



Università degli Studi di Pavia
Dipartimento di Chimica Farmaceutica



***NUOVE PROSPETTIVE PER IL TRATTAMENTO
TOPICO DELLA PSORIASI: ESTRATTI VEGETALI
AD ATTIVITA' ANTI-TNF- α***

Raffaella Gaggeri

10° SAYCS, Pesaro 18-20 ottobre 2010

10° Sigma-Aldrich Young Chemists Symposium, Pesaro 18-20 settembre 2010

❖ **Introduzione**

❖ **Scopo del lavoro**

❖ **Presupposti scientifici**

❖ **Risultati**

- La **Psoriasi** è una malattia immunologica, a decorso cronico fluttuante o recidivante, invalidante e a forte impatto sociale
- Interessa il 2 % della popolazione mondiale; in Italia le persone affette sono circa 2.500.000
- Il 20 % sviluppa una psoriasi “moderata-grave”; nel 20–25 % dei casi è presente anche artrite psoriasica
- Può essere localizzata in ogni parte del corpo

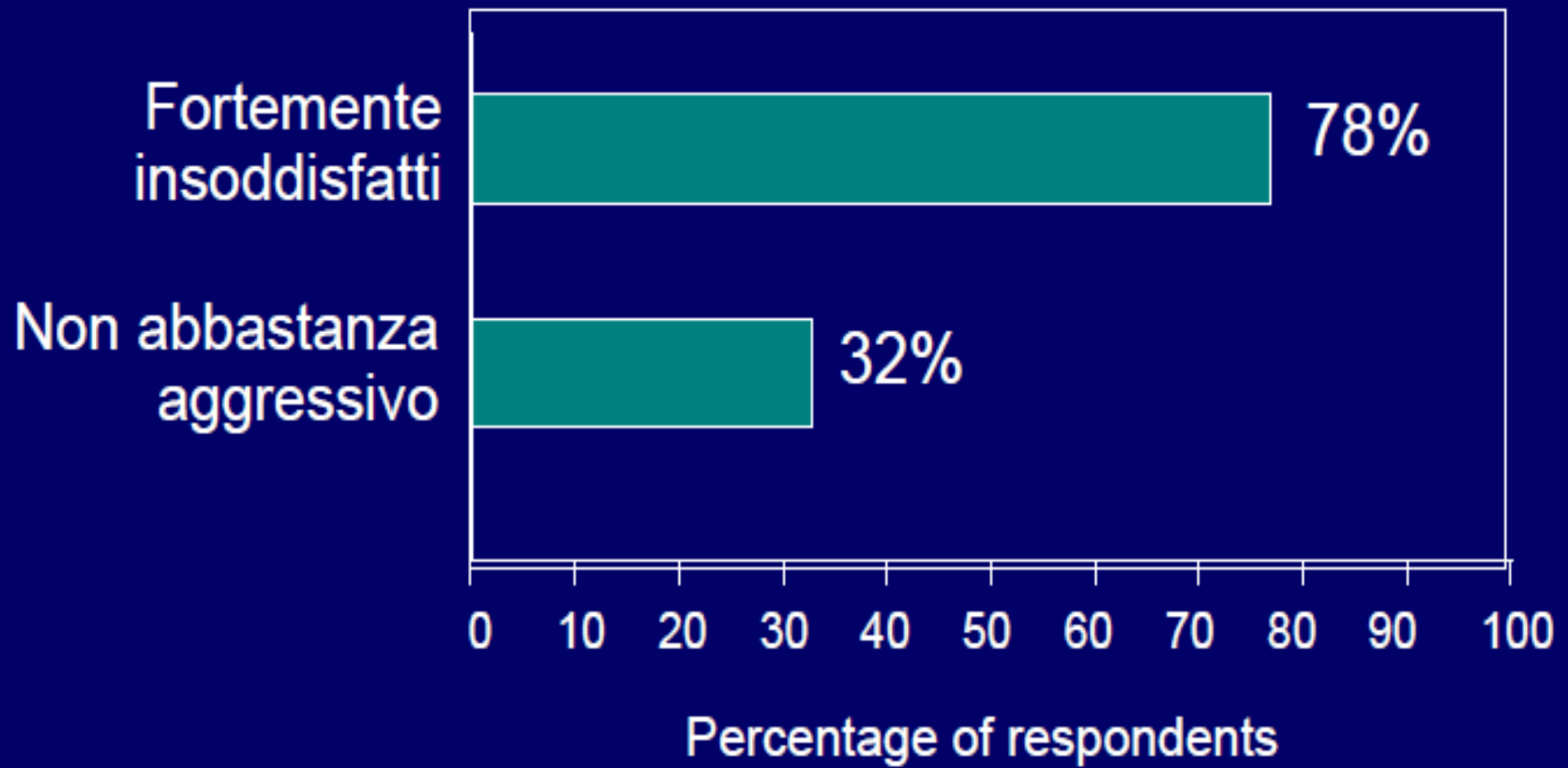




L'interessamento del volto è ritenuto raro

E' considerato un marker di gravità
(esordio precoce, lunga durata,
coinvolgimento articolare) **Young Park J
et al, JAAD 2004**

Livello di soddisfazione dei pazienti affetti da Psoriasi riferito alle terapie disponibili



