

**UNIVERSITATEA “BABEȘ-BOLYAI “CLUJ NAPOCA  
FACULTATEA DE CHIMIE ȘI INGINERIE CHIMICĂ**

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “IULIU HAȚIEGANU” CLUJ NAPOCA  
FACULTATEA DE FARMACIE**

**STUDII BIOCHIMICE ȘI FARMACOCINETICE  
ALE UNOR MEDICAMENTE ANTIINFLAMATOARE NESTEROIDIENE**

**Doctorand  
Chim. ADRIANA MONICA MARCOVICI**

**Referenti:**

**Prod. Dr. Andrei Medvedovici, Universitatea Bucuresti**

**Prof. Dr. Valentin Zaharia, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj  
Napoca**

**Conf. Dr. Michaela Lucia Ponta, Universitatea “Babeș-Bolyai “ Cluj Napoca**

**Conducători științifici**

**Prof. Univ. Dr. Ing. FLORIN DAN IRMIE**

**Prof. Univ. Dr. SORIN LEUCUȚA**

**CLUJ NAPOCA**

**2012**

## CURPINSUL TEZEI DE DOCTORAT

|  |           |
|--|-----------|
| <b>A1. Considerente generale</b>   | <b>4</b>  |
| <b>A2. Metabolismul ibuprofenului si ketorolacului</b>   | <b>6</b>  |
| <b>A2.1. Ibuprofenul</b>   | <b>6</b>  |
| <b>A2.2. Ketorolacul</b>   | <b>9</b>  |
| <b>A3. Tehnici de separare a enantiomerilor</b>  | <b>10</b> |
| <b>A3.1. Separarea enantiomerilor prin HPLC</b>  | <b>11</b> |
| <b>A3.2. Tipuri de selectori chirali utilizați in cromatografia de lichide de inalta performanta</b> | <b>12</b> |
| <b>A4. Metode biocatalitice de obținere a profenilor enantiopuri</b>                                 | <b>14</b> |
| <b>A4.1. Procese de rezoluție cinetică enzimatică. Hidrolaze și oxidaze</b>                          | <b>14</b> |
| <b>A4.2. Rezoluția cinetică dinamică</b>   | <b>17</b> |
| <b>A4.3. Asimetrizarea precursorilor prochirali prin reacții de decarboxilare</b>                    | <b>18</b> |
| <b>A4.4 Procese de izomerizare enzimatică</b>  | <b>19</b> |
| <b>A4.5 Procese enzimatiche nestereoselective</b>  | <b>20</b> |
| <b>Concluzii</b>   | <b>21</b> |
| <b>B1. Farmacocinetica ketorolacului</b>   | <b>23</b> |
| <b>B1.1. Materiale și metode</b>   | <b>23</b> |
| <b>B1.2. Metoda analitica și validarea</b>   | <b>23</b> |
| <b>B1.3. Concentrațiile plasmatice ale enantiomerilor ketorolacului</b>                              | <b>33</b> |
| <b>B1.3.1. Analiza farmacocinetica non-compartimentala</b>   | <b>34</b> |
| <b>B1.3.2. Biodisponibilitatea comparativă și bioechivalența R- și S-ketorolacului</b>               | <b>36</b> |
| <b>B2. Biodisponibilitatea ibuprofenului</b>   | <b>39</b> |
| <b>B2.1. Materiale și metode</b>   | <b>39</b> |
| <b>B2.2. Metoda analitica și validarea</b>   | <b>40</b> |
| <b>B2.3. Concentrațiile plasmatice ale ibuprofenului</b>   | <b>45</b> |
| <b>B2.3.1. Analiza farmacocinetica noncompartimentală</b>  | <b>47</b> |
| <b>B2.3.2. Biodisponibilitatea comparativa. Bioechivalenta ibuprofenului</b>                         | <b>55</b> |
| <b>B2.4. Analiza farmacocinetica compartimentala</b>   | <b>63</b> |
| <b>B3. Biocataliza</b>   | <b>78</b> |
| <b>B3.1. Biocataliza cu <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>  | <b>78</b> |
| <b>B3.2. Biocataliza cu lipaze. Rezoluții cinetice enzimatiche ale racemaților</b>                   | <b>89</b> |
| <b>B3.2.1. Esterificarea ibuprofenului in prezenta lipazelor</b>                                     | <b>91</b> |
| <b>B3.2.2. Hidroliza esterilor ibuprofenului catalizata de lipaze</b>                                | <b>92</b> |
| <b>B3.2.3. Alcooliza enantioselectivă a esterilor racemici ai ibuprofenului</b>                      | <b>92</b> |

|                           |            |
|---------------------------|------------|
| <b>Concluzii generale</b> | <b>99</b>  |
| <b>Anexa 1</b>            | <b>101</b> |
| <b>Anexa 2</b>            | <b>110</b> |
| <b>Literatura</b>         | <b>128</b> |

### **CUVINTE CHEIE**

IBUPROFEN; KETOROLAC; ENANTIOMER; ENANTIOSELECTIV; CHIRAL ; PLASMA ; LIPAZE;  
FARMACOCINETICA; COMPARTIMENTALA ; BIODISPONIBILITATE

## A.1 CONSIDERENTE GENERALE

Chiralitatea este o proprietate universală a naturii; de aceea, imediat ce omul a descoperit acest adevăr și a înțeles implicațiile sale în funcționarea organismelor, a încercat să o copieze și să creeze molecule noi cu complexitate similară, capabile să interacționeze la fel de specific cu lumea vie.

Încă de la începuturi a fost clar că microorganismele sunt capabile să producă în cel mai simplu și eficient mod posibil aceste molecule dorite.

Prima observație a enantioselectivității aparține lui Louis Pasteur care a descoperit în 1848 că o soluție apoasă de tartrat de amoniu racemic, îmbogățită cu nutrient, se formează cu viteza net superioară enantiomerul dextrogir. Ulterior el a explicat acest lucru prin acțiunea specifică a unei ciuperci, *Penicillium glaucum*, asupra acestui enantiomer. A emis teoria care s-a dovedit ulterior corectă că acest stereoisomer interacționează specific cu o moleculă cheie, chirală, produsă de microorganism, ceea ce face posibilă transformarea sa.<sup>1</sup>

Abia la începutul secolului al XX-lea a fost evidențiat și demonstrat rolul chiralității în modul de acțiune al medicamentelor. În 1933 Easson și Stedman au propus un model pentru interacțiunea enantioselectivă a medicamentului cu receptorii farmacologici<sup>2</sup> studiind efectul presor al enantiomerilor epinefrinei, a căror enantioselectivitate este de 300:1, enantiomerul natural *R* este cel mai potent.

În continuare a fost evidențiat rolul chiralității și în biodisponibilitatea medicamentelor chirale, într-un număr mare de efecte farmacologice și structuri chimice. Astfel în 1940 au fost studiați din acest punct de vedere hormonii sexuali<sup>3</sup>, apoi propranololul și alți compuși cu activitate betablocantă.<sup>4</sup> S-a evidențiat și toxicitatea selectivă a enantiomerului. În anii 1960, după ce un studiu clinic al unor medicamente antiparkinsoniene a fost început cu amestecul racemic, s-a demonstrat rapid o toxicitate inacceptabilă a enantiomerului *D* și medicamentul a fost dezvoltat în forma enantiopură *L*.<sup>5</sup> În ultimii 30 de ani ai secolului trecut s-au efectuat studii și s-au acumulat informații referitoare la importanța chiralității în mecanismul de acțiune și metabolismul multor medicamente.<sup>6</sup>

Farmacologia modernă s-a dezvoltat în secolul al XX-lea. Au fost izolați și identificați o serie de compuși naturali, au fost preparați mii de compuși noi, atât naturali cât și (semi)sintetici, majoritatea chirali, și a fost introdusă în terapia modernă un număr impresionant de medicamente.

În timp medicamentele chirale au format un segment tot mai important. Cu toate acestea, în 1987 ele se foloseau încă în proporție de 88% sub formă de amestec racemic. Utilizarea enantiomerului farmacologic activ s-a realizat doar în cazul unei toxicități semnificative a celuilalt. Un rol important în acest fenomen l-au avut companiile farmaceutice care, neavând nici un interes, nu au făcut eforturi susținute de dezvoltare a enantiomerilor individuali ai unui medicament pentru care dețineau patentul.

O atitudine diferită față de rolul chiralității în dezvoltarea de noi medicamente a început totuși în deceniul opt al secolului trecut, odată cu dezvoltarea de tehnici analitice enantioselective,<sup>7</sup> ceea ce a permis elaborarea de metode de sinteză stereoselective.<sup>8,9</sup>

La ora actuală este obligatorie obținerea și testarea enantiomerilor individuali ai oricărui medicament nou, din punctul de vedere al farmacologiei, efectului terapeutic și toxicității, după care se face o analiză complexă a enantiomerilor individuali și se ia decizia optimă în fiecare caz individual, neexistând un protocol unic de analiză. În cazul în care metabolizarea celor doi enantiomeri se face de către enzime diferite care sunt fie polimorfe fie pot fi induse sau inhibitate, și mai ales dacă farmacodinamia enantiomerilor este diferită din punct de vedere cantitativ sau calitativ analiza enantiospecifică este necesară.<sup>10</sup>

Un concept nou a fost introdus de către Tobert acum circa 30 de ani: utilizarea unui amestec neracemic de stereoisomeri ca și medicament optimizat. Studiind efectul diuretic și uricazuric al îndacrinonei, forma farmaceutică optimă a fost determinată ca fiind un amestec în care raportul enantiomerilor *S/R* este de 4:1.<sup>11</sup>

Medicamentele antiinflamatoare nesteroidiene, prezintă o mare varietate structurală totuși între ele se disting o subclasă distinctă, cea a medicamentelor antiinflamatoare nesteroidiene chirale cu structuri derivate de la acid 2-arilpropionic (Ibuprofen, Ketoprofen, Flurbiprofen, Fenoprofen, Naproxen, Flunoxaprofen) sau cu structuri derivate de acizi arilalcanoici (Indobufen, Ketorolac, Etodolac, Clidanac) sau agenți ne-acizi (Azapropazone, Oxifenbutazonă, Talniflumat). Încă din timpul studiilor și testărilor preliminare ale unor derivați de acizi arilalcanoici s-a constatat că stereochimia

moleculii joacă un rol important în activitatea anti-inflamatoare, ca doar unul din enantiomeri prezintă o astfel de activitate.<sup>12</sup> Cu toate acestea, cu excepția Naproxenului și Flunoxaprofenului, comercializați sub formă de S-enantiomer, toți ceilalți se folosesc sub forma de amestec racemic.

Medicamentele cu structuri profenice (derivați de acid 2-aryl propionic) una din cele mai importante clase de medicamente antiinflamatoare cu structură nesteroidică descoperite în anul 1961 de către Adams, Nicholson și Burrows, sunt un exemplu deja consacrat al importanței pe care chiralitatea o joacă în manifestarea efectului biologic.

În lucrarea de față ne-am oprit asupra a două substanțe medicamentoase din clasa medicamentelor antiinflamatoare nesteroidiene, Ibuprofenul respectiv Ketorolacul. Ambele molecule sunt chirale dar se comercializează ca medicamente sub formă de amestec racemic.

Unul din obiectivele prezentei lucrări a fost să studieze farmacocinetica Ibuprofenului și Ketorolacului după administrarea ca și amestec racemic sub diferite forme farmaceutice. În cazul ketorolacului a fost studiată farmacocinetica fiecărui enantiomer. Analiza farmacocineticii celor două medicamente impune dezvoltarea unor metode bioanalitice de cuantificare a medicamentului, respectiv a celor doi enantiomeri din plasma umană. Unul din obiectivele acestei lucrări îl constituie studierea biodisponibilității la om a două substanțe medicamentoase din categoria medicamentelor antiinflamatoare nesteroidiene, ketorolac și ibuprofen, administrate sub diferite forme farmaceutice solide orale.

Una dintre cele mai importante proprietăți ale unui medicament este capacitatea de a elibera principiul activ astfel încât acesta să ajungă la locul de acțiune într-o cantitate suficientă pentru obținerea răspunsului terapeutic dorit. Această proprietate a fost numită disponibilitate fiziologică, disponibilitate biologică sau **biodisponibilitate**. În alți termeni, conceptul de biodisponibilitate se definește mai exact ca fiind viteza și mărimea absorbției unei substanțe medicamentoase din forma farmaceutică în circulația sistemică<sup>13,14</sup>.

Deoarece este cunoscut faptul că efectul terapeutic al unui medicament este corelat cu concentrația acestuia în plasmă sau sânge, importanța biodisponibilității în terapia medicamentoasă constă în faptul că viteza și mărimea absorbției acestui medicament poate să afecteze răspunsul farmacologic al pacientului<sup>15</sup>.

Multă vreme s-a considerat că performanța terapeutică este asigurată doar de existența cantității declarate de substanță medicamentoasă în produsul medicamentos. S-a constatat însă că eșecul terapeutic se datorează variațiilor în biodisponibilitatea medicamentului, fiind mai degrabă corelat cu unele variabilități ale pacienților.

Sunt mai mulți factori care pot provoca variații în biodisponibilitatea unui medicament, factori care pot fi corelați cu pacientul sau cu forma farmaceutică.

Factorii corelați cu forma farmaceutică și care pot produce mari diferențe în biodisponibilitatea medicamentelor solide de uz oral pot fi factori legați de substanța medicamentoasă (proprietăți chimice, fizice sau fizico-chimice), factori legați de natura, cantitatea și reactivitatea excipienților utilizați sau factori tehnologici<sup>16</sup>. Evident, administrarea unei substanțe medicamentoase în forme farmaceutice diferite (granulate, capsule, comprimate, acoperite) va duce la variații în ceea ce privește mărimea și viteza absorbției.

