900 analisi.

Il metodo sviluppato può quindi realisticamente essere applicato come routine durante lo sviluppo del farmaco, su grandi librerie di composti, trasformando la tecnica biocromatografica da medium- a high-throughput-screening.

# BIBLIOGRAFIA

1. Hodgson J. ADMET-turning chemicals into drugs. *Nat. Biotech.* 2001;**19**:722-726.
2. Domenici E, Bertucci C, Salvadori P, Felix G, Cahagne I, Montellier S, Wainer IW. Synthesis and chromatographic properties of an HPLC chiral stationary phase based upon human serum albumin. *Chromatographia* 1990;**29**:170-176.
3. Domenici E, Bertucci C, Salvadori P, Motellier S, Wainer IW. Immobilized serum albumin: rapid HPLC probe of stereoselective protein-binding interactions. *Chirality* 1990;**2**:263-268.
4. Noctor TA, Diaz-Perez MJ, Wainer IW. Use of a human serum albumin-based stationary phase for high-performance liquid chromatography as a tool for the rapid determination of drug-plasma protein binding. *J. Pharm. Sci.* 1993;**82**:675-676.
5. Hage DS. High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding. *J. Chrom. B* 2002;**768**:3-30.
6. Ascoli GA, Domenici E, Bertucci C. Drug binding to human serum albumin: abridged review of results obtained with high-performance liquid chromatography and circular dichroism. *Chirality* 2006;**18**:667-679.
7. Aubry AF, Markoglou N, Descorps V, Wainer IW, Felix G. Evaluation of a chiral stationary phase based on mixed immobilized proteins. *J. Chrom. A* 1994;**685**:1-6.
8. Yang J, Hage DS. Role of binding capacity versus binding strength in the separation of chiral compounds on protein-based high-performance liquid chromatography columns. Interactions of D- and L-tryptophan with human serum albumin. *J. Chrom. A* 1996;**725**:273-285.
9. Cimitan S, Lindgren MT; Bertucci C; Danielson UH. Early absorption and distribution analysis of antitumor and anti-AIDS drugs: lipid membrane and plasma protein interactions. *J. Med. Chem.* 2005;**48**:3536-3546.
10. Schön A, del Mar Ingaramo M, Freire E. The binding of HIV-1 protease inhibitors to human serum proteins. *Biophys. Chem.* 2003;**105**:221-230.
11. Massolini G, Aubry AF, McGann A, Wainer IW. Determination of the magnitude and enantioselectivity of ligand binding to rat and rabbit serum albumins using immobilized-protein high performance liquid chromatography stationary phases. *Biochem. Pharm.* 1993;**46**:1285-1293.
12. Aubry AF, Markoglou N, McGann A. Comparison of drug binding interactions on human, rat and rabbit serum albumin using high performance displacement chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* 1995;**112C**:257-266.
13. Fitos I, Visy J, Simonyi M. Species-dependency in chiral drug recognition of serum albumin studied by chromatographic methods. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2002;**54**:71-84.