Krueger G, et al. *Arch Dermatol.* 2001;137:280-284

Treatment options for psoriasis

TOPICI

- Emollienti
- Cheratolitici
- Coal Tar
- Ditranelo
- Steroidi
- Vitamina D
- Retinoidi
- Macrolidi

FOTOTERAPIA

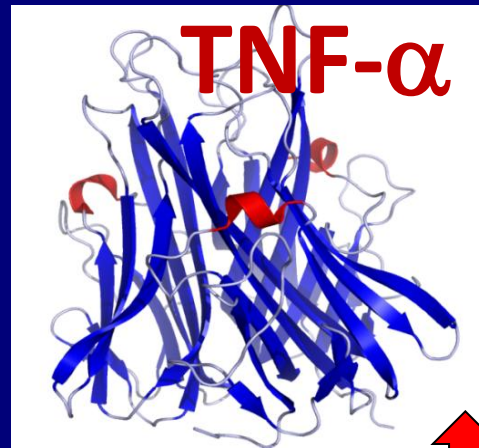
- UVB
- UVB-NB
- Bath PUVA
- Systemic PUVA

SISTEMICI

- Retinoide
- Methotrexate
- Ciclosporina
- Idrossiurea
- Fumarati
- Micofenolato
- **Biologici**

Nuovi target

✓ Le alterazioni vascolari e gli stati infiammatori locali, che accompagnano l'anormale proliferazione di cheratinociti, originano dalla sovraespressione di citochine proinfiammatorie



Citochina pleiotropica:
Risposta immunitaria,
Infiammazione
sistemica,
apoptosi cellulare,
proliferazione e
differenziamento,
cancerogenesi,
replicazione virale

PSORIASI

livelli nelle lesioni cutanee

espressione di m-RNA nelle
cellule mononucleate di
sangue periferico

espressione dei recettori

Nuovi farmaci

Classe farmaceutica	Farmaco	Via di Somministrazione
Antagonisti TNF-α	Infliximab (Remicade)	infusione ev
	Etanercept (Enbrel)	sottocute
	Adalimumab (Humira)	
	Golimumab (CNTO 148)	
	Efalizumab	