Realizarea unor produse medicamentoase cu o biodisponibilitate reproductibilă este legată de determinarea mărimii și vitezei absorbției substanțelor medicamentoase din forma farmaceutică.<sup>17</sup>

Biodisponibilitatea egală a două produse farmaceutice, evaluată în condiții standardizate la același grup de voluntari sănătoși definește **bioechivalența**. Determinarea bioechivalenței se face la produsele generice în comparație cu produsele inventatorului spre a asigura aceeași calitate biologică a ambelor sortimente. Existența bioechivalenței unor formulări, ale unor producători diferiți, care conțin același principiu activ, face ca ele să poată fi considerate interschimbabile deoarece este de așteptat să producă aceleași efecte terapeutice.

Procesele cinetice (de viteză) care au loc la administrarea substanței medicamentoase în organism pe o anumită cale sunt definite de anumiți parametri specifici determinați în urma analizei farmacocinetice. Analiza se bazează pe cunoașterea concentrațiilor plasmatice ale substanței medicamentoase sau ale metaboliților ei activi în funcție de timpul trecut de la administrare. Parametrii obținuți în urma analizei pot fi utilizați ulterior pentru caracterizarea farmacocinetică a substanței, pentru compararea calității unor produse farmaceutice sau pentru instituirea unei scheme de tratament sau individualizarea acestuia în funcție de particularitățile fiziologice ale organismului.

În anul 1992 FDA a reglementat clar modalitatea de descoperire a medicamentelor chirale noi, aplicată ulterior și în alte țări, inclusiv cele europene și Canada, Australia, Japonia.<sup>18</sup> Aceste reglementări noi vor duce probabil în timp la dispariția medicamentelor racemice.

În acest context, dezvoltarea de procedee stereoselective de obținere a moleculelor chirale cu structuri uneori deosebit de complexe și de metode eficiente de separare a medicamentelor chirale noi sau vechi, este de o importanță covârșitoare.

Al doilea obiectiv al lucrării de față a fost studierea și găsirea unor metode biocatalitice de rezoluție a celor doi enantiomeri ai Ibuprofenului.

## **B. PARTEA EXPERIMENTALĂ**

### **B.1 FARMACOCINETICA KETOROLACULUI**

#### **B.1.1 MATERIALE ȘI METODE**

Pentru studiul farmacocineticii enantiomerilor ketorolacului administrat în doză unică pe cale orală la voluntari sănătoși a fost realizat un studiu clinic la care au participat 22 de voluntari sănătoși. S-au administrat, în doză unică, pe cale orală, înainte de masă (în absența alimentelor), două produse farmaceutice: Testul – o formulare experimentală, nouă, comprimate orodispersabile și Referința – produsul original-comprimate filmate. A fost utilizată o metodă analitică enantioselectivă de determinare a ketorolacului din plasma umană.

##### ***Subiecți***

La studiul clinic au participat 22 subiecți.

Protocolul clinic al studiului a fost aprobat de către Agenția Națională a Medicamentului și Dispozitivelor Medicale, Comisia de Etică al Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. Înaintea participării la procedurile de screening în vederea înrolării în studiu, fiecare voluntar participant a semnat un formular de consimțământ informat după ce a primit informațiile referitoare la medicamentul care va fi administrat (doză, efecte terapeutice, efecte secundare), precum și la programul de administrare și prelevare a probelor sanguine. Au fost acceptați în studiu de către medicii investigatori numai voluntarii găsiți sănătoși în urma examenului medical și a rezultatelor analizelor de hematologie, biochimie, urină. Starea de sănătate a voluntarilor a fost determinată și post-studiu.

##### ***Designul studiului***

Fiecare studiu s-a desfășurat în două perioade, încrucișat, în fiecare perioadă participanților la studiu le-a fost administrată alternativ, pe cale orală, câte o doză de 10 mg ketorolac, după un repaus alimentar de minim 10 ore. Au fost administrate formularea test (tratament respectiv produs farmaceutic notat mai departe cu indicativul T) respectiv formularea referință (tratament și produs farmaceutic notat mai departe cu R). Timpul de repaus dintre perioade a fost de 7 zile. Produsele farmaceutice (formularea Test și Referință) au fost administrate într-un design cross-over (fiecăru voluntar i se administrează, pe rând, ambele produse, într-o manieră încrucișată).

Orarul de prelevare a probelor sanguine a fost după cum urmează: 0, 0.08, 0.17, 0.25, 0.33, 0.5, 0.67, 0.83, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24 ore. Au fost prelevate probe sanguine (5 ml, puncție venoasă) după administrarea dozei. După centrifugarea probelor sanguine, plasma a fost separată și păstrată la temperaturi sub  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  până la analiză.

#### **B.1.2 METODA ANALITICA ȘI VALIDAREA**

##### ***Descrierea***

Studiul analitic s-a efectuat pentru a determina simultan concentrațiile medicamentoase de R(+)-Ketorolac și S(-)-Ketorolac din plasma umană, având anticoagulant  $\text{K}_3\text{EDTA}$ , din probele biologice obținute în studiul clinic, în prezența standardului intern S(+)-Etodolac.

Metoda analitică a fost validată în conformitate cu prevederile Ghidului FDA pentru industrie referitor la validarea metodelor bioanalitice<sup>19</sup> și Ghidului european privind testarea bioechivalenței și biodisponibilității 1498/2010Rev1.<sup>20</sup> Metoda este descrisă în continuare<sup>21</sup>.

### ***Determinarea cantitativă***

Pentru determinarea simultană a concentrațiilor medicamentoase de R(+)-Ketorolac și S(-)-Ketorolac din plasma umană, anticoagulant K<sub>3</sub>EDTA, s-a folosit o metodă de cromatografie de lichide de înaltă performanță ( HPLC) cuplată cu spectrometria de masă.

#### **Aparatura:**

- Agilent 1200 Series pompă binară
- autosampler cu termostat Agilent 1200 Series
- termostat Agilent 1200 Series
- detector spectrometru de masă triplu quadrupol API 3200, Applied Biosystems MDS SCIEX

#### **Condițiile de lucru:**

- Coloana: Chiral AGP 100 x 4 mm, 5μm, Chrom Technologies
- Faza mobilă: acetonă (puritate HPLC): acetonitril (puritate HPLC): soluție tampon-1 (9:23:68 v/v/v)
- Debitul: 0.9 ml/min, temperatura: 20 ° C
- Volumul de injecție: 10 μl

#### **Procesarea probelor biologice**

În eprubete de polipropilenă, peste 50 μl standard intern S(+)-Etodolac de concentrație aproximativă 2500.00 ng/mL, se adaugă 100 μl probă plasmă și 400 μL de soluție-1. Amestecul astfel obținut se vortexează timp de 10 secunde la 3000 rpm.

S-a folosit o metodă de extracție pe fază solidă (SPE), cu cartușe Oasis HLB (Waters). Înainte de utilizare cartușele au fost condiționate cu metanol și apă (Puritate HPLC).

Proba de plasmă se încarcă în cartușele condiționate, după care proba se spală cu 0.75mL apă (puritate HPLC), în două etape succesive. Eluția probelor de pe cartușe se realizează în două etape, cu câte 1 mL metanol (puritate HPLC), urmată de uscare în evaporator sub curent de azot, la 50 °C ± 2 °C . Reziduu solid obținut se reconstituie cu 200μl fază mobilă și se vortexează până la reluarea totală. Se transferă apoi în fiole corespunzătoare și se supun analizei.

#### **c) Analiza probelor**

Concentrațiile medicamentoase de R(+)-Ketorolac și S(-)-Ketorolac din plasma umană, anticoagulant K<sub>3</sub>EDTA, au fost cuantificate față de standardul intern S(+)-Etodolac, iar timpii de retenție obținuți s-au situat pentru R(+)-Ketorolac între 3.4 - 3.7 minute, pentru S(-)-Ketorolac între 2.2 – 2.5 minute și pentru S(+)-Etodolac între 3.5 – 3.8 minute.

Masele ionice detectate:

R(+)-Ketorolac: *m/z* 256.20 (ionul părinte) și 105.10 (produs copil)(Anexa 1, Figura 1)

S(-)-Ketorolac: *m/z* 256.20 (ionul părinte) și 105.10 (produs copil)(Anexa 1, Figura 2)

S(+)-Etodolac: *m/z* 288.20 (ionul părinte) și 172.10 (produs copil)(Anexa 1, Figura 3)

Datorită detecției specifice nu s-au observat interferențe semnificative la timpul de retenție al analiților și a standardului intern în probele blanc de plasmă.

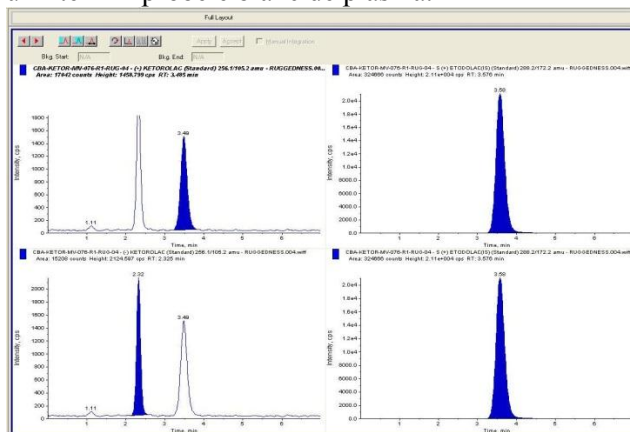


Figura B.1.2. Cromatogramele analiților: R(+)-Ketorolac, S(-)-Ketorolac și a standardului intern S(+)-Etodolac într-o probă de plasmă la o concentrație corespunzătoare limitei de cuantificare

### B.1.3 CONCENTRAȚIILE PLASMATICE ALE ENANTIOMERILOR KETOROLACULUI

În Figura B.1.7 sunt prezentate valorile medii ale concentrațiilor plasmatice ale *R*- și *S*-ketorolacului în urma administrării produselor farmaceutice la voluntarii participanți la studiu.

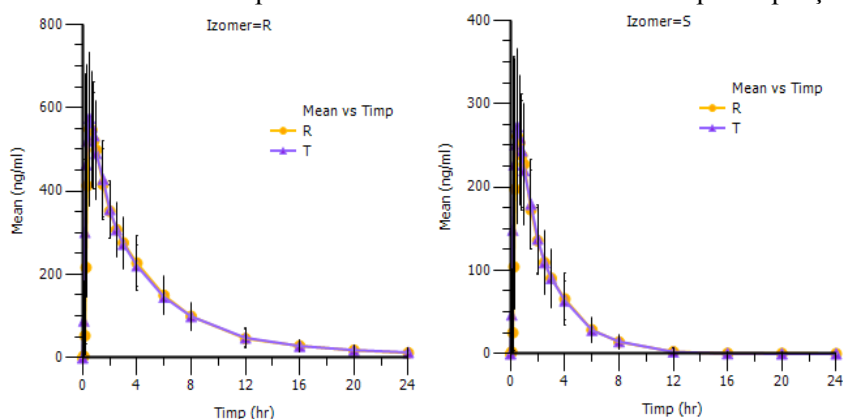


Figura B.1.7 Concentrațiile plasmatice medii ale *R*- și *S*-ketorolacului în urma administrării unei doze unice de ketorolac pe cale orală la voluntari sănătoși

#### B.1.3.1 ANALIZA FARMACOCINETICA NONCOMPARTIMENTALA

Pentru efectuarea analizei farmacocinetice noncompartimentale, a fost utilizat programul Kinetica 4.2. Au fost calculați următorii parametri farmacocinetici: concentrația maximă ( $C_{max}$ ), timpul de maxim ( $T_{max}$ ), aria de sub curbă observată ( $ASCl_{ast}$ ), aria de sub curba totală ( $ASC_{inf}$ ) și procentul ariei de sub curbă extrapolată ( $ASC_{\%}$ ), constanta de viteză a eliminării ( $\lambda_z$ ), timpul de înjumătățire ( $t_{1/2}$ ), timpul mediu de rezidență ( $TMR$ ), clearance-ul aparent ( $Cl_F$ ), volumul de distribuție aparent ( $Vz_F$ ).

O comparație tip box-plot pentru câțiva din parametrii farmacocinetici ai *R*(+)- și *S*(-)-ketorolacului pentru studiul realizat este prezentată în Figura B.1.8-B.1.9. În aceste reprezentări grafice se compară vizual valorile medii (+mediana) a parametrilor farmacocinetici ai celor doi enantiomeri, în funcție de produsul farmaceutic administrat.