14. T. Jr. Peters, All About Albumin: biochemistry, genetics and medical application. Ed. Academic Press, New York, 1996.
15. Kragh-Hansen U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Dan. Med. Bull.* 1990;**37**:57-84.
16. Halliwell B. Albumin – an important extracellular antioxidant?. *Biochem. Pharmacol.* 1988;**37**:569-571.
17. Behrens PQ, Spiekerman AM, Brown JR. Structure of serum albumin. *Fed. Proc.* 1975;**34**:591-.
18. Meloun B, Morávek L, Kostka V. Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett.* 1975;**58**:134-137.
19. Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang WJ, Dennison OE, Hawkins JW, Beattie WG, Dugaiczky A. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J. Biol. Chem.* 1986;**261**:6747-6757.
20. Hughes WL. The proteins of blood plasma. In “The proteins” (Neurath H, Baley K eds), Vol. IIB, pp. 663-754. Academic Press, New York, 1954.
21. Longsworth LG, Jacobsen CF. An electrophoretic study of the binding of salt ions by  $\beta$ -lactoglobulin and bovine serum albumin. *J. Phys. Colloid Chem.* 1949;**53**:126-135.
22. Zhang RM, Snyder GH. Dependence of formation of small disulfide loops in two-cysteine peptides on the number and types of intervening amino acids. *J. Biol. Chem.* 1989;**264**:18472-18479.
23. Squire PG, Moser P, O’Konski CT. The hydrodynamic properties of bovine serum albumin monomer and dimer. *Biochemistry* 1968;**7**:4261-4271.
24. Bendedouch D, Chen SH. Structure and interparticle interactions of bovine serum albumin in solution studied by small angle neutron scattering. *J. Phys. Chem.* 1983;**87**:1473-1477.
25. Carter DC, Ho JX. Structure of serum albumin. *Adv. Protein. Chem.* 1994;**45**:153-204.
26. Weber G. Energetics of ligand binding to proteins. *Adv. Protein. Chem.* 1975;**29**:1-83
27. Hvidt A, Wallevik K. Conformational changes in human serum albumin as revealed by hydrogen-deuterium exchange studies. *J. Biol. Chem.* 1972;**247**:1530-1535.
28. Willumnsen L. Hydrogen isotope exchange in the study of protein conformation. A quantitative test of an exchange mechanism. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg.* 1971;**38**:223-295.
29. Rachinsky MR, Foster JF. The salting-out behavior of bovine plasma albumin; further evidence for configurational isomerization. *Arch. Biochem. Biophys.* 1957;**70**:283-285.
30. Sogami M, Petersen HA, Foster JF. The microheterogeneity of plasma albumins. V. Permutations in disulfide pairings as a probable source of microheterogeneity in bovine albumin. *Biochemistry* 1969;**8**:49-58.

31. Era S, Kuwata K, Sogami M, Kato K, Watari H. Circular dichroic and <sup>1</sup>H-NMR on the aged form of bovine plasma albumin. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1991;**38**:260-266.
32. Mach H, Middaugh CR, Lewis RV. Statistical determination of the average values of the extinction coefficients of tryptophan and tyrosine in proteins. *Anal. Biochem.* 1992;**260**:74-80.
33. Steinhardt J, Stocker N. Effect of high pH and sodium dodecyl sulphate on the hidden tyrosines of human serum albumin. *Biochemistry* 1973;**12**:1789-1797.
34. Herskovits TT, Laskowski M Jr. Location of chromophoric residues in proteins by solvent perturbation. I. Tyrosyls in serum albumins. *J. Biol. Chem.* 1962;**237**:2481-2492.
35. Rosenheck K, Doty P. The far ultraviolet absorption spectra of polypeptide and protein solutions and their dependence on conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1961;**47**:1775-1785.
36. Bocedi A, Notari S, Narciso P, Bolli A, Fasano M, Ascenzi P. Binding of anti-HIV drugs to human serum albumin. *IUBMB Life* 2004;**56**:609-614.
37. Ascenzi P, Bocedi A, Notari S, Menegatti E, Fasano M. Heme impairs allosterically drug binding to human serum albumin Sudlow's site I. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2005;**334**:481-486.
38. Bocedi A, Notari S, Menegatti E, Fanali G, Fasano M. Allosteric modulation of anti-HIV drug and ferric heme binding to human serum albumin. *FEBS J.* 2005;**272**:6287-6296.
39. Sreerama N and Woody RW. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 2000;**287**:252-260. <http://lamar.colostate.edu/sreeram/CDPro>
40. Konowal A, Snatzke G, Alebic-Kolbah T, Kajfez F, Rendic S, Sunjic V. General approach to chiroptical characterization of binding of prochiral and chiral 1,4-benzodiazepin-2-ones to human serum albumin. *Biochem. Pharmacol.* 1979;**28**:3109-3113.
41. Alebic-Kolbah T, Kajfez F, Rendic S, Sunjic V, Konowal A, Snatzke G. Circular dichroism and gel filtration study of binding of prochiral and chiral 1,4-benzodiazepin-2-ones to human serum albumin. *Biochem. Pharmacol.* 1979;**28**:2457-2464.
42. Bertucci C, Domenici E, Salvadori P. Stereochemical features of 1,4-benzodiazepin-2-ones bound to human serum albumin: difference circular dichroism and UV studies. *Chirality* 1990;**2**:167-174.
43. Pistolozzi M, Bertucci C. Species-dependent stereoselective drug binding to albumin: a circular dichroism study. *Chirality* 2008;**20**:552-8.
44. Krag-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical Aspects of the Ligand-Binding and Enzymatic Properties of Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* 2002;**25**: 695-704.
45. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN. The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* 1975;**11**:824-832.

46. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N. Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Struct. Biol.* 1998;**5**:827–835.
47. Curry S, Brick P, Franks NP. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1999;**144**:1131–140.
48. Bhattacharya AA, Grüne T, Curry S. Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2000;**303**:721–732.
49. Petitpas I, Grüne T, Bhattacharya AA, Curry S. Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. *J. Mol. Biol.* 2001;**314**:955–960.
50. Wardell M, Wang Z, Ho JX, Robert J, Ruker F, Ruble J, Carter DC. The atomic structure of human methemalbumin at 1.9 Å. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002 ;**291**:813–819.
51. Zunszain PA, Ghuman J, Komatsu T, Tsuchida E, Curry S. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Struct. Biol.* 2003;**3**:6.
52. Petitpas I, Petersen CE, Ha CE, Bhattacharya AA, Zunszain PA, Ghuman J, Bhagavan NV, Curry S. Structural basis of albumin-thyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2003;**100**:6440–6445.
53. Bhattacharya AA, Curry S, Franks NP. Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin: high resolution crystal structures. *J. Biol. Chem.* 2000;**275**:38731–38738.
54. Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S, East M, Curry S. (2001). Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J. Biol. Chem.* 2001;**276**:22804–22809.
55. Petersen CE, Ha CE, Curry S, Bhagavan NV. (2002). Probing the structure of the warfarin binding site on human serum albumin using sitedirected mutagenesis. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* 2002;**47**:116–125.
56. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* 2005;**353**:38–52.
57. Simard JR, Zunszain PA, Hamilton JA, Curry S. Location of high and low affinity fatty acid binding sites on human serum albumin revealed by NMR drug-competition analysis. *J. Mol. Biol.* 2006;**361**:336–351.
58. Yang F, Bian C, Zhu L, Zhao G, Huang Z, Huang M. Effect of human serum albumin on drug metabolism: structural evidence of esterase activity of human serum albumin. *J. Struct. Biol.* 2007;**157**:348–355.
59. Fehske KJ, Schlafer U, Wollert U, Müller WE. Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone. *Mol. Pharmacol.* 1982;**21**:387–393.

60. Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim. Biophys. Acta* 1996;**1295**:147-157.
61. Yamasaki K, Maruyama T, Takadate A, Suenaga A, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Characterization of site I of human serum albumin using spectroscopic analyses: locational relations between regions Ib and Ic of site I. *J. Pharm. Sci.* 2004;**12**:3004-3012.
62. McMenamy RH, Oncley JL. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J. Biol. Chem.* 1958;**233**:1436—1447.
63. Chuang VTG, Otagiri M. Flunitrazepam, a 7-nitro-1,4-benzodiazepine that is unable to bind to the indole-benzodiazepine site of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* 2001;**1546**, 337-345.
64. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 1992;**358**:209-215.
65. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein. Eng.* 1999;**12**:439-446.
66. Watanabe H, Tanase S, Nakajou K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem. J.* 2000;**349**:813-819.
67. Jakoby MG 4<sup>th</sup>, Covey DF, Cistola DP. Localization of tolbutamide binding sites on human serum albumin using titration calorimetry and heteronuclear 2-D NMR. *Biochemistry* 1995;**34**:8780-8787.
68. Chuang VTG, Otagiri M. Stereoselective binding of human serum albumin. *Chirality* 2006;**18**:159-166.
69. Rahman MH, Maruyama T, Okada T, Imai T, Otagiri M. Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin—II. Stereoselective site-to-site displacement of carprofen by ibuprofen. *Biochem. Pharmacol.* 1993;**46**:1733-1740.
70. Yamasaki K, Rahman MH, Tsutsumi Y, Maruyama T, Ahmed S, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Circular dichroism simulation shows a site-II-to-site-I displacement of human serum albumin-bound diclofenac by ibuprofen. *AAPS PharmSciTech.* 2000;**1**:E12.]
71. Tsutsumi Y, Maruyama T, Takadate A, Goto M, Matsunaga H, Otagiri M. Interaction between two dicarboxylate endogenous substances, bilirubin and an uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, on human serum albumin. *Pharm. Res.* 1999;**16**:916-923.
72. Drmanovic Z, Voyatzi S, Kouretas D, Sahpazidou D, Papageorgiou A, Antonoglou O. Albumin possesses intrinsic enolase activity towards dihydrotestosterone which can differentiate benign from malignant breast tumors. *Anticancer Res.* 1999;**19**:4113-4124.