Nuovi farmaci

Table 2 Important safety aspects of TNF antagonists in psoriasis

	Infliximab (Remicade)	Etanercept (Enbrel)	Adalimumab (Humira)
Contraindications	<ul style="list-style-type: none"> • Hypersensitivity to infliximab, murine proteins, or any of the ingredients • Active TB • Severe infection (eg, abscesses, sepsis) • Opportunistic infections • Heart failure (NYHA III/IV) 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypersensitivity to etanercept or any of the ingredients • Sepsis, risk of sepsis • Active infections 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypersensitivity to adalimumab or any of the ingredients • Active TB • Severe infection (eg, sepsis) • Opportunistic infections • Heart failure (NYHA III/IV) • Allergic reactions
Warnings and precautions (clinical trials and postmarketing)	<ul style="list-style-type: none"> • Infusion reactions • Allergic reactions • Latent TB • Infections • Live vaccines • Autoimmune processes • Neurologic events (demyelinating diseases) • Malignancies and lymphoproliferative disorders • Heart failure • Surgical interventions 	<ul style="list-style-type: none"> • Allergic reactions • Latent TB • Infections • Live vaccines • Autoimmune processes • Neurologic events (demyelinating diseases) • Malignancies and lymphoproliferative disorders • Heart failure • Blood dyscrasias 	<ul style="list-style-type: none"> • Latent TB • Infections • Live vaccines • Autoimmune processes • Neurologic events (demyelinating diseases) • Malignancies and lymphoproliferative disorders • Heart failure • Surgical interventions • Blood dyscrasias

Mossner R. et al, Clinics in Dermatology, 2009, 26: 486-502

✓ *TNF- α blockers attualmente disponibili sono indicati nei casi di psoriasi grave o di artrite psoriasica e solo per via sistemica*

SCOPO DEL LAVORO:

Visto il ruolo del TNF nell'eziologia della psoriasi e la comprovata efficacia di *TNF-blockers* sistemici, obiettivo del lavoro è stata la valutazione dell'impiego di piccole molecole o di estratti vegetali arricchiti ad attività anti- TNF- α come nuova strategia per il trattamento topico

❖ **Introduzione**

❖ **Scopo del lavoro**

❖ **Presupposti scientifici**

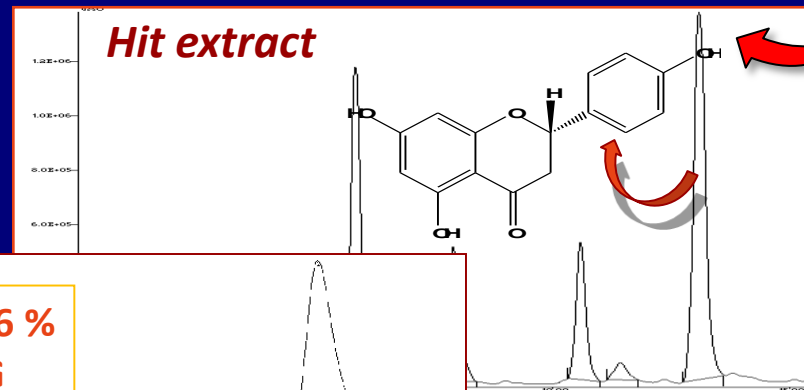
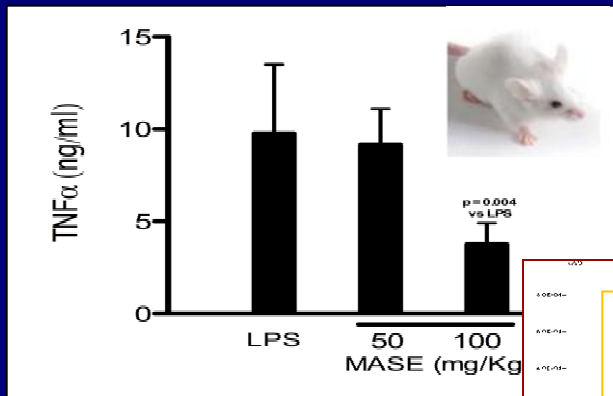
❖ **Risultati**

PRESUPPOSTI SCIENTIFICI

Approccio etnobotanico di *drug discovery*: pianta medicinale dell'asia sud-occidentale (*Amygdalus lyciodes* Spach) in uso nella medicina popolare iraniana come rimedio erbale con proprietà antinfiammatorie, antimicrobiche e anti-iperglicemizzanti.