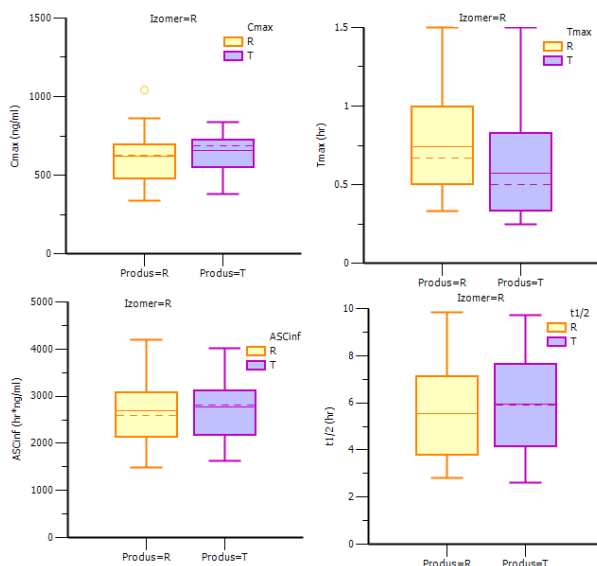


Figura B.1.3 Valorile medii ale principalilor parametrii farmacocinetici ai *R*-ketorolacului pentru cele doua produse farmaceutice analizate



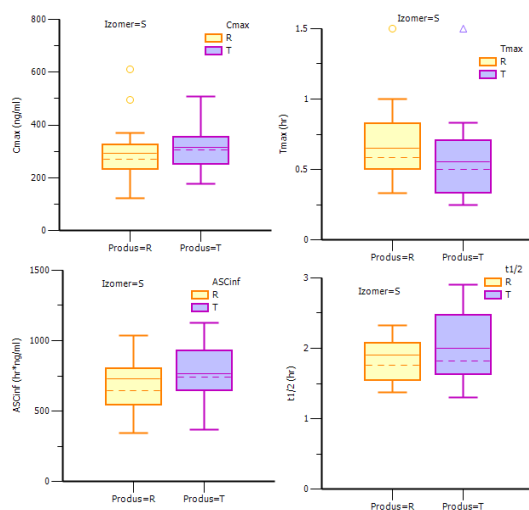


Figura B.1.4. Valorile medii ale principalilor parametri farmacocinetici ai S-ketorolacului pentru cele două produse farmaceutice analizate

Analiza parametrilor farmacocinetici arată că cei doi enantiomeri se comportă foarte diferit după administrarea sub formă de racemic.

Enantiomerul R(+) prezintă o concentrație maximă  $C_{max}$  dublă față de enantiomerul S(-), corelată foarte bine cu timpul de rezidență mediu în organism TMR de aproximativ 6 ore în cazul enantiomerului R(+).

Enantiomerul S(-), responsabil cu activitatea biologică antiinflamatoare a ketorolacului, se elimină de aproape 3 ori mai repede decât enantiomerul R(+).

Comportarea enantiospecifică este reproductibilă de la produsul Test la produsul Referință, datele obținute de cele două forme farmaceutice foarte diferite (comprimate filmate și comprimate orodispersabile) fiind consistente.

#### Analiza comparativă a farmacocineticii enantiomerilor R și S ai ketorolacului

Pornind de la valorile individuale ale parametrilor farmacocinetici ai R(-) și S(+)-ketorolacului calculați anterior (tabelele B.1.17-B.1.20), a fost realizată analiza statistică comparativă a acestora.

Concentrațiile medii ale enantiomerilor ketorolacului, pentru fiecare produs farmaceutic analizat, sunt prezentate în Figura. B.1.10.

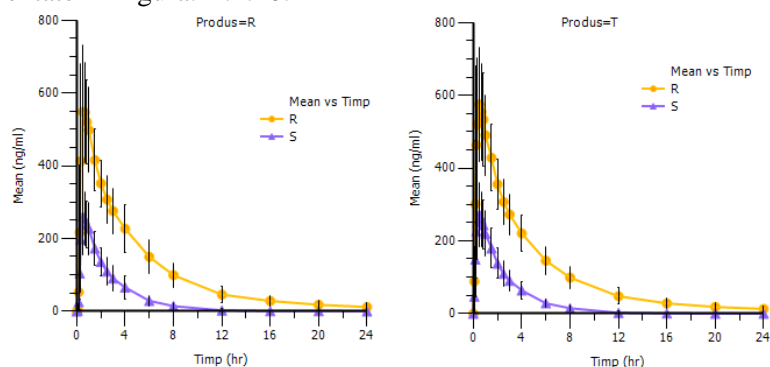


Figura B.1.5. Valorile medii ale concentrațiilor plasmatice ale enantiomerilor R și S ai ketorolacului, pentru fiecare produs farmaceutic analizat.

În tabelele B.1.24-B.1.25 sunt prezentate rezultatele testului statistic de analiză comparativă (ANOVA 2 căi) a parametrilor farmacocinetici ai celor doi enantiomeri, pentru fiecare produs farmaceutic analizat.

Atât în cazul formulării Test cât și pentru produsul de Referință, parametrii farmacocinetici variază semnificativ din punct de vedere statistic. Cele mai mari diferențe se constată la aria de sub curbă AUC și concentrația plasmatică maximă  $C_{max}$ , ceea ce se corelează cu viteza de eliminare diferită a celor doi enantiomeri.

O singură excepție se constată în cazul T<sub>max</sub>, unde diferențele între cei doi enantiomeri nu sunt semnificative din punct de vedere statistic.

Aceste rezultate confirmă încă o dată existența unor farmacocinetici diferite pentru cei doi enantiomeri.

## B.2 BIODISPONIBILITATEA IBUPROFENULUI

### B.2.1 MATERIALE ȘI METODE

Pentru studiul farmacocineticii ibuprofenului administrat în doză unică pe cale orală la voluntari sănătoși au fost realizate 3 studii clinice, fiecare în două variante: cu administrare a produsului farmaceutic în absența alimentelor (Fasting), respectiv după masa (Fed) (Tabelul B.2.1).

*Tabelul B.2.1.* Caracteristicile principale ale studiilor clinice efectuate pentru studiul farmacocineticii ibuprofenului.

| Studiu (cod) | Tip studiu (Alimentație) | Produse farmaceutice administrate    | Număr subiecți | Design studiu                |
|--------------|--------------------------|--------------------------------------|----------------|------------------------------|
| STD1         | Fasting                  | Test (T), Referință (R)              | 29             | Dublu încrucișat (crossover) |
| STD1         | Fed                      | Test (T), Referință (R)              | 31             | Dublu încrucișat (crossover) |
| STD2         | Fasting                  | Test1 (T1), Test2(T2), Referință (R) | 9              | Dublu încrucișat (crossover) |
| STD2         | Fed                      | Test1(T1), Test2(T2), Referință (R)  | 9              | Dublu încrucișat (crossover) |
| STD3         | Fasting                  | Test (T), Referință (R)              | 60             | Dublu încrucișat (crossover) |
| STD3         | Fed                      | Test (T), Referință (R)              | 31             | Dublu încrucișat (crossover) |

#### *Subiecți*

La cele trei studii clinice, în cele două variante ale fiecăruia (Fasting și Fed) au participat între 9 și 60 subiecți (Tabelul B.2.1).

Protocolele clinice ale studiilor au fost aprobate de către Agenția Națională a Medicamentului și Dispozitivelor Medicale, Comisia de Etică al Universității de Medicină și Farmacie “Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. Înainte de participării la procedurile de screening în vederea înrolării în studiu, fiecare voluntar participant a semnat un formular de consimțământ informat după ce primit informațiile referitoare la medicamentul care va fi administrat (doza, efecte terapeutice, efecte secundare), precum și la programul de administrare și de prelevare a probelor sanguine. Au fost acceptați în studiu de către medicii investigatori numai voluntarii găsiți sănătoși în urma examenului medical și a rezultatelor analizelor de hematologie, biochimie, urină. Starea de sănătate a voluntarilor a fost determinată și post-studiu.

#### *Designul studiului*

Fiecare studiu s-a desfășurat în două perioade (STD 1 și 3) sau trei perioade (STD2), încrucișat, în fiecare perioadă participanților la studiu le-a fost administrată alternativ, pe cale orală, câte o doză de 400 mg ibuprofen (STD1) sau 200 mg ibuprofen (STD2 și 3). Au fost administrate fie formulări experimentale (tratament respectiv produs farmaceutic notat mai departe cu indicativul T, T1 sau T2) respectiv din formulări de referință (tratament și produs farmaceutic notat mai departe cu R). Timpul de repaus dintre perioade a fost de o săptămână.

Orarul de prelevare a probelor sanguine a fost după cum urmează:

STD1, Fasting: 0, 0.167, 0.33, 0.5, 0.67, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 ore

STD1, Fed: 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.33, 2.67, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12 ore

STD2, Fasting: 0, 0.167, 0.25, 0.33, 0.5, 0.667, 0.833, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 5, 7, 9, 12 ore

STD2, Fed: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 12, 14, 18 ore

STD3, Fasting: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 ore

STD3, Fed: 0, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 ore

Au fost prelevate probe sanguine (5 ml, puncție venoasă) după administrarea dozei. După centrifugarea probelor sanguine, plasma a fost separată și păstrată la  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  până la analiză.

## **B.2.2 METODA ANALITICĂ ȘI VALIDAREA**

### ***Descrierea***

Studiul analitic s-a efectuat pentru a măsura concentrațiile medicamentoase plasmatiche ale ibuprofenului în probele biologice obținute în studiile clinice.

Acest studiu s-a efectuat în conformitate cu prevederile Protocolului clinic și analitic aprobat de Autoritățile Competente și cu Regulile de Bună Practică în Studiu Clinic, respectiv cu Principiile de bună practică de laborator. Metoda analitică a fost validată în conformitate cu prevederile Ghidului european privind testarea bioechivalenței și biodisponibilității 1498/2010Rev 1<sup>7</sup> și Ghidului FDA pentru industrie referitor la validarea metodelor bioanalitice.<sup>6</sup>

S-a folosit o metodă simplă, rapidă și sensibilă LC/MS/MS pentru cuantificarea ibuprofenului din plasmă.<sup>22</sup>

### ***Determinarea cantitativă***

Pentru dozarea ibuprofenului din plasmă s-a folosit cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) cuplată cu spectrometria de masă<sup>23</sup>.

#### Aparatura:

- pompă binară Agilent 1100
- autosampler cu termostat Agilent 1100
- termostat Agilent 1100
- detector spectrometru de masă cu trapă ionică Ion Trap VL, Agilent

#### Condițiile de lucru:

- Coloana: Zorbax RX C18 3.0 x 100mm, 3 $\mu$  (Agilent Technologies)
- metanol : acetat de amoniu 10 mM în apă 60:40, v/v
- Debitul: 0.3 ml/min, temperatura: 25 $^{\circ}$  C
- Volumul de injecție: 30  $\mu$ l

#### Pregătirea probelor

La 1000  $\mu$ l plasmă s-au adăugat 100  $\mu$ l soluție standard intern diclofenac sodic 103 $\mu$ g/ml (DCL), proba s-a agitat pe vortex timp de 5 secunde la 1500 rpm, s-au adăugat 100  $\mu$ l acid fosforic 1.4N, urmată de agitare pe vortex 5 secunde la 1500 rpm. Probelor astfel pregătite li s-au adăugat 5 ml amestec dietil eter : hexan = 80 : 20. Probele au fost agitate, timp de 25 minute la 1000 rpm și apoi centrifugate. 4 ml din stratul organic au fost transferați în alt tub de polipropilenă și evaporăți la sec sub un curent de azot. Reziduul a fost reconstituit cu 200 $\mu$ l fază mobilă, vortexat 1 minut la 2400 rpm și injectat în sistemul HPLC. Detecția ibuprofenului s-a realizat în mod MRM, utilizând ionizare electrospray în mod negativ, tranziția ionică monitorizată fiind  $m/z\ 205 > m/z\ (159+161)$ , suma abundenței ionilor  $m/z\ 159$  și  $m/z\ 161$  a fost monitorizată și corelată cantitativ cu concentrația de ibuprofen. Detecția standardului intern s-a realizat la fel, în mod MRM, utilizând ionizare electrospray în mod negativ, tranziția ionică monitorizată fiind  $m/z\ 293 > m/z\ 250$ . Timpul de retenție pentru ibuprofen a fost de 4.7 min (Figura B.2.3) și datorită detecției specifice nu s-au observat interferențe semnificative la timpul de retenție în probele de plasmă blanc.

## **B.2.3 CONCENTRAȚIILE PLASMATICE ALE IBUPROFENULUI**

Toate calculele farmacocinetice și statistice prezentate în acest capitol se bazează exclusiv pe valorile concentrațiilor plasmatiche ale ibuprofenului .