- 73.** Agarwal RP, Phillips M, McPherson RA, Hensley P. Serum albumin and the metabolism of disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* 1986;**35**:3341-3347.
- 74.** Williams AM, Dickinson RG. Studies on the reactivity of acyl glucuronides--VI. Modulation of reversible and covalent interaction of diflunisal acyl glucuronide and its isomers with human plasma protein in vitro. *Biochem. Pharmacol.*, 1994;**47**:457-467.
- 75.** Georges H, Presle N, Buronfosse T, Fournel-Gigleux S, Netter P, Magdalou J, Lapicque F. In vitro stereoselective degradation of carprofen glucuronide by human serum albumin. Characterization of sites and reactive amino acids. *Chirality* 2000;**12**:53-62.
- 76.** Dubois-Presle N, Lapicque F, Maurice M.-H, Fournel-Gigleux S, Magdalou J, Abiteboul M, Siest G, Netter P. Stereoselective esterase activity of human serum albumin toward ketoprofen glucuronide. *Mol. Pharmacol.* 1995;**47**:647-653.
- 77.** Gürakar AR, Wolfbeis OS. A sensitive kinetic assay of serum albumin based on its enzyme-like hydrolytic activity, using a new chromogenic and fluorogenic substrate. *Clin. Chim. Acta* 1988;**172**:35-46.
- 78.** Ikeda T. *Proceedings of the International Symposium on Serum Albumin & a 1-Acid Glycoprotein*. Ed. by Otagiri M, Sugiyama Y, Testa B, Tillement J-P, Kumamoto, Japan, 2001, pp. 173-180.
- 79.** Hage DS, Tweed SA. Recent advances in chromatographic and electrophoretic methods for the study of drug-protein interactions. *J. Chromatography. B. Biomed. Sci Appl.* 1997;**699**:499-525.
- 80.** Hage DS, Katz E, Eksteen R, Miller N (Eds.). *Handbook of HPLC*, Marcel Dekker, New York, 1998, cap.13.
- 81.** Chaiken IM (Ed.). *Analytical Affinity Chromatography*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1987.
- 82.** Bertucci C, Domenici E. Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. *Curr. Med. Chem.* 2002;**9**:1463-1481.
- 83.** Beigi F, Wainer IW. Syntheses of immobilized G protein-coupled receptor chromatographic stationary phases: characterization of immobilized  $\mu$  and  $\kappa$  opioid receptors. *Anal. Chem.* 2003;**75**:4480-4485.
- 84.** Jozwiak K, Haginaka J, Moaddel R, Wainer IW. Displacement and nonlinear chromatographic techniques in the investigation of interaction of noncompetitive inhibitors with an immobilized  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptor liquid chromatographic stationary phase. *Anal. Chem.* 2002;**74**:4618-4624.
- 85.** Ishizuka N, Kobayashi H, Minakuchi H, Nakanishi K, Hirao K, Hosoya K, Ikegami T, Tanaka N. Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A* 2002;**960**:85-96.
- 86.** Mallik R, Hage DS. Affinity monolith chromatography. *J. Sep. Sci.* 2006;**29**:1686-1704.