Estrazione
MASE;
Esano-acetone
(1:1, v/v);





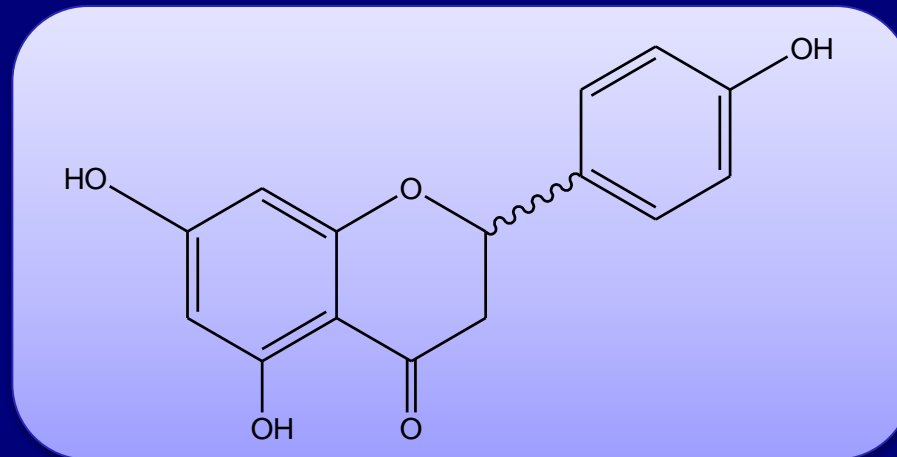
NARINGENIN

4,5,7-Trihydroxyflavanone



Antiossidante

Galati G, et al. Toxicology.
2002; 177 (1): 91-104.



Attività antimicrobica

Danelutte AP, et al. Phytochemistry
2003; 64: 555-559.

Attività antitumorale

So FS, et al. Nut. Cancer.
1996; 26:127-133.

Effetto antiiperglicemizzante

Ortiz-Andrade RR, et al. Diabetes Obes
Metab. 2008; 10 (11): 1097-104.

Attività antinfiammatoria

Bodet C, et al. J Periodontal Res.
2008; 43 (4): 400-7

Fasi della Ricerca:

- 1) Preparazione di formulazioni pilota di NRG
- 2) Ricerca di nuove fonti vegetali di NRG
- 3) Risoluzione chirale di (\pm)-NRG

❖ **Introduzione**

❖ **Scopo del lavoro**

❖ **Presupposti scientifici**

❖ **Risultati**

1) Formulazioni pilota di (\pm)-NRG

➤ Nell'ottica della realizzazione di una formulazione destinata all'uso topico nella terapia antipsoriasica, si è valutato l'impiego della sericina, principale costituente proteico della seta