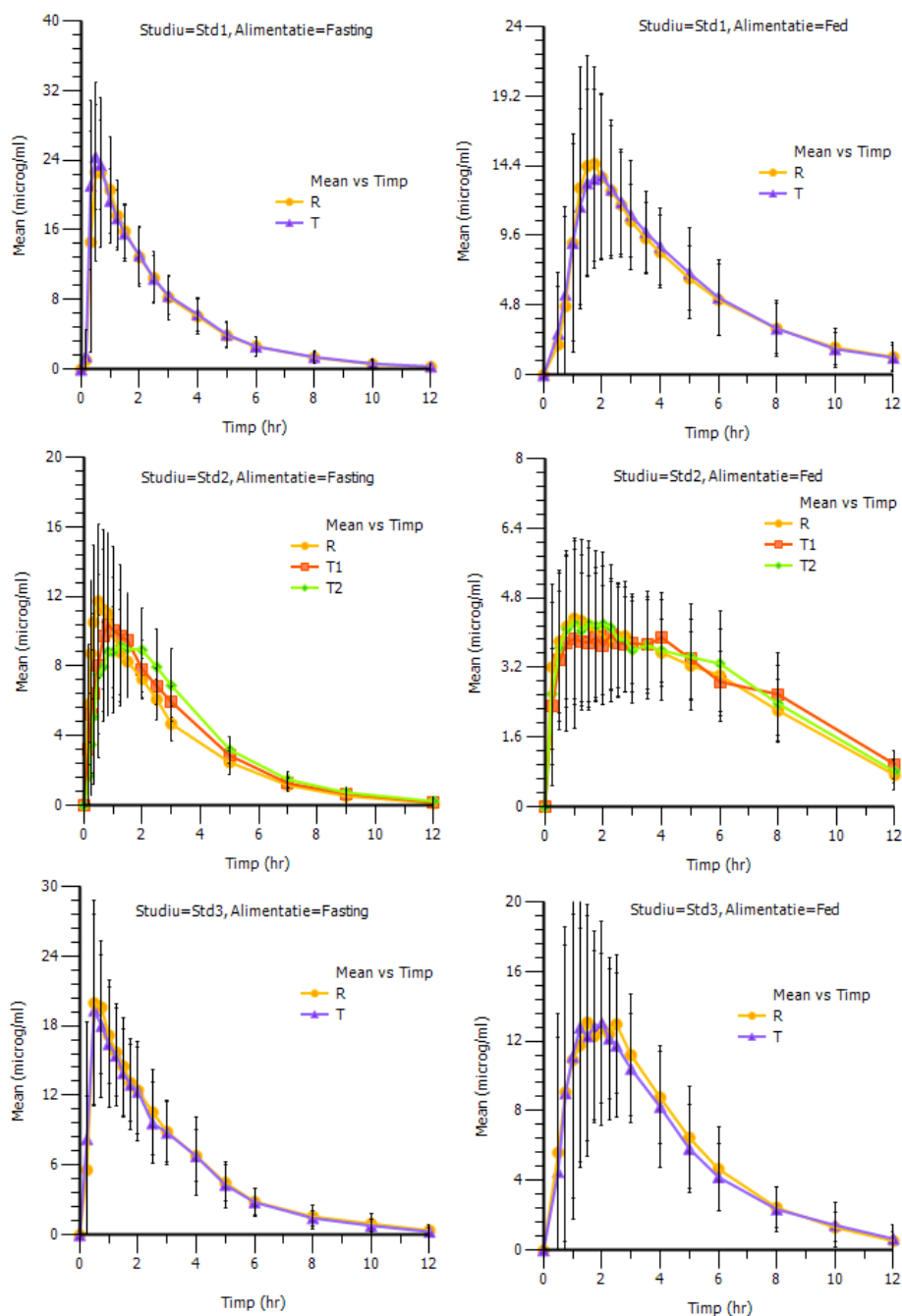


Figura B.2.4 Concentrațiile plasmatice medii ale ibuprofenului în urma administrării unei doze unice de ibuprofen pe cale orală la voluntari sănătoși

### B.2.3.1 ANALIZA FARMACOCINETICĂ NONCOMPARTIMENTALĂ

Pentru efectuarea analizei farmacocinetice noncompartimentale, a fost utilizat programul Kinetica 4.2. Au fost calculați următorii parametri farmacocinetici: concentrația maximă ( $C_{max}$ ), timpul de maxim ( $T_{max}$ ), aria de sub curbă observată ( $ASC_{last}$ ), aria de sub curba totală ( $ASC_{inf}$ ) și procentul ariei de sub curbă extrapolată ( $ASC_{\%}$ ), constanta de viteza a eliminării ( $\lambda_z$ ), timpul de înjumătățire ( $t_{1/2}$ ), timpul mediu de rezidență (TMR), clearance-ul aparent ( $Cl_F$ ), volumul de distribuție aparent ( $Vz_F$ ).

Analiza parametrilor farmacocinetici obținuți în *Studiul 1* arată că ibuprofenul administrat fără alimente are o concentrație maximă  $C_{max}$  de aproximativ  $26 \mu\text{g/ml}$  pentru ambele formulări administrate, la un timp  $T_{max}$  de aproximativ 0.6 ore. Aria totală de sub curba concentrație-timp a fost de aproximativ  $65\text{-}67 \mu\text{g/ml}\cdot\text{oră}$  pentru cele două formulări farmaceutice, iar timpul mediu de rezidență în organism de aproximativ 2.9 ore. În cazul în care ibuprofenul a fost administrat cu alimente, parametrii lui farmacocinetici se modifică semnificativ. Astfel, concentrația maximă scade

la 17 µg/ml, timpul de maxim creşte la 2 ore. De asemenea, aria totală de sub curbă creşte la 74 µg/ml\*oră iar timpul mediu de rezidență devine aproximativ 5 ore. Observații similare se pot face și pentru celelalte două studii.

### **B.2.3.2 BIODISPONIBILITATEA COMPARATIVA. BIOECHIVALENTA IBUPROFENULUI**

Într-o prima etapă, a fost realizată analiza statistică comparativă a parametrilor farmacocinetici ai ibuprofenului administrat în cele trei studii, cu sau fără alimente, sursele de variabilitate considerate fiind tipul de formulare respectiv subiecții (analiza ANOVA 2-way). Rezultatele analizei statistice efectuate este prezentată în tabelele B2.23-B.2.25a-c. Semnificația statistică semnificativă s-a considerat pentru  $p < 0.05$

Analizând rezultatele testelor statistice din tabelele prezentate anterior, se poate observa că o trăsătură comună este faptul că datorită variabilității interindividuale (inter-subiect), pentru cei mai mulți parametri farmacocinetici există diferențe statistic semnificative în cadrul grupului. În unele cazuri totuși, nu s-au evidențiat diferențe statistic semnificative între subiecți pentru parametri precum Tmax, TMR sau t1/2, parametri cu variabilitate inter-individuală mai mică.

Referitor la diferențele statistice ale parametrilor farmacocinetici ai ibuprofenului dependenți de produsul farmaceutic (test sau referință) administrat în fiecare studiu, se observă că în cele mai multe situații, acestea nu sunt semnificative statistic (Std1/Fasting și Fed, Std3/Fed). În câteva cazuri au fost detectate diferențe statistic semnificative pentru parametri precum Cmax (Std2/Fasting) sau ASCinf (Std2/Fasting și Fed, Std3/Fasting). Aceste diferențe se datorează proprietăților biofarmaceutice ale formei farmaceutice utilizate.

Pentru parametrii farmacocinetici Cmax, ASClast și ASCinf a fost realizat testul de bioechivalență prin calcularea intervalului de încredere 90% a raportului valorilor medii logaritmice (ANOVA) (Tabelul B.2.26). În conformitate cu prevederile interne și internaționale<sup>6,7</sup>, produsele s-au considerat bioechivalente dacă intervalul de încredere calculat este cuprins între valorile [0.8-1.25]. Valorile obținute, indiferent de tipul de studiu efectuat și de prezența sau absența alimentelor în momentul administrării ibuprofenului, se înscriu în intervalul de bioechivalență de 80-125%, deci toate produsele test sunt bioechivalente cu cele de referință.

Pentru parametrul Tmax s-a calculat diferența valorilor medii nelogaritmice dintre valorile produsului Test și a celui de Referință și s-a aplicat testul Friedman pentru detectarea unor diferențe semnificative. În fiecare caz analizat, diferențele găsite pentru parametrul Tmax nu au fost semnificative statistic.

### **B.2.3.3 INFLUENȚA ALIMENTELOR ASUPRA FARMACOCINETICII IBUPROFENULUI**

În capitolul s-a arătat că forma farmaceutică administrată (Test sau Referință) nu are o influență semnificativă asupra farmacocineticii ibuprofenului.

Din acest motiv, pentru a studia efectul alimentației asupra farmacocineticii, s-au calculat concentrațiile plasmatice medii ale ibuprofenului pentru fiecare studiu clinic, în funcție de alimentație, dar fără a se ține cont de tipul de formă farmaceutică administrată (Figura B.2.9).

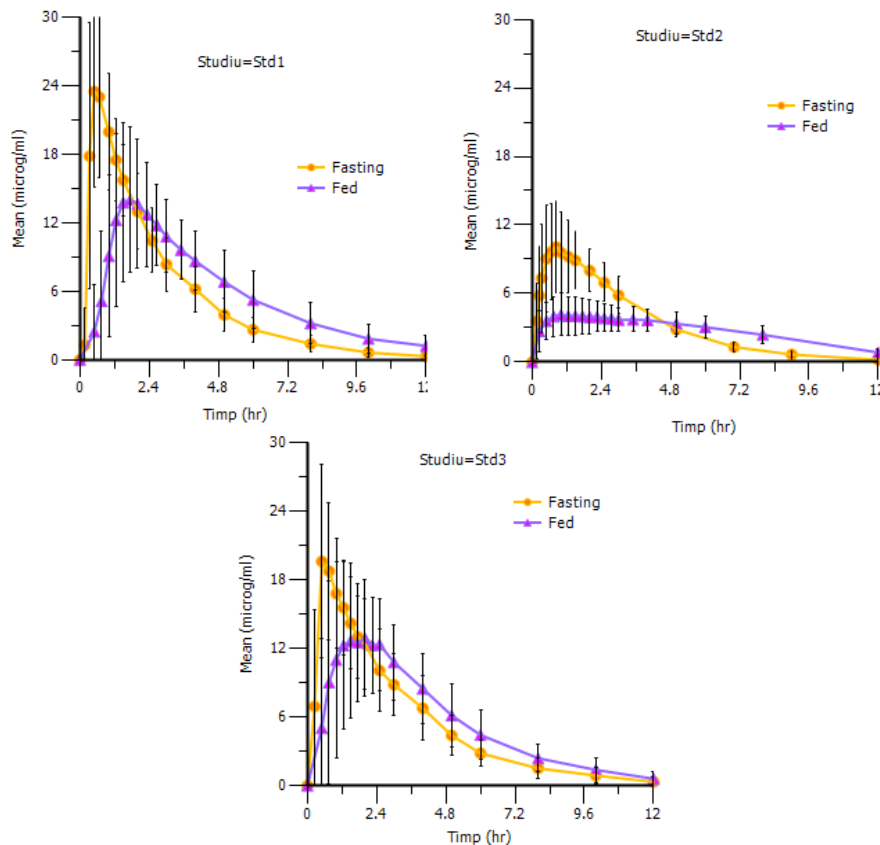


Figura B.2.9. Influența alimentației asupra profilurilor plasmatice ale ibuprofenului

Pentru toate cele trei studii clinice realizate, se observă o puternică influență a alimentelor asupra concentrațiilor plasmatice ale ibuprofenului, ceea ce se va reflecta ulterior în diferențe între parametrii săi farmacocinetici

A fost realizată analiza statistică a parametrilor farmacocinetici ai ibuprofenului, pentru fiecare studiu în parte (analiza 1-way ANOVA), sursa de variabilitate fiind alimentația. Rezultatele obținute, pentru fiecare studiu respectiv produs farmaceutic administrat, sunt prezentate în Tabelele B.2.30a-c

Analiza rezultatelor statistice prezentate în tabelele anterioare arată că parametrii farmacocinetici corelați cu viteza de absorbție se modifică semnificativ sub influența alimentației ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ). De asemenea, timpul mediu de rezidență TMR care depinde indirect de valorile concentrațiilor plasmatice în timp este semnificativ statistic influențat de alimentație. Datorită faptului că alimentația scade viteza de absorbție, aceasta ar putea deveni în unele cazuri mai mică decât cea de eliminare, iar panta dreptei terminale a graficului  $\ln(\text{concentrație})$  în funcție de timp va reflecta constanta de absorbție și nu pe cea de eliminare (fenomenul flip-flop). Din acest motiv și între valorile  $\lambda_z$  (și implicit  $t_{1/2}$ ) s-au găsit valori semnificativ statistic în funcție de alimentație. Totuși, parametrii care depind mai puțin de viteza absorbției și mai mult de mărimea absorbției (Aria de sub curbă –  $ASCl_{ast}$ ,  $ASCl_{inf}$ ) nu sunt de regulă afectați semnificativ de alimentație, ceea ce dovedește că masa de ibuprofen absorbită și care ajunge în circulația sistemică este relativ egală între absența/prezența alimentelor.

#### B.2.4 ANALIZA FARMACOCINETICA COMPARTIMENTALA

Spre deosebire de analiza farmacocinetică noncompartimentală care este independentă de model, analiza compartimentală presupune existența unor considerații preliminare referitoare la procesele cinetice în care este implicată substanța medicamentoasă. Aceste procese pot fi absorbția, distribuția, eliminarea pe cale metabolică sau renală. În analiza farmacocinetică compartimentală se creează modele farmacocinetice pentru care se scriu o serie de ecuații matematice, fiecare reprezentând un anumit proces cinetic.

Utilizând concentrațiile plasmatiche ale ibuprofenului obținute în urma experimentului farmacocinetic descris la capitolul B.2.5, a fost realizată analiza farmacocinetică compartimentală pentru aceste două substanțe.

Pentru efectuarea analizei farmacocinetice compartimentale, a fost utilizat programul de calculator WinNonlin (Pharsight).

#### *Metoda în analiza farmacocinetică compartimentală*

Scopul analizei farmacocinetice compartimentale este, în primul rând, identificarea modelului farmacocinetic care descrie cel mai bine valorile concentrațiilor plasmatiche ale substanței obținute în urma studiului clinic și analitic. Apoi, utilizând modelul farmacocinetic optim, se pot calcula parametrii farmacocinetici specifici modelului și care descriu procesele cinetice ale substanței medicamentoase în organism.

Selecția modelului care descrie cel mai bine farmacocinetica substanței s-a realizează utilizând o serie de teste statistice care exprimă cantitativ acuratețea potrivirii. În studiul de față criteriul primar utilizat pentru discriminarea modelelor concurente propuse a fost indicele Akaike (notat în continuare AIC). Au fost analizate, prin utilizarea a 6 modele farmacocinetice, valorile medii ale profilurilor plasmatiche ale ibuprofenului pentru fiecare studiu/tip alimentație în parte, în final 6 seturi de date.