- 87.** Temporini C, Perani E, Mancini F, Bartolini M, Calleri E, Lubda D, Felix G, Andrisano V, Massolini G. Optimization of a trypsin-bioreactor coupled with high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for quality control of biotechnological drugs. *J. Chromatogr. A*. 2006;**1120**:121-131.
- 88.** Calleri E, Massolini G, Lubda D, Temporini C, Loiodice F, Caccialanza G. Evaluation of a monolithic epoxy silica support for penicillin G acylase immobilization. *J. Chromatogr. A* 2004;**1031**:93-100.
- 89.** Wainer IW, Noctor TA. Molecular biochromatography: an approach to the liquid chromatographic determination of ligand-biopolymer interactions. *Adv. Chromatogr.* 1993;**33**:67-96.
- 90.** Loun B, Hage DS. Characterization of thyroxine-albumin binding using high-performance affinity chromatography. I. Interactions at the warfarin and indole sites of albumin. *J. Chromatogr.* 1992;**579**:225-235.
- 91.** Jewell RC, Brouwer KLR, McNamara PJ. Alpha 1-acid glycoprotein high-performance liquid chromatography column (EnantioPAC) as a screening tool for protein binding. *J. Chromatogr.* 1989;**487**:257-264.
- 92.** Schill G, Wainer IW, Barkan SA. Chiral separations of cationic and anionic drugs on an alpha 1-acid glycoprotein-bonded stationary phase (EnantioPac). II. Influence of mobile phase additives and pH on chiral resolution and retention. *J. Chromatogr.* 1986;**365**:73-88.
- 93.** Harada K, Yuan Q, Nakayama M, Sugii A. Effects of organic modifiers on the chiral recognition by different types of silica-immobilized bovine serum albumin. *J. Chromatogr. A*, 1996, **740**, 207-213.
- 94.** Tittelbach V, Gilpin RK. Species dependency of the liquid chromatographic properties of silica-immobilized serum albumins. *Anal. Chem.* 1995;**67**:44-47
- 95.** Millot MC, Sébille B, Mangin C. Enantiomeric properties of human albumin immobilized on porous silica supports coated with polymethacryloyl chloride. *J. Chromatogr. A* 1997;**776**:37-44.
- 96.** Fitos I, Visy J, Simonyi M, Hermansson J. Chiral high-performance liquid chromatographic separations of vinca alkaloid analogues on alpha 1-acid glycoprotein and human serum albumin columns. *J. Chromatogr.* 1992;**609**:163-171.
- 97.** Šimek Z, Vespalec R. Interpretation of enantioselective activity of albumin used as the chiral selector in liquid Chromatography and electrophoresis. *J. Chrom. A* 1994;**685**:7-14.
- 98.** Taleb NL, Millot MC, Sebille B. Enantioselectivity properties of human serum albumin immobilized on anion-exchangers based on polyvinylimidazole-coated silica. Effect of protein loading on separation properties. *J. Chrom. A* 1997;**776**:45-53.
- 99.** Tittelbach V, Jaroniec M, Gilpin RK. Synthesis and characterization of silica-immobilized serum albumin stationary phases for HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 1996;**19**:2943-2965.