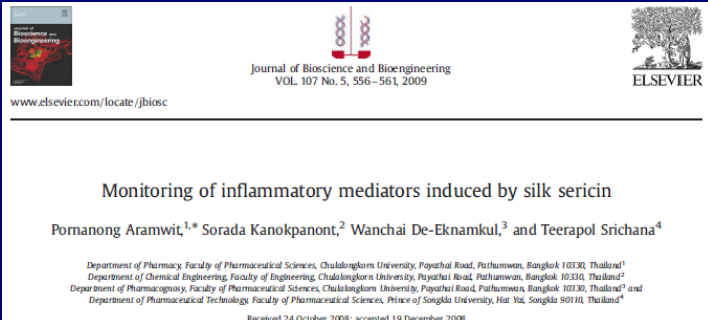


Proprietà fisiche
ottimali per
l'applicazione
topica su cute lesa

SERICINA

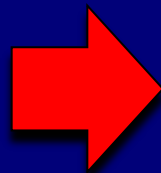
Attività anti-
TNF- α

Attività
antiossidante



Formulazione di microsfere di sericina

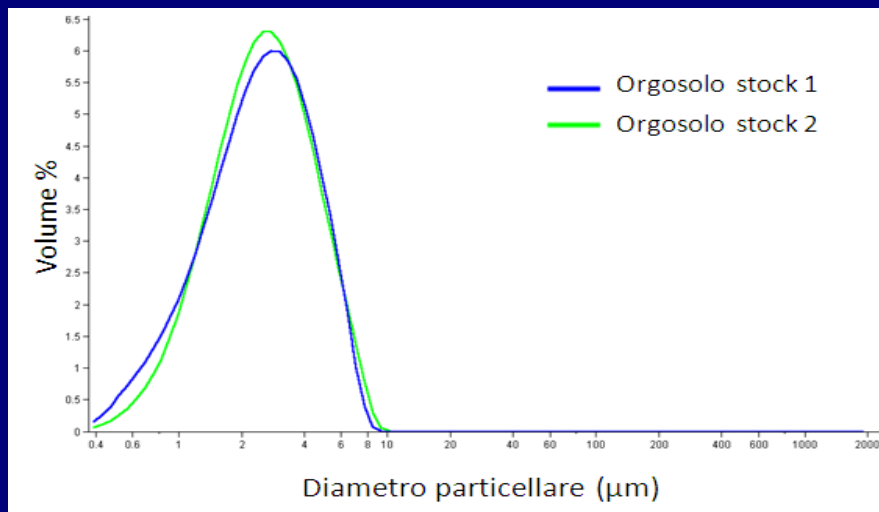
Dalla sgommatura dei bozzoli bianchi (tipo orgossolo) di *Bombix mori* si è ottenuta la soluzione di sericina



Soluzione di sericina + (\pm) NRG in EtOH



Büchi Mini
Spray Dryer



Analisi Granulometrica

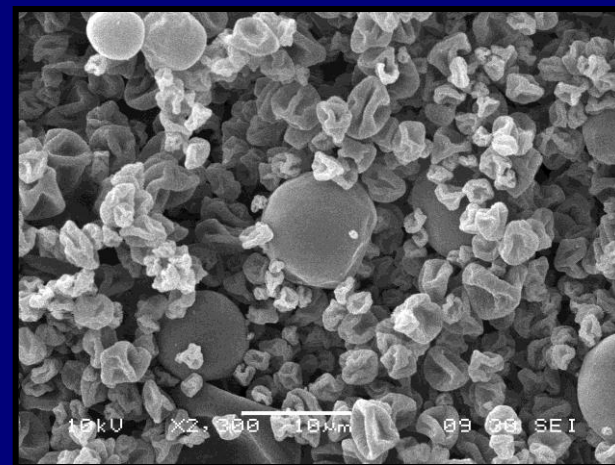
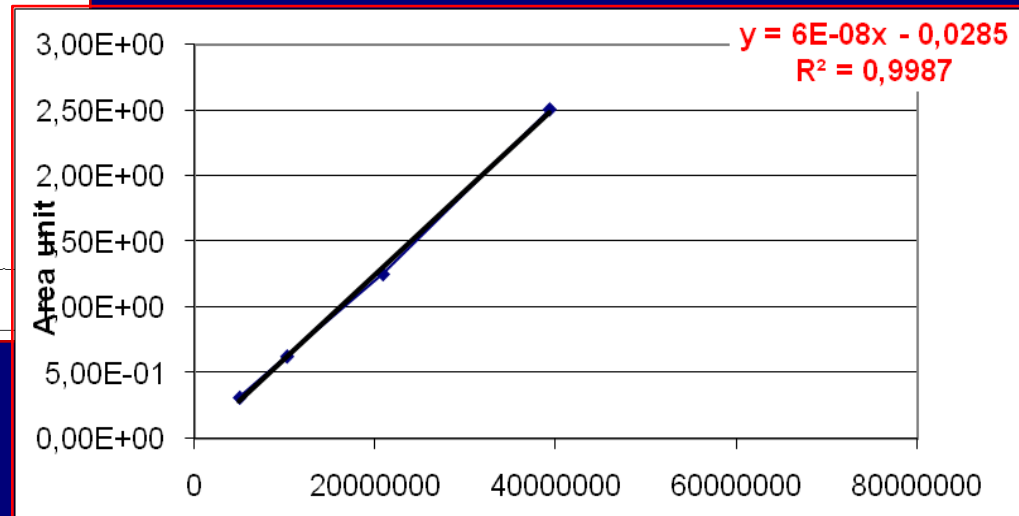
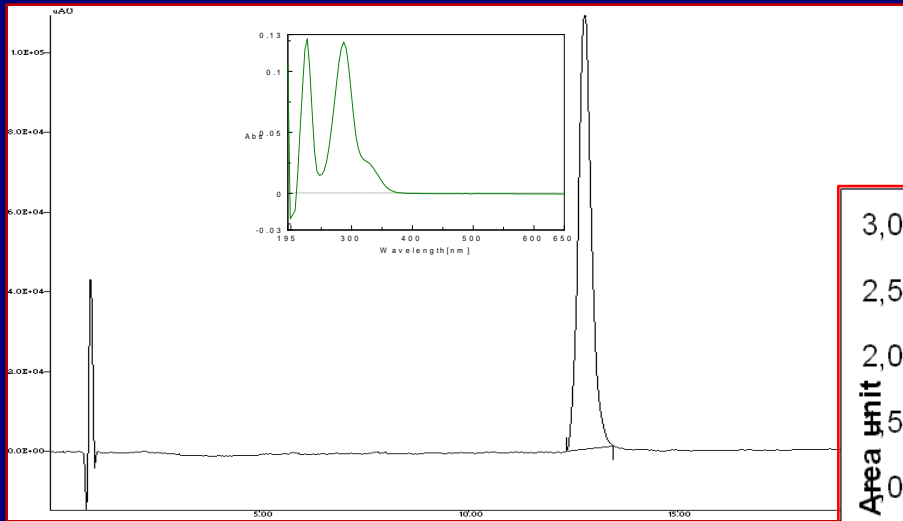