#### *Modelul farmacocinetic monocompartimentat*

Au fost propuse pentru analiză patru modele farmacocinetice monocompartimentale pentru ibuprofen, diferențele dintre ele constând în existența sau nu a unui timp de latență până la începerea absorbției (mai precis, până la apariția substanței în circulația sistemică) respectiv considerații referitoare la valorile relative ale constantelor proceselor de absorbție și eliminare ( $k_{01}=k_{10}$  sau  $k_{01}\neq k_{10}$ ).

Primul model (M1) consideră că absorbția are loc după o cinetică de ordinul 1, fără a exista timp de latență și  $k_{01}\neq k_{10}$ .

Modelul 2 (M2) consideră de asemenea că cinetica absorbției este de ordinul 1, dar aceasta nu începe imediat după administrare, ci după un timp de latență (t<sub>lag</sub>), de asemenea  $k_{01}\neq k_{10}$ .

Modelele 3 și 4 (M3 și M4) sunt similare modelelor M1 și M2 caracterizate mai sus, cu excepția faptului că  $k_{01}=k_{10}$ .

Modelul 5 (M5) considera cinetica absorbției de ordinul 1,  $k_{01}\neq k_{10}$ , distribuție bi-compartimentală, fără timp de latență a absorbției. Modelul 6 (M6) este similar modelului 5, dar presupune existența timpului de latență a absorbției.

#### *Modelul farmacocinetic bicompartimentat*

Față de modelul monocompartimentat prezentat anterior, acest model consideră că pot exista echilibre de distribuție ale ibuprofenului între compartimentul central și un compartiment periferic. Ca și în cazul anterior vor fi testate două modele farmacocinetice, diferența între ele fiind existența unui timp de latență la modelul M6 față de M5 (unde absorbția începe imediat).

#### *Alegerea celui mai bun model farmacocinetic simplu*

Modelul farmacocinetic corelat cel mai bine datele experimentale este caracterizat de un indice Akaike minim. Pentru a-l identifica, au fost comparate valorile Akaike medii ale celor 6 modele analizate anterior (Fig. B.2.17).

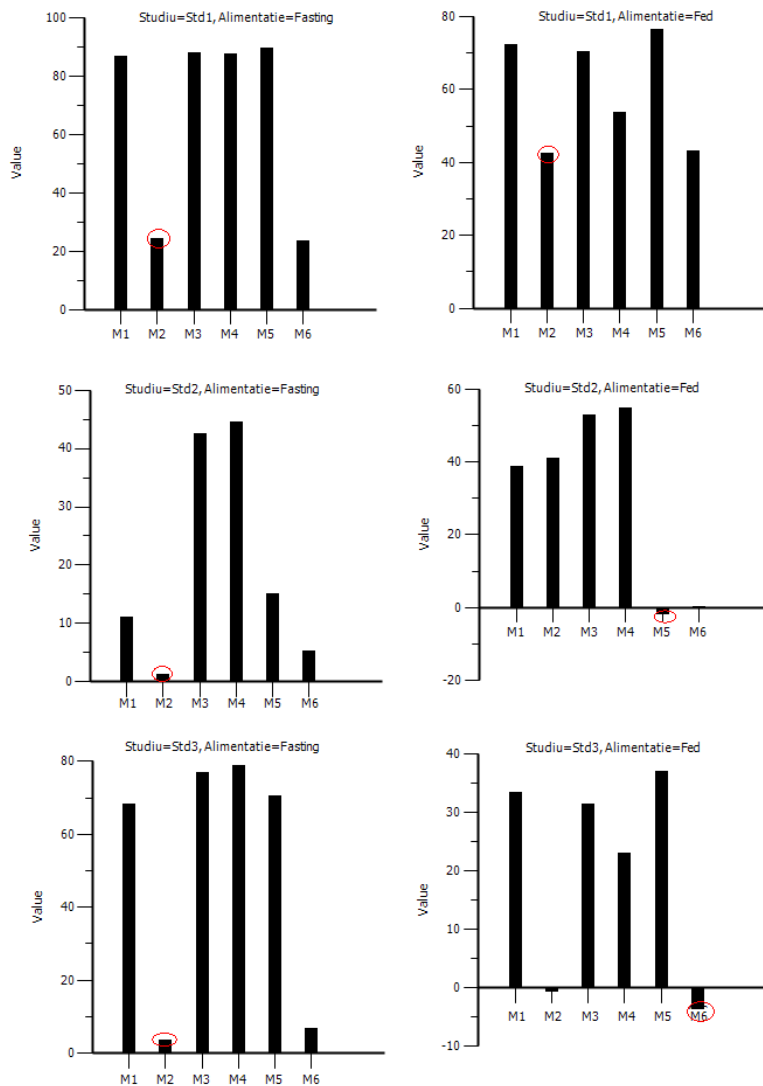


Figura B.2.17 Valorile Akaike pentru modelele farmacocinetice testate, raportat la seturile de date analizate

După cum se observă analizând Fig.B.2.17, cu două excepții, modelul farmacocinetic M2 potrivește cel mai bine profilurile plasmatiche ale ibuprofenului administrat sub diferite forme farmaceutice (studiile 1-3), cu sau fără alimente, urmat îndeaproape de modelul M6. Cele două excepții sunt reprezentate de datele corespunzătoare studiului 2 /Fed, pentru care modelul optim este M5, respectiv studiul 3/Fed, cu modelul optim M6.

În cazul studiului 2/Fed, deși aparent modelul cel mai bun este M5, nu trebuie pierdut din vedere faptul că analizele efectuate arată că modelul M5 este cel mai bun model din cele studiate, fără însă a fi o garanție ca nu exista și un model mai adecvat. O analiză a potrivirii modelului M5 la datele studiului 2/Fed ( Figura 15, profilul 4) arată ca totuși partea terminală a profilului plasmatic nu este bine potrivită nici cu modelul M5. Mai mult, o reprezentare grafică tip concentrație prezisă versus concentrație determinată, care pentru o potrivire ideală este o linie egală cu identitatea, arată o deviere sistematică de la linia identității, în special în zona de concentrații mici. Cu alte cuvinte, nici acest model nu descrie satisfăcător farmacocinetica ibuprofenului administrat în Std2/Fed. Probabil efectul alimentelor asupra vitezei de absorbție a ibuprofenului este complex iar datele plasmatiche nu se pot analiza utilizând modelele farmacocinetice clasice.

Referitor la datele de la Std3/Fed, care sunt potrivite optim de modelul M6, nu trebuie uitat că acesta este foarte asemănător cu modelul M2 doar că presupune existența proceselor de distribuție. Deși modelul M6 este indicat ca cel mai bun în funcție de valoarea Akaike, totuși el trebuie să aibă o



capacitate de calcul a constantelor farmacocinetice cu o acuratețe adecvată. O analiză comparativă a coeficienților de variație ai erorii standard a mediei, care caracterizează precizia determinării valorii unui anumit parametru farmacocinetic, pentru modelele M2 și M6 aplicate la datele de la Std3/Fed, este prezentată în Tabelul B.2.31

Analizând datele prezentate în Tabelul B.2.31, se observă că deși modelul M6 potrivește mai bine datele de la Std3/Fed, totuși are o capacitate redusă de estimare *precisă* a parametrilor calculați, eroarea procentuală ajungând chiar până la 98% în cazul valorii K<sub>12</sub>. În schimb, modelul M2 are o capacitate mult mai bună de estimare precisă a parametrilor, eroarea procentuală maximă fiind de 7.48%. Din acest motiv, și pentru Std3/Fed va fi considerat model reprezentativ tot modelul M2 și nu M6.

Dupa analiza globală a rezultatelor analizei farmacocinetice compartimentale, pentru 5 din cele 6 combinații studiu/tip alimentație s-a arătat că modelul farmacocinetic optim este M2, în timp ce pentru Std2/Fed nu s-a identificat modelul farmacocinetic optim, datorita complexității procesului de absorbție, sub influența alimentației.

Concluzionând, s-a dovedit ca farmacocinetica ibuprofenului este descrisă optim de modelul farmacocinetic monocompartmentat, cinetica absorbției de ordinul 1, cu timp de latență și utilizând acest model, au fost determinați parametrii farmacocinetici individuali și medii ai ibuprofenului.

### B3. BIOCATALIZA

#### B3.1. BIOCATALIZA CU CELULE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Dintre toate microorganismele, drojdia alimentara este unul dintre cele mai utilizate.

Reducerea asimetrica a grupărilor carbonil este una dintre cele mai importante, fundamentale și practice metode de a obține alcooli neracemici, care pot fi ulterior transformați într-o gama variata de compuși. Reducerea asimetrica poate fi grupata in doua mari categorii: chimica și biologica. O selectivitate (regio-, chemo-, enantioselectivitate) inalta poate fi atinsa ca urmare a interacțiunii substratului cu enzima in procesele de bioreducere. Dehidrogenazele și reductazele clasificate cu codul E.C. 1.1.1 sunt enzime care catalizează reducerea grupărilor carbonilice. Substratul natural al acestora este etanolul, lactatul, glicerina, etc, dar ele pot reduce și alte cetone nenaturale in mod enantiotopselectiv, conform regulii lui Prelog (Figura B3.3).

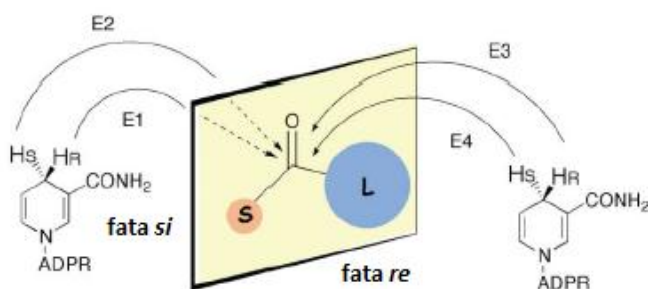


Fig. B3.3. Stereochimia transferului ionului de hidrua pe gruparea carbonilica, conform regulii lui Prelog (S-grupare mica, L-grupare voluminoasa).

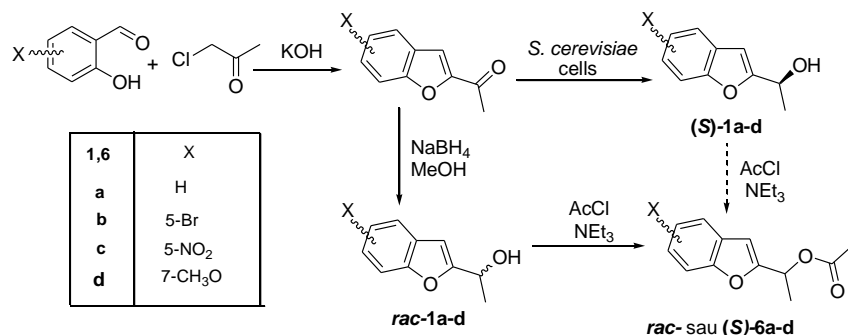
#### B.3.1.1 Obținerea unor alcooli heteroaromatici chirali prin reduceri enantiotopselective a acetil-benzofuranilor și ale unor derivați $\alpha$ -substituiți cu celule de *S. cerevisiae*

Activitatea biologica a derivaților de benzofuran este o preocupare veche și constanta in domeniul chimiei medicale.<sup>24</sup> Literatura prezinta multiple studii referitoare la activitatea lor anticanceroasa,<sup>25</sup> antimicrobiana,<sup>26</sup> cardiovasculara,<sup>27</sup> chiar antivirala, o serie de compusi fiind deja testate pentru inhibarea virusului HIV.<sup>28</sup>

Reducerea cetonei prochirale mediată de drojdia alimentară este în general un proces enantiotopselectiv, care depinde în primul rând de natura substratului utilizat, dar și de condițiile în care este realizat procesul. Metilcetonele sunt unul dintre cele mai studiate substraturi, fapt relevat de multiplele studii publicate în literatura de specialitate.<sup>29</sup>

### B.3.1.1.A Sinteza unor etanoli chirali prin reducerea enantiotopselectivă a 2-acetilbenzofuranilor substituiți la inelul aromatic

2-Acetilbenzofuranii au fost preparați prin reacția de condensare-ciclizare a sării de sodiu a aldehidei salicilice corespunzător substituită cu cloroacetona în prezența hidroxidului de potasiu (Schema B3.1).



Schema B3.1.  
Sinteza și bioreducerea 2-acetilbenzofuranilor cu celulele de *S. cerevisiae*

Pentru determinarea condițiilor optime de realizare a bioreducerii a fost utilizat 2-acetilbenzofuranul ca și compus model. Procesul s-a realizat în sistem fermentativ (în prezența zaharozei) și nefermentativ. În primul caz procesul a fost mai rapid, dar selectivitatea a fost destul de redusă (80% randament, ee 20% după 2 zile). Sistemul nefermentativ (60% randament și ee 55% după 7 zile) a fost ales și utilizat și pentru derivații substituiți la nucleul aromatic (Tabelul B3.1).