- 100.** Allenmark S. *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*, 2nd ed., Ellis Horwood, New York, 1991, Chapter 7.
- 101.** Dunn BM, Chaiken IM. Quantitative affinity chromatography. Determination of binding constants by elution with competitive inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974;**71**:2382-2385.
- 102.** Lagercrantz C, Larsson T, Karlsson H. Binding of some fatty acids and drugs to immobilized bovine serum albumin studied by column affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 1979;**99**:352-364.
- 103.** Allenmark S, Bomgren B, Borén H. Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases. IV. Molecular interaction forces and retention behaviour in chromatography on bovine serum albumin as a stationary phase. *J. Chromatogr.* 1984;**316**:617-624.
- 104.** Allenmark S, Andersson S, Bojarski J. Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases. VI. Optical resolution of a series of racemic barbiturates: studies of substituent and mobile phase effects. *J. Chromatogr.* 1988;**436**:479-483.
- 105.** Dalgaard L, Hansen JJ, Pedersen JL. Resolution and binding site determination of D,L-thyronine by high-performance liquid chromatography using immobilized albumin as chiral stationary phase. Determination of the optical purity of thyroxine in tablets. *J Pharm Biomed Anal.* 1989;**7**:361-368.
- 106.** Domenici E, Bertucci C, Salvadori P, Wainer IW. Use of a human serum albumin-based high-performance liquid chromatography chiral stationary phase for the investigation of protein binding: detection of the allosteric interaction between warfarin and benzodiazepine binding sites. *J. Pharm. Sci.* 1991;**80**:164-166.
- 107.** Ascoli GA, Bertucci C, Salvadori P. Ligand binding to a human serum albumin stationary phase: use of same-drug competition to discriminate pharmacologically relevant interactions. *Biomed. Chromatogr.* 1998;**12**:248-254.
- 108.** Kasai K, Ishii S. Affinity chromatography of trypsin and related enzymes. I. Preparation and characteristics of an affinity adsorbent containing tryptic peptides from protamine as ligands. *J. Biochem.* 1975;**78**:653-662.
- 109.** Nakano NI, Oshio T, Fujimoto Y, Amiya T. Study of drug-protein binding by affinity chromatography: interaction of bovine serum albumin and salicylic acid. *J. Pharm. Sci.* 1978;**67**:1005-1008.
- 110.** Loun B, Hage DS. Characterization of thyroxine-albumin binding using high-performance affinity chromatography. II. Comparison of the binding of thyroxine, triiodothyronines and related compounds at the warfarin and indole sites of human serum albumin. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 1995;**665**:303-314.
- 111.** Pedulli GF. *Metodi fisici in chimica organica*, Piccin, Padova, 1996, pp 66-72.

- 112.** Nakanishi K, Berova N, Woody RW. *Circular dichroism principles and applications*, VCH Publ., New York, 1994, 31-474.
- 113.** Johnson CW Jr. Circular Dichroism Spectroscopy and the Vacuum Ultraviolet Region. *Ann. Rev. Phys. Chem.* 1978;**29**:93-114.
- 114.** Rosen A. The measurement of binding constants using circular dichroism. Binding of phenylbutazone and oxyphenbutazone. *Biochem. Pharmacol.* 1970;**19**:2075-2081.
- 115.** Perrin JH, Vallner JJ. Preliminary investigations of intrinsic and extrinsic optical activity as purity criterion for human serum albumins. *J. Pharm. Sci.* 1975;**64**:1508-1513.
- 116.** Kaliszan R, Noctor TA, Wainer IW. Stereochemical aspects of benzodiazepine binding to human serum albumin. II. Quantitative relationships between structure and enantioselective retention in high performance liquid affinity chromatography. *Mol. Pharmacol.* 1992;**42**:512-517.
- 117.** Cantor CR, Schimmel PR. *Biophysical Chemistry. Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. W.H. Freeman and Co., San Francisco, CA, 1980. pp. 412-413.
- 118.** Ascoli G, Bertucci C, Salvadori P. Stereospecific and competitive binding of drugs to human serum albumin: a difference circular dichroism approach. *J. Pharm. Sci.* 1995;**84**:737-741.
- 119.** Carpenter CC, Fischl MA, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JS, Richman DD, Saag MS, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Yeni PG, Volberding PA. Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 1997;**277**:1962-1969.
- 120.** Hogg RS, O'Shaughnessy MV, Gataric N, Yip B, Craib K, Schechter MT, Montaner JS. Decline in deaths from AIDS due to new antiretrovirals. *Lancet* 1997;**349**:1294.
- 121.** Berger EA, Moss B, Pastan I. Reconsidering targeted toxins to eliminate HIV infection: you gotta have HAART. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;**95**:11511-11513.
- 122.** U. S. Department of health and human services. *Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations*. FDA Orange book 28<sup>th</sup> Ed. 2008. [Monografia disponibile su internet al sito <http://www.fda.gov/cder/orange/obannual.pdf>]
- 123.** Flexner C. HIV-protease inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 1998;**338**:1281-1292.
- 124.** Abdel-Rahman HM, Al-karamany GS, El-Koussi NA, Youssef AF, Kiso Y. HIV protease inhibitors: peptidomimetic drugs and future perspectives. *Curr. Med. Chem.* 2002;**9**:1905-1922.
- 125.** McEvoy GK ed. *American Hospital (AHFS) Drug Information 2003*. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists; 2003.
- 126.** McEvoy GK, Miller J, Snow EK, Welsh OH, Litvak K, eds. *American Hospital (AHFS) drug information 2004*. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2004.