Immagine SEM

Titolo di NRG nelle microsferi



**Il titolo delle microsferi
è pari a 9,4%**

2) Ricerca di nuove fonti vegetali di NRG



***Amygdalus lycioides* Spach**
Familia: Rosaceae
Genere: *Amygdalus* o *Prunus*
Specie: *lycioides*

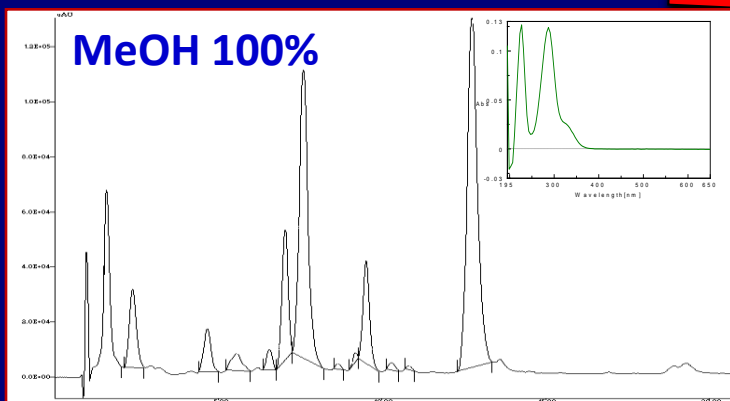
***Prunus persica* Batsch**
Familia: Rosaceae
Genere: *Prunus*

Fase estrattiva

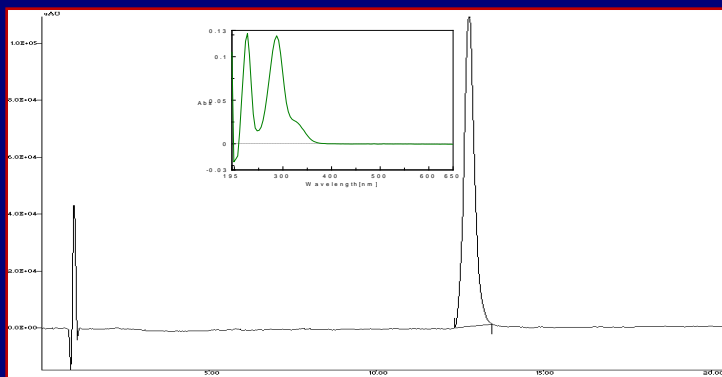
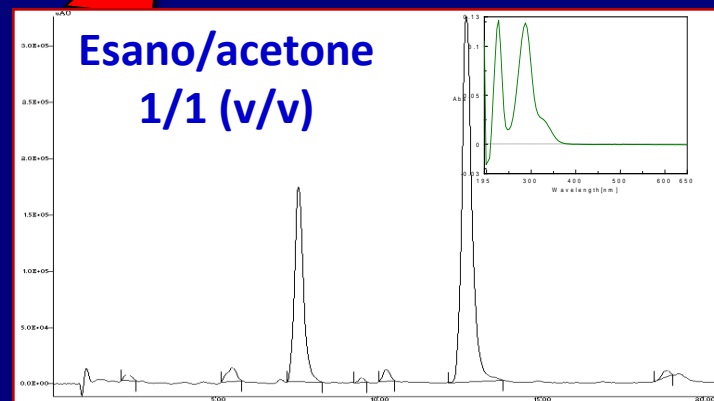