Tabelul B3.1. Reducerea 2-acetilbenzofuranilor în sistem nefermentativ după 7 zile

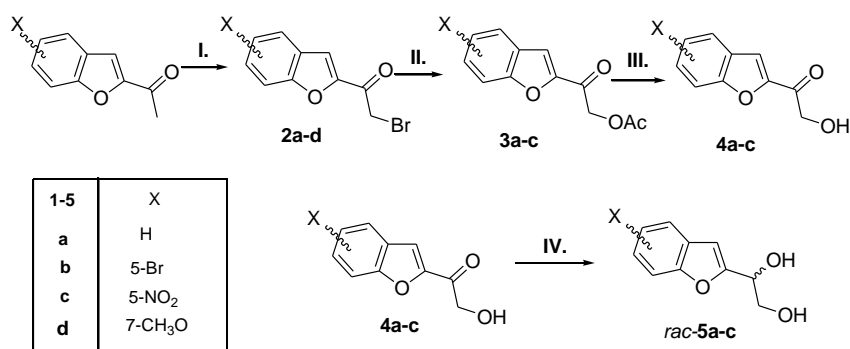
| Produs | $\eta$ (%) | $[\alpha]_D^*$ | ee (%) |
|--------|------------|----------------|--------|
| (S)-1a | 60         | -9.1           | 55     |
| (S)-1b | 74         | -9.4           | 65     |
| (S)-1c | 61         | -16.8          | 88     |
| (S)-1d | 66         | -10.2          | 68     |

\* la 20 °C, în cloroform

Configurația absolută a fost determinată pe baza datelor din literatura<sup>30</sup>, enantiomerii etanolului **1a** fiind deja cunoscuți și a rotațiilor optice specifice. Determinarea exceselor enantiomerice s-a realizat prin analiza gaz cromatografică a acetatilor etanolilor utilizând o coloană chirală cu  $\beta$ -ciclodextrina permetilată. De asemenea a fost realizată și separarea pe HPLC pe coloane chirale (*S,S*- și *R,R*-Whelk, ocazie cu care a fost semnalată și ordinea de eluare inversă a alcoolilor, în funcție de faza staționară chirală.

### B.3.1.1.B. Reducerea 2-acetilbenzofuranilor $\alpha$ -substituiți la etandiolii chirali

Metoda biocatalitică dezvoltată de colectivul nostru pentru sinteza ambilor enantiomeri ai (*R*- și (*S*)-1-(benzofuran-2-il)-1,2-etandiolilor are la bază reducerea enantiotop selectivă mediată de celulele de drojdie a unor derivați  $\alpha$ -substituiți ai acetilbenzofuranilor.<sup>31</sup> Acest procedeu a fost ulterior optimizat și pentru alte tipuri de etandiolii heterociclici, fiind dezvoltată o metodă one-pot, care utilizează ca materie primă cetonile corespunzătoare.<sup>32</sup> Succesiunea de reacții necesare pentru efectuarea  $\alpha$ -derivatizării este prezentată în Schema B3.2. Prin  $\alpha$ -bromurarea selectivă a cetonelor substituite cu brom în diclorometan și transformarea lor ulterioară cu acetat de sodiu ca reactant în dioxan ca solvent și eter coroană 18C6 ca și catalizator de transfer interfațial au fost obținute  $\alpha$ -acetoxi-metilcetonele **3a-c**. Metoxidul corespunzător **4d** nu a putut fi izolat în stare pură, datorită instabilității sale. În continuare, prin etanoliza enzimatică a acestora cu lipaza B din *Candida antarctica* imobilizată pe celită (*Novozym 435* ca preparat comercial) au fost sintetizate cu randamente excelente  $\alpha$ -hidroximetilcetonele **4a-c**. În final, acești derivați au permis sinteza 1,2-etandiolilor racemici *rac*-**5a-c** prin reducere neselectivă cu borohidru de sodiu.



Scheme B3.2. Sinteze chimice implicate in bioprosesarea 2-acetil-benzofuranilor  $\alpha$ -substituiti studiate

I. Br<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; II. CH<sub>3</sub>COONa<sup>+</sup>, 18C6/1,4-dioxane; III. Novozyme 435/EtOH; IV. NaBH<sub>4</sub>/MeOH

Pentru monitorizarea proceselor de bioreducere cu celule de *Saccharomyces cerevisiae* a fost elaborată metoda de separare cromatografică a enantiomerilor compușilor racemici *rac-5a-c* (Fig. B3.4).

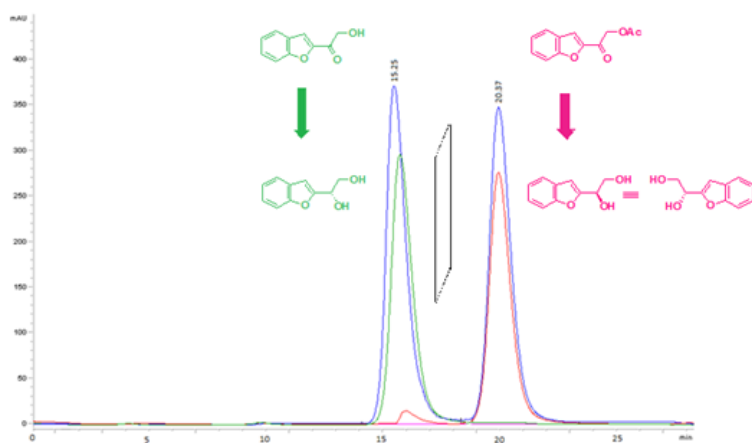


Fig. B3.4. Cromatograma etan-diolului racemic *rac-5a* (linia albastra) și a celor obținuți prin biotransformarea cu celule de *S. cerevisiae* pornind de la  $\alpha$ -hidroxi ((*S*)-*5a*, linia verde) respectiv de la  $\alpha$ -acetoxi-cetona ((*R*)-*4a*, linia roșie)

Table B3.2. Reducerea cu *S. cerevisiae* in sistem nefermentativ a cetonei prochirale cu structura benzofuranică *3,4a-c*

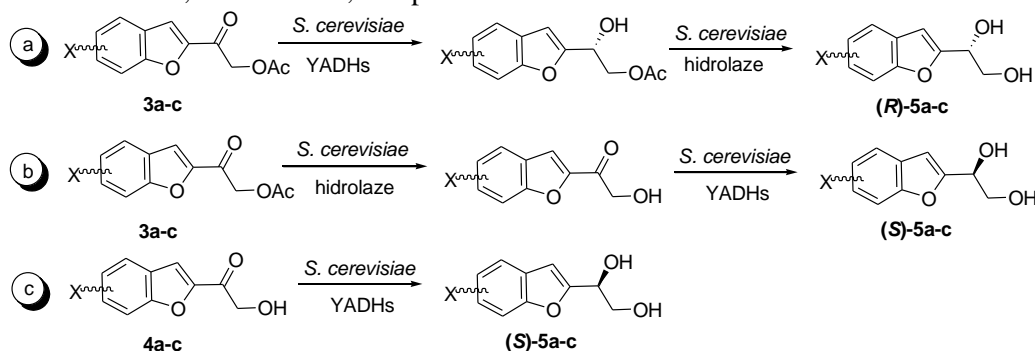
| Cetona    | Produs                  | Timp (h) | $\eta$ (%) | $[\alpha]_D^*$ | ee (%) |
|-----------|-------------------------|----------|------------|----------------|--------|
| <b>3a</b> | ( <i>R</i> )- <b>5a</b> | 72       | 75         | +24.1          | 84     |
| <b>3b</b> | ( <i>R</i> )- <b>5b</b> | 72       | 82         | +21.7          | 91     |
| <b>3c</b> | ( <i>R</i> )- <b>5c</b> | 72       | 80         | +19.0          | 91     |
| <b>4a</b> | ( <i>S</i> )- <b>5a</b> | 24       | 60         | -25.3          | 87     |
| <b>4b</b> | ( <i>S</i> )- <b>5b</b> | 24       | 74         | -22.1          | 92     |
| <b>4c</b> | ( <i>S</i> )- <b>5c</b> | 24       | 61         | -19.4          | 93     |

\* la 20 °C, in cloroform

Așa cum ne-am așteptat, biotransformarea  $\alpha$ -acetoximetilcetonelor **3a-c** și a  $\alpha$ -hidroxi-etanonei **4a-c** decurge cu enantioselectivitate diferită și cu selectivități înalte. Acest lucru poate fi explicat prin activitatea mai redusă a hidrolazelor comparativ cu cea a alcooldehidrogenazelor prezente în drojdie. Astfel  $\alpha$ -acetoximetilcetonile **3a-c** sunt reduse cu viteză mai mare și abia intermediarul format este substrat pentru hidrolaze, cu formarea *R*-etandiolilor (Schema B3.3, varianta a). Dacă etapa de hidroliza ar fi mai rapidă (Schema B3.3, varianta b),  $\alpha$ -hidroxi-etanonele formate intermediari ar conduce prin reducere la aceiași stereoizomeri ca și în cazul reducerii  $\alpha$ -hidroxi-etanonei **4a-c**, respectiv a *S*-etandiolilor (Schema B3.3, varianta c).

Excesul enantiomeric moderat de doar 42% obținut în sistem fermentativ (linia 1 în Tabelul B3.3) a crescut la 80% prin realizarea procesului în sistem bifazic hexan-apa (linia 4 în Tabelul B3.3) sau chiar la 82% în prezența L-cisteinei (linia 5 în Tabelul B3.3). În mod surprinzător, procesul

fermentativ a permis obținerea *S*-etandiolului **5a** cu excesul enantiomeric maxim (87%) dar cu un randament slab, de doar 60%, comparativ cu 80% în cazul anterior.



Scheme B3.3. Reacții posibile la biotransformarea cu celule de *S. cerevisiae* a  $\alpha$ -derivaților cetonei studiate

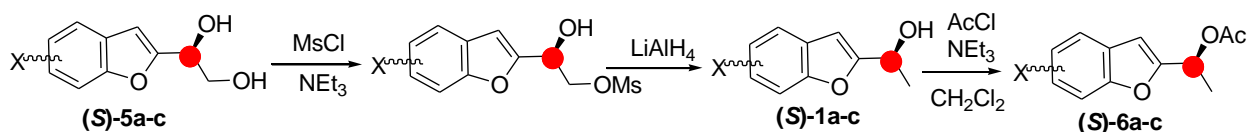
Tabelul B3.3. Efectul aditivilor în procesul de reducere cu *S. cerevisiae* a cetonei prochirale **4a** în sistem fermentativ după 24 ore

| Nr. | Aditiv (cantitate)         | Randament (%) | Configurația absolută <b>5a</b> | ee <sup>b</sup> <sub>5a</sub> (%) |
|-----|----------------------------|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 1   | -                          | 75            | <i>S</i>                        | 42                                |
| 2   | Cloroacetat de etil (0.5%) | 36            | <i>S</i>                        | 54                                |
| 3   | Alcool alilic (0.5%)       | 46            | <i>S</i>                        | 61                                |
| 4   | Hexan (1:1, v:v)           | 56            | <i>S</i>                        | 80                                |
| 5   | L-cisteina (0.5%)          | 80            | <i>S</i>                        | 82                                |
| 6   | <sup>c</sup>               | 60            | <i>S</i>                        | 87                                |

<sup>a</sup>determinată prin derivatizare chimică; <sup>b</sup>determinată prin HPLC; <sup>c</sup>în sistem nefermentativ

### Determinarea configurației absolute a etandiolilor

a presupus transformarea chimică a enantiomerilor puri prin reacții selective în etanolii corespunzători, a căror configurație absolută a fost atribuită anterior prin succesiunea de reacții din Schema B3.4. După mesitlarea etandiolilor s-a efectuat reducerea cu hidrura de litiu și aluminiu, fără afectarea configurației atomului de carbon asimetric. Configurația și excesele enantiomerice ale etanolilor (*S*)-**1a-c** au fost apoi atribuite și etandiolilor folosiți ca reactanți (*S*)-**5a-c**.



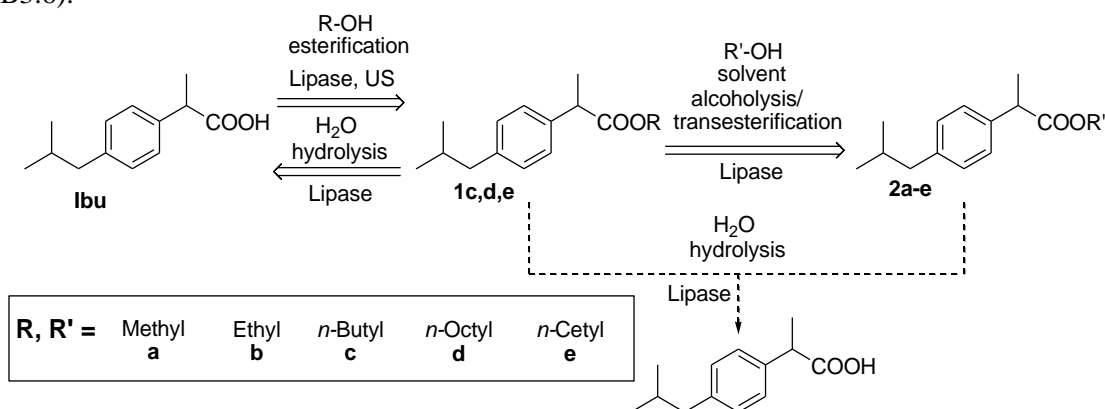
Scheme B3.4. Succesiunea de reacții pentru transformarea etandiolilor în etanoli.

### B.3.2. BIOCATALIZA CU LIPAZE. REZOLUTII CINETICE ENZIMATICE ALE RACEMATILOR

Ibuprofenul este un membru important al medicamentelor antiinflamatoare cu structura nesteroidică, derivați ai acidului propanoic. Activitatea inflamatoare (prin inhibarea ciclooxigenazelor) este datorată enantiomerului *S*, mult mai solubil în apă.<sup>33</sup> Enantiomerii (*R*) ai profenilor pot induce probleme, de exemplu acumularea în țesutul adipos, cu efecte secundare importante, unele necunoscute încă.<sup>34</sup>

Biocataliza oferă alternative ecologice se rezoluție a profenilor, în general prin rezoluții cinetice. Au fost semnalate deja mai multe lipaze și esteraze cu enantioselectivitate înaltă în clasa profenilor. În ultimele două decenii au fost utilizate atât metodologii hidrolitice, cât și alcoolize și aminolize în medii neconvenționale.<sup>35</sup>

Din aceste motive, ținând cont de importanța de dezvoltare a unor metode eficiente de rezolvare a racemaților profenilor, a fost efectuat un studiu experimental sistematic al rezoluției cinetice enzimice a esterilor racemici ai ibuprofenului, ales ca și compus model, cu alcooli grași.<sup>36</sup> A fost studiat efectul dimensiunii catenei alcoolului utilizat în toate procesele de rezoluție teoretic posibile în prezența lipazelor: esterificare, hidroliza și transesterificare/alcooliza (Schema B3.5 și B3.6).