- 127.** Erickson JW, Burt SK. Structural mechanisms of HIV drug resistance. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1996;**36**:545-571.
- 128.** Flexner C, Broyles SS, Earl P, Chakrabarti S, Moss B. Characterization of human immunodeficiency virus gag/pol gene products expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology.* 1988;**166**:339-349.
- 129.** Flexner C. Dual protease inhibitor therapy in HIV-infected patients: pharmacologic rationale and clinical benefits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000;**40**:649-674.
- 130.** Flexner C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of HIV protease inhibitors. *Infect. Med.* 1996;**13**(Suppl. F): 16-23.
- 131.** Alsenz J, Steffen H, Alex R. Active apical secretory efflux of the HIV protease inhibitors saquinavir and ritonavir in Caco-2 cell monolayers. *Pharm. Res.* 1998;**15**:423-428.
- 132.** Kim AE, Dintaman JM, Waddell DS, Silverman JA. Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998;**286**:1439-1445.
- 133.** Drewe J, Gutmann H, Fricker G, Török M, Beglinger C, Huwlyer J. HIV protease inhibitor ritonavir: a more potent inhibitor of P-glycoprotein than the cyclosporine analog SDZ PSC 833. *Biochem. Pharmacol.* 1999;**57**:1147-1152.
- 134.** Washington CB, Duran GE, Man MC, Sikic BI, Blaschke TF. Interaction of anti-HIV protease inhibitors with the multidrug transporter P-glycoprotein (P-gp) in human cultured cells. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1998;**19**:203-209.
- 135.** Piscitelli SC, Gallicano KD. Interactions among drugs for HIV and opportunistic infections. *N. Engl. J. Med.* 2001;**344**:984-996.
- 136.** Bean P, Patnaik M, Graziano FM, Aziz DC. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral agents. *Am. Clin. Lab.* 2000;**19**:20-22.
- 137.** Bhakuni V. Alcohol-induced molten globule intermediates of proteins: are they real folding intermediates or off pathway products? *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;**357**:274-84.
- 138.** Fanali G, Bocedi A, Ascenzi P, Fasano M. Modulation of heme and myristate binding to human serum albumin by anti-HIV drugs. An optical and NMR spectroscopic study. *FEBS J.* 2007;**274**:4491-4502.
- 139.** Coleman PD, Flood DJ. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Ageing* 1987;**8**:521-545.
- 140.** Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochem. Soc. Trans.* 2002 ;**30**:552-557.
- 141.** Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 2006;**440**:352-357.

- 142.** Kawahara M, Kuroda Y. Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res. Bull.* 2000;**53**:389-397.
- 143.** Lin H, Bhatia R, Lal R. Amyloid beta protein forms ion channels: implication for Alzheimer's disease pathophysiology. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2002;**15**:2433-2444.
- 144.** Goodman A, Gilman AG. *The pharmacological basis of therapeutics.* 9<sup>th</sup> Edition, Mc Graw-Hill, New York 1996, pp. 1712-1792.
- 145.** Goodman A, Gilman AG. *The pharmacological basis of therapeutics.* 10<sup>th</sup> Edition, Italian edition, Mc Graw-Hill, Milan 2003, pp. A II -8 – A II -89.