Macerazione
dinamica
Tempo: 48 h
Condizioni: T
ambiente; buio

Metodo idoneo
allo scale-up
industriale



FS: Chromolith
SpeedROD
RP-18e (50-4,6mm)
FM: H₂O ac. formico
0,1% - ACN, gradiente
Flusso: 1 mL/min
λ: 290 nm



✓ *Prunus persica* è una
fonte conveniente di NRG
✓ Nel macerato esano-
acetone NGR è il
componente principale

Purificazione del macerato esano-acetone

Estratto secco 1,5 g

Estrazioni in fase liquida
con: cloroformio e etilacetato

Cloroformio (1)
65 mg

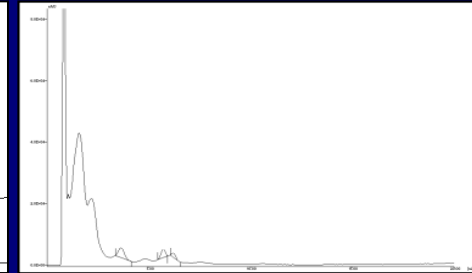
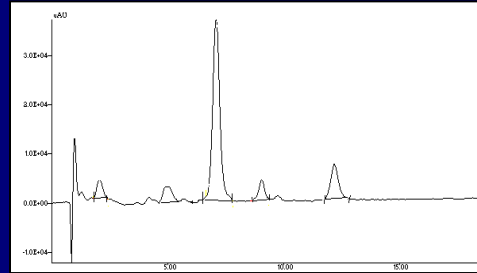
Cloroformio (2)
1,020 g

Etilacetato
312 mg

Acqua

Purezza 97%

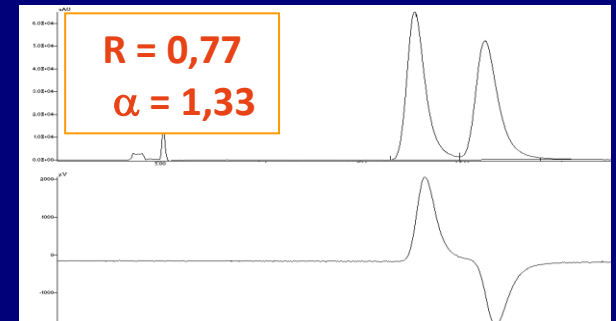
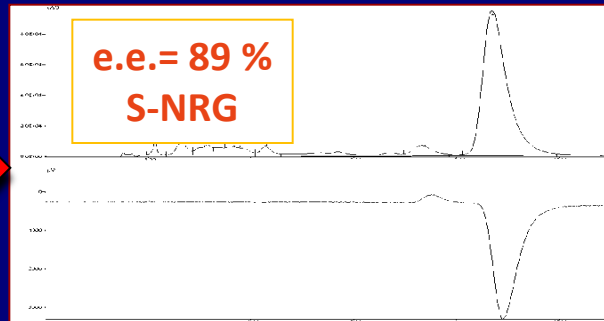
Purezza 86%



FS: OD-H
4.6 x 150mm, 5 μ m
Flusso: 1 ml/min
FM: Esano/IPA/TFA
85:15:0.1

e.e. = 89 %
S-NRG

R = 0,77
 α = 1,33



...in letteratura:

Fonte	(S)-NRG [mg/100 mL succo]	(R)-NRG [mg/100 mL succo]
Succo di arancia	0.036 ± 0.001	0.017 ± 0.001
Succo di pompelmo	0.031 ± 0.059	0.077 ± 0.002
Succo di mela	0.031 ± 0.001	0.018 ± 0.001
Succo di pomodoro	0.759 ± 0.029	0.693 ± 0.022

In natura
prevalenza di
(S)-NRG

Yanez J.A. et al, *Biopharm Drug Dispos*, 2008, 29: 63

- ✓ *Due enantiomeri generalmente presentano un diverso profilo biologico, differendo anche per caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche.*
- ✓ *Le proprietà biologiche dei singoli enantiomeri di NRG non sono ancora note*

3) Risoluzione chirale di (\pm)NRG via HPLC



Screening analitico



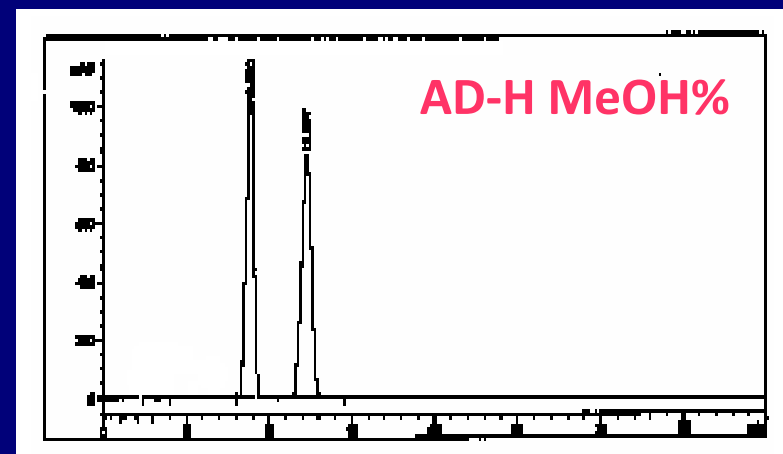
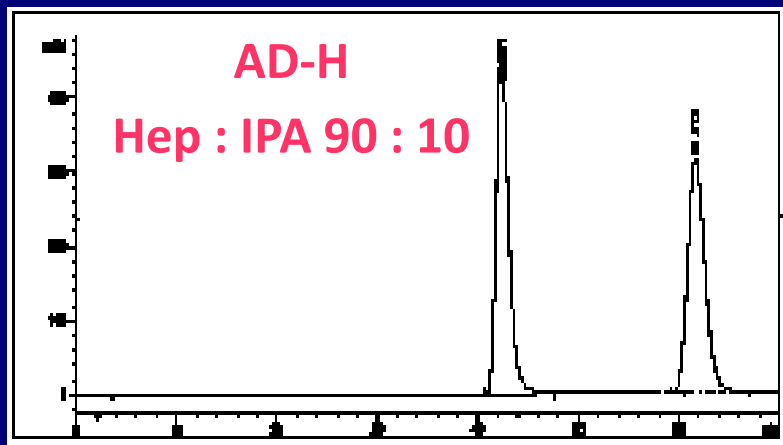
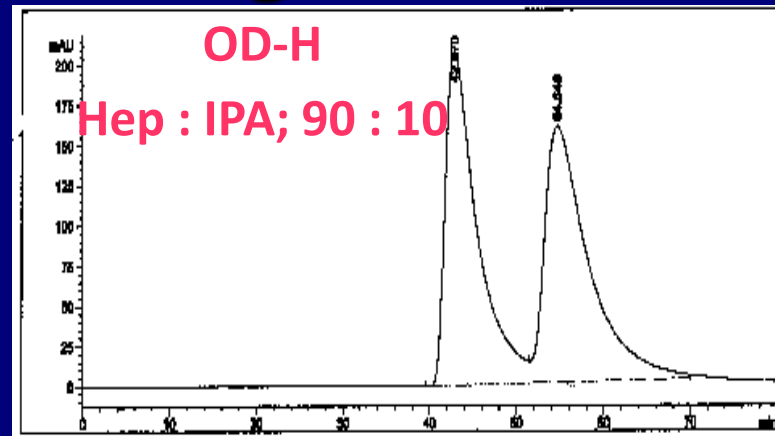