Schema

B3.5. Posibilități de transformare a ibuprofenului și a esterilor săi în prezența lipazelor

Prezența lipazei în amestecul de reacție face ca toate tipurile de reacții posibile: esterificare, transesterificare/alcooliza, dar și hidroliza să fie stereoselective. Configurația produsilor care se obțin depinde de stereoselectivitatea enzimei. Prezența apei în amestecul de reactivi, fie din solventul organic utilizat, fie din rezidua din preparatul enzimatic, determină apariția unor reacții secundare de hidroliza, chiar și în cazul (trans)esterificării, catalizate la rândul lor de lipaze. Această reacție, deși secundară, poate decurge de asemenea stereoselectiv datorită catalizatorului prezent în amestec, dar determină în același timp scăderea randamentului procesului enzimatic, cu formarea ca produs secundar a unui enantiomer al ibuprofenului.

Mai întâi a fost studiată reacția de esterificare a ibuprofenului racemic cu mai mulți alcooli în prezența unor lipaze disponibile comercial (Schema 1, varianta a). Dintre toate enzimele testate (lipaza A și B din *Candida antarctica* (Cal-A și Cal-B), lipaza din *Candida rugosa* (CRL, AYS Amano) și *Pseudomonas cepaciae* (PS-C II), lipaza AK din *Pseudomonas fluorescens*, lipaza din pancreas porcine (PPL) și din *Mucor miehei* (MML)), numai Cal-B a fost suficient de activă și a catalizat obținerea *R*-esterului, respectiv recuperarea *S*-ibuprofenului. A fost studiat și efectul iradierii cu ultrasunete a procesului de esterificare. S-a constatat o creștere a vitezei de reacție ( $c > 13\%$  după o oră) în toate cazurile, dar concomitent cu scăderea enantioselectivității procesului ( $E = 1-5$ ). În ceea ce privește efectul alcoolului utilizat asupra eficienței procesului, s-a constatat că la realizarea esterificării în exces de alcool, odată cu creșterea catenei până la C16, activitatea enzimatică scade. Cele mai bune rezultate s-au obținut în cazul *n*-butanolului când cu lipaza B din *C. antarctica* imobilizată (Novozym 435) s-a atins o conversie de 12% și o selectivitate  $E = 5$ .

Activitatea oricărei enzime este dependentă de polaritatea solventului, care poate fi descrisă de lipofilitatea acestuia prin valoarea  $\log P$ . În general sinteza enzimatică a esterilor se desfășoară în condiții optime în solvent cu  $\log P > 4$ .<sup>37</sup>

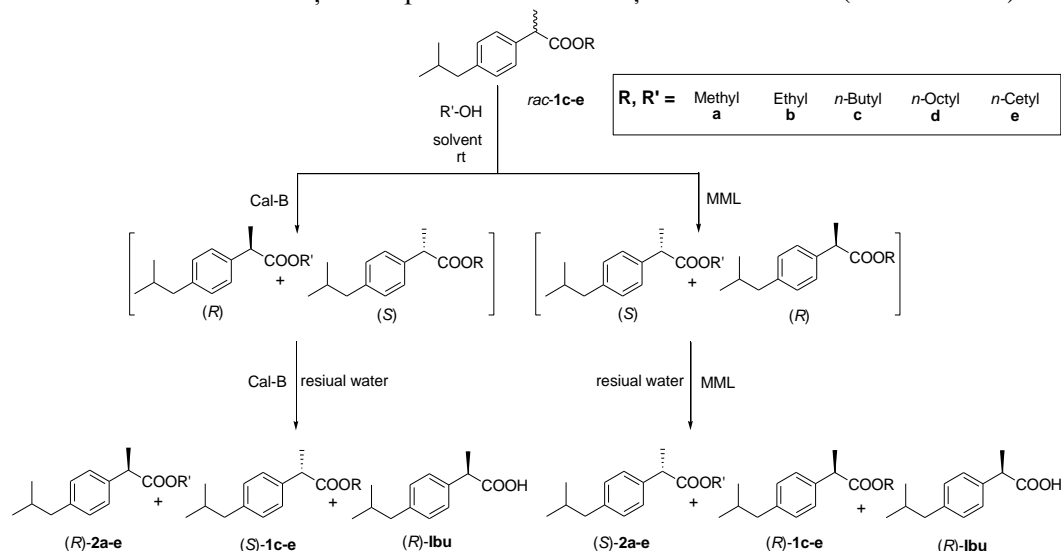
Pentru a alege cel mai bun solvent a fost ales ca și compus model esterul butilic și Cal-B ca și catalizator. Reacția de esterificare s-a realizat cu *n*-butanol (4 echiv.) în mai mulți solvent recomandați în literatura de specialitate (MTBE, *n*-octane, acetonitril, toluen, THF), constatându-se în toate cazurile o ușoară creștere a activității enzimei. Anumiți solvenți hidrofilici cum ar fi THF sau acetonitrilul leagă apa esențială care înconjoară și protejează enzima, determinând inactivarea acesteia ( $c \approx 13\%$  după 1 h), în timp ce în solvenți hidrofobi cum ar fi *n*-octanul și MTBE activitatea enzimatică este menținută sau chiar îmbunătățită (conversii de 20 și respectiv 14% după 1 h). În nici un caz nu s-a observat însă o îmbunătățire a stereoselectivității.

În continuare a fost studiată reacția de hidroliza enzimatică a esterilor cu alcooli grași (*rac*-1c-e) în prezența aceluiași lipaze și în aceiași solvenți, dar numai două enzime, Cal-B și MML au

prezentat o activitate enzimatica destul de redusa, concretizata in conversii mici (<15% după 48 h) si enantioselectivități reduse ( $E= 1-3$ ).

In concluzie utilizarea alcoolilor grași nu a permis obținerea unor performante semnificative cu lipazele disponibile comercial, nici in procesul de esterificare, nici in cel de hidroliza.

Bäckvall a prezentat recent<sup>38</sup> utilizarea unui mutant triplu al lipazei A din *Candida antarctica* cu o activitate de 30 de ori mai mare in reacțiile profenilor si cu o (*R*)- stereopreferinta ridicata, dar la conversii încă reduse. Pe baza rezultatelor sale si a unor studii anterioare ale grupului nostru in *O*-acilarea enzimatica cu acizi grași<sup>39</sup> ne-am hotărât sa studiem reacția de alcooliza (transesterificare) a esterilor racemici mai voluminoși ai ibuprofenului cu diferiți alcooli alifatici (Scheme B3.6).



Schema B3.6. Enantioselectivitatea opusa a lipazelor Cal-B si MML in alcooliza esterilor racemici ai Ibuprofenului

Ca si proces model a fost aleasa butanoliza esterului octilic (*rac-1d*) si au fost testați cinci solvenți (MTBE, *n*-octan, acetonitril, THF, toluen) in prezenta câtorva lipaze. Majoritatea lipazelor (Cal-A, PPL, AK, CRL/AYS Amano si PS) au fost complet inactive. Rezultatele obținute la scara analitica au evidentiat o *R*-enantioselectivitate înalta a Cal-B, in timp ce MML (lipaza din *Mucor miehei*) a prezentat o preferința opusa (Schema B3.6). In ambele cazuri, reacția secundara de hidroliza a esterilor sub acțiunea apei reziduale din preparatul enzimatic a decurs *R*-enantioselectiv.

Menționam aici ca, deși rara, *S*-selectivitatea inversa a unor lipaze a fost deja semnalata in literatura de specialitate la rezoluția Flurbiprofenului cu micelii liofilizate de *Aspergillus*.<sup>40</sup> In plus, lipaza MML si-a demonstrat deja *S*-selectivitatea in esterificarea Naproxenului racemic cu metanol.<sup>41</sup> Subliniem aici faptul ca procesul catalizat de MML este o rezoluție paralela divergenta care permite prepararea (*S*)-esterului cu enantiopuritate ridicata. Acesta poate fi ulterior transformat intr-un proces neselectiv in enantiomerul *S* al acidului printr-o hidroliza care sa nu afecteze configurația carbonului asimetric, cu randamente mari.

Pe baza studiilor preliminare prezentate, in continuare a fost studiat procesul de alcooliza cu mai mulți nucleofili (metanol, etanol, *n*-octanol si alcool *n*-cetic) a esterilor racemici (*rac-1c-e*) in prezenta celor doua lipaze cu enantioselectivități opuse, in aceiași solvent. Cele mai relevante din rezultatele obținute in urma acestui studiu complex sunt prezentate sugativ in Figura B3.5 (conversia) si Figura B3.6 (excesele enantiomerice ale celor doi esteri implicați in alcooliza si ale acidului format prin reacția secundara).

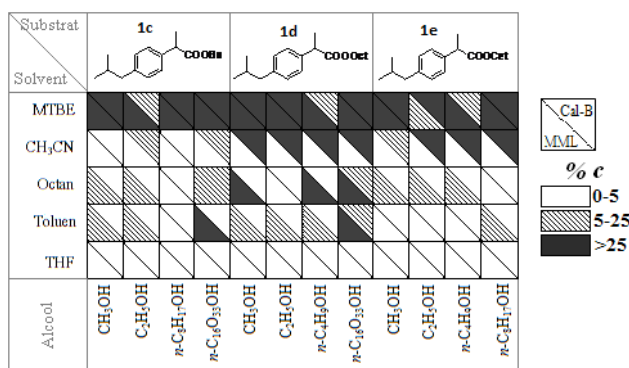


Fig. B3.5. Conversiile inregistrate la alcooliza esterilor racemici ai ibuprofenului (*rac*-**1c-e**) cu alcoolii alifatici in prezenta a doua lipaze cu enantioselectivitate opusa: Cal-B si MML



Fig. B3.6. Excesele enantiomerice ale produsilor obtinuti la alcooliza esterilor racemici ai ibuprofenului (*rac*-**1c-e**) cu alcoolii alifatici in prezenta a doua lipaze cu enantioselectivitate opusa: Cal-B si MML

Se observă că în toate situațiile produsul secundar format în urma hidrolizei, cu ambele enzime studiate, (*R*)-ibuprofenul, are o puritate optica aproape de 100% la utilizarea ca nucleofil a alcoolilor cu mai mult de 4 atomi de carbon. (*S*)- sau (*R*)-esterul format si (*R*)- or (*S*)-esterul netransformat in fiecare caz prezinta de asemenea un exces enantiomeric de la moderat la bun.

In ceea ce privește conversiile (Fig. B3.5), cel mai eficient solvent pentru alcooliza tuturor esterilor studiați cu MML este MTBE, cu excepția etanolizei esterului cetilic **1e** care se desfășoară în mod similar si cu viteze reduse atât în MTBE cat si în *n*-octan.

Alcooliza în prezenta Cal-B este de asemenea favorizată de MTBE, cu excepția butanolizei esterului octilic și cetilic (**1d,e**) care este mai eficientă în acetonitril și a etanolizei butil esterului, lentă inclusiv în acest solvent.

Datele din figura B3.5. arată ca esterul octilic poate fi alcoolizat eficient în *n*-octan. Utilizarea THF determină în toate situațiile studiate activitate redusă a enzimei, adică viteze reduse ale procesului.

Pe baza studiului amănunțit efectuat a fost aleasă pentru obținerea *S*-ibuprofenului varianta etanolizei esterului octilic racemic cu MML în MTBE când la conversii mai mari de 25% se obține *S* esterul etilic al ibuprofenului este în cea mai înaltă formă de puritate optică (ee circa 80%). După separarea amestecului rezultat, prin hidroliza acestuia se obține eutomerul urmărit cu ee de 80% la un randament global de 45% (față de maxim 50% dacă se raportează la esterul octilic racemic inițial),

## CONCLUZII GENERALE

1. A fost realizată analiza farmacocinetică a concentrațiilor plasmatice a Ketorolacului obținute în urma unui studiu clinic în care s-au administrat 10 mg de ketorolac trometamina racemic la voluntari sănătoși. Produsele farmaceutice (formularea Test și Referință) au fost administrate într-un design cross-over (fiecărui voluntar i se administrează, pe rând, ambele produse, într-o manieră încrucișată).
  - Metoda bioanalitică enantioselectivă, dezvoltată și validată în scopul utilizării în analiza probelor provenite de la studiul de farmacocinetică s-a dovedit adecvată, robustă și reproductibilă.
  - În prima parte a analizei datelor obținute a fost aplicată analiza farmacocinetică noncompartimentală la valorile parametrilor farmacocinetici  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $ASC_{last}$ ,  $ASC_{inf}$ ,  $k_{el}$ ,  $t_{1/2}$ , TMR, Cl și Vd.
  - Au fost efectuate testele de bioechivalență pentru fiecare din cei doi enantiomeri R(+) și S(-) după administrarea produsului test și a celui de referință. Calculele arată că, atât viteza cât și mărimea absorbției este similară și deci toate produsele farmaceutice sunt bioechivalente și interschimbabile.
  - S-a confirmat existența unei farmacocinetici diferite pentru cei doi enantiomeri ai ketorolacului ceea ce justifică analiza individuală a biodisponibilității acestora și investigarea în continuare a farmacologiei fiecărui enantiomer în parte în vederea dezvoltării unor forme farmaceutice folosind substanțe medicamentoase enantiopure
2. A fost realizată analiza farmacocinetică a concentrațiilor plasmatice ale ibuprofenului obținute în urma a trei studii clinice în care s-au administrat 400/200 mg de ibuprofen la voluntari sănătoși. Produsele farmaceutice (formularea Test și Referință) au fost administrate într-un design cross-over (fiecărui voluntar i se administrează, pe rând, ambele produse, într-o manieră încrucișată). Fiecare studiu clinic a fost realizat în două forme: în absența alimentelor, respectiv cu alimente.
  - Metoda bioanalitică dezvoltată și validată în scopul utilizării în analiza probelor provenite de la studiul de farmacocinetică în condiții *fasting* și *fed* s-a dovedit adecvată, robustă și reproductibilă.
  - În prima parte a analizei datelor obținute a fost aplicată analiza farmacocinetică noncompartimentală. Au fost calculate valorile parametrilor farmacocinetici  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $ASC_{last}$ ,  $ASC_{inf}$ ,  $k_{el}$ ,  $t_{1/2}$ , TMR, Cl și Vd. Valorile parametrilor farmacocinetici au fost comparate în funcție de produsul farmaceutic administrat respectiv referitor la efectul alimentației asupra farmacocineticii. Au fost efectuate testele de bioechivalență pentru ibuprofen după administrarea produsului test și a celui de referință. Calculele arată că, atât viteza cât și mărimea absorbției este similară și deci toate produsele farmaceutice sunt bioechivalente și interschimbabile. De asemenea s-a dovedit că există un puternic efect al alimentelor asupra farmacocineticii ibuprofenului, în special prin scăderea vitezei de absorbție și mai puțin prin modificarea mărimii absorbției.



- A fost analizată farmacocinetica ibuprofenului prin analiza farmacocinetică compartimentală. Rezultatele studiului arată că modelul ce descrie cel mai bine farmacocinetica acestei substanțe este modelul monocompartimentat, cu cinetica absorbției de ordinul 1, cu timp de latență, iar cinetica eliminării este de asemenea de ordinul 1. Rezultatele obținute între analiza farmacocinetică non-compartimentală și compartimentală sunt în bună concordanță
3. A fost realizat un studiu pentru obținerea prin bioreducere cu celule de *S. cerevisiae* a unor 1-(benzofuran-2-il)etanone substituite la inelul aromatic în sistem fermentativ și nefermentativ. Procesul se desfășoară selectiv și respectă regula lui Prelog, cu obținerea S-etanolilor cu excese enantiomerice de la moderat la bune (55-87% ee).
  4. Biotransformarea cu celule de *S. cerevisiae* a derivaților  $\alpha$ -substituiți ai cetonelor studiate prezintă o selectivitate și mai înaltă. Producții obținuți depind de substituentul prezent în catena. Astfel, din 2-acetoxi-1-(benzofuran-2-il)etanone se obțin R-etandiolii corespunzători, în timp ce din 2-hidroxi-1-(benzofuran-2-il)etanone se obțin enantiomerii opuși ai acestora respectiv S-etandiolii cu puritate optică ridicată (ee=84-93%). S-a demonstrat că în cazul acetoxiderivatilor bioreducerea este însoțită de hidroliza grupării esterice datorită hidrolazelor prezente în celulele de *S. cerevisiae* dar reducerea este mult mai rapidă decât hidroliza, ceea ce explică obținerea enantiomerilor diferiți, comparative cu bioreducerea hidroxiderivaților. Derivatizarea propusă în poziția  $\alpha$  și biotransformările studiate permit obținerea ambilor enantiomeri ai 1-(benzofuran-2-il)-1,2-etandiolilor.
  5. A fost efectuat un studiu complex al tuturor proceselor posibile (esterificare, hidroliza și transesterificare/alcooliza) la biotransformarea cu lipaze a esterilor ibuprofenului racemic cu alcoolii, în special cu alcoolii grași, în scopul obținerii S- enantiomerului ibuprofenului din amestecul racemic. Au fost identificate astfel două lipaze cu selectivitate opusă, lipaza B din *C. antarctica* și lipaza din *Mucor miehei*, care prezintă activitate ridicată în procesul de transesterificare cu alcoolii grași în anumiți solvenți.

## LITERATURA

1. L. Pasteur, *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1858**, 46, 615–18; L. Pasteur *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1860**, 51, 298–99.
2. H.Easson; E. Stedman *Biochem. J.* **1933**, 27, 1257–66.
3. W. E. Bachmann; W.Cole; A. L. Wilds *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, 62, 824–839.
4. B.G. Main *Problems and Wonders of Chiral Molecules*, Académiai Kiadó, Hungary, **1990**, pp. 329–343.
5. G..C. Cotzias; P.S. Papavasiliou; R. Gellene *New Engl. J. Med.* **1969**, 280, 337–345.
6. P. S. Portoghese *Ann. Rev. Pharmacol.* **1970**, 10, 51–76; B.V. Rama Sastry, *Ann.Rev.Pharmacol.* **1973**, 13, 253–267; E. J.Ariens, *Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 451–466; I. W.Wainer (Ed.), *Drug Stereochemistry: Analytical Methods and Pharmacology*, 2<sup>nd</sup>ed., Marcel Dekker, New York, **1993**; A. J. Hutt; S.C.Tan *Drugs* **1996**, 52, 1–12; M. Eichelbaum; A. S. Gross *Adv. Drug. Res.* **1996**, 28, 1–64; P. Jenner; B. Testa *Drug Metab. Rev.* **1973**, 2, 117–184.
7. A. M. Krstulovic (Ed., *Chiral Separations by HPLC*, Ellis Horwood Limited, UK, **1989**.
8. L. N. Mander *Stereoselective Synthesis*, in E. L. Eliel; S.H. Wilen; L.N. Mander (Eds.), *Stereochemistry of Organic Compounds*, Wiley-Interscience, USA, **1994**, pp. 835–990; E. Francotte, *Preparation of Drug Enantiomers by Chromatographic Resolution on Chiral Stationary Phases*, in H.Y. Aboul-Enein, I.W. Wainer (Eds.), *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, Wiley-Interscience, USA **1997**, pp. 633–683.
9. M.I. Tosa; C. Paisz; F.D. Irimie *Bioprocese pentru obținerea medicamentelor și intermediarilor*, Napoca Star, Cluj-Napoca, **2007**, pp. 127-153
10. K.M. Rentsch *J.Biochem.Biophys.Methods* **2002**, 54, 1-9

11. J.A. Tobert; V.J. Cirillo; G. Hitzenberger; I. James; J. Pryor; T. Cook; A. Buntinx; I. B. Holmes; P.M. Lutterbeck *Clin. Pharmacol. Ther.* **1981**, 29, 344–350;
12. J .H. Fried; I.T. Harrison; B. Lewis; J. Riegl; W. Roocks; A. Tomolonis; *Scand. J. Rheumatol [Suppl]* **1973**, 2, 7-11; P.F. Juby; W.R. Goodwin; T.W. Hudmya; R.A. Partyka *J. Med. Chem.* **1972**, 15, 1297-1306; J.S. Kaltebronn *J. Med. Chem.* **1973**, 16, 490-493.
13. J . Blanchard; R.J. Sawchuk; B.B. Brodie *Principles and perspectives in drug bioavailability*, Basel, New York, Karger, **1979**.
14. K. Munzel *Pharm. Acta Helv.* **1971**, 46, 513-38.
15. W A. Ritschel *Physicochemical and pharmaceutical properties of drugs and dosage forms influencing the results of phase I studies*. Urban&Schwarzenberg, Munchen – Wien – Baltimore, **1977**.
16. Y.E. Kurtoglu; P.K. Mishra; S. Kannan; R.M. Kannana *Int. J. Pharm.* **2010**, 384, 189–194; A. Karewicz; K. Zasada; A. Szczubiałka; S. Zapotoczna; R. Lach; M. Nowakowska *Int. J. Pharm.* **2010**, 385, 163–169; F.O. Onofre; Y.J. Wang *Int. J. Pharm.* **2010**, 385, 104–112; A. Goltsova; A. Maryashkin; M. Swatc; Y. Kosinsky; Y. Humphery-Smithe; O. Deminc; G. Goryanina I.ebedeva *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, 36, 122–136; F. Maestrelli; N. Zerrouk; M. Cirri; N. Menninia; P. Mura *Eur. J. Pharm. Sci.* **2008**, 34, 1–11; S. K. Yeon; J.H. Chang; K. In Ae; B.G. Man *Bioorg. & Med. Chem.* **2010**, 18, 3467–3473.
17. S.E. Leucuta *Biofarmacie si farmacocinetica*, Editura Dacia, **2002**;
18. Anonymous *Fed. Reg.*, May 27, **1992**, 5(102), 22249; S. Laganière, *Current Regulatory Guidelines of Stereoisomeric Drugs: North American, European and Japanese Point of View*, in H.Y. Aboul-Enein, I.W. Wainer (Eds.), *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*, Wiley-Intescience, USA **1997**, pp. 545–564.
19. *FDA-Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation*, **2001**
20. *CHPM-Guidance on Investigation of Bioequivalence*, **2010**
21. A.M. Marcovici; S. Bhardwaj; A..Simedru; T.Monif *Biomed.Chrom.*,-submitted
22. A.M. Marcovici; M.I. Tosa; L.Vlase; S.E. Leucuta; F.D. Irimie *Studia Univ. Babes-Bolyai, Chem.* **2009**, 2, 171-179.
23. P. Iuliani; G. Carlucci; A. Marrone *J. of Pharm. and Biomed. Anal.* **2010**, 51, 46–55; I. Ilisz; R., Berkecz; P. Antal *J. Chromatogr.A* **2009**, 1216, 1845–1860; A. Pyka *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2009**, 32(5), 723-731.
24. S. M. Rida; S.A. M. El-Hawash; H.T. Y. Fahmy; A.A. Hazza; M.M. El-Meligy *Arch. Pharm. Res.* **2006**, 26, 826-833.
25. S. Kim; A.A. Salim; S.M. Swanson; A.D. Kinghorn *Anticancer Agents Med.Chem.* **2006**, 6, 319-345; I. Hayakawa; R. Shioya; T. Agatsuma; H. Furukawa; S. Naruto, Y. Sugano *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 455-458; I. Hayakawa, R. Shioya; T. Agatsuma; Y. Sugano *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53, 638-640; I. Hayakawa; R. Shioya; T. Agatsuma; H. Furukawa; S. Naruto; Y. Sugano *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4383-4387.
26. C. Kirilmis; M. Ahmedzade; S. Servi; M. Koca; A. Kizirgil; C. Kazaz *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 43, 300–308.
27. G. Bourgery; P. Dostert; A. Lacour; M. Langlois; B. Pourrias; J. Tisneversailles *J. Med. Chem.* **1981**, 24, 159–167; S. Nattel; M. Talajic; B. Fermi; D. Roy *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **1992**, 3, 266–280; D. Roy; M. Talajic; P. Dorian; S. Conolly; M.J. Eisenberg; M. Green; T. Kus; J. Lambert; M. Dubuc; P. Gagne; S. Nattel; B. Thibault *N. Engl. J. Med.* **2000**, 342, 913–920.
28. D. Romero; R. Thomas; P. May; T. Poel US Appl., 354,925, 1994; *Chem. Abstr.* **1996**, 125, 142777g; S. A. Galal; A.S. Abd El-All; M. M. Abdallah; H. El-Diwani *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 2420–2428.
29. E. Santaniello; P. Ferraboschi; P. Grisenti; A. Manzocchi *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1071-1140.
30. M. Kusakabe; Y. Kitano; Y. Kabayashi; F. Sato *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2085; M. Zaidlewicz; A. Chechlowska; A. Prewysz-Kwinto.; A. Wojtczak *Heterocycles* **2001**, 55, 569-577.
31. C. Paizs; M. Tosa; C. Majdik; P. Moldovan; L. Novak; P. Kolonits; A. Marcovici; F.D. Irimie; L. Poppe *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14, 1495–1501.
32. L.C. Bencze; C. Paizs; M.I. Tosa, F.D. Irimie, J. Retej *ChemCatChem* **2011**, 3, 343 – 346.
33. Evans, A.M. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, 36, 7S-15S

34. K. M. Williams; R. O. Day; R. D. Knihinicki; A. M. Duffield *Acta Pharm. Toxicol.* 1986, **59**, 192–192
35. V. Gotor-Fernandez; E. Busto; V. Gotor *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797–812; A.K. Prasad; M. Husain; B.K. Singh; R.K. Gupta; V.K. Manchanda; C.E. Olsen; V.S. Parmar; *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4511–4514.
36. A. M. Marcovici; J. Brem; B. Nagy; F.D. Irimie *Biocat. & Biotransf.* **2012**, submitted
37. C. Lane; S. Boeren; K. Vos; C. Veeger *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81–87.
38. K. Engström; J. Nyhlen; A. G. Sandström; J. E. Backväll *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7038–7042; A. G. Sandström; K. Engström; J. Jyhlen; A. Kasrayan; J.E. Bäckvall *Protein Eng., Des. Sel.* **2009**, *22*, 413–420.
39. J. Brem; M. Naghi; M.I.Tosa; Z. Boros; L. Poppe; F.D. Irimie, C. Paizs *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *21*, 1672–1679.
40. P. Spizzo; A. Basso; C. Ebert; L. Gardossi; V. Ferrario; D. Romano; F. Molinari *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11005–11010.
41. R. Morrone; N. D’Antona; D. Lambusta; G. Nicolosi *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **2010**, *65*, 49–51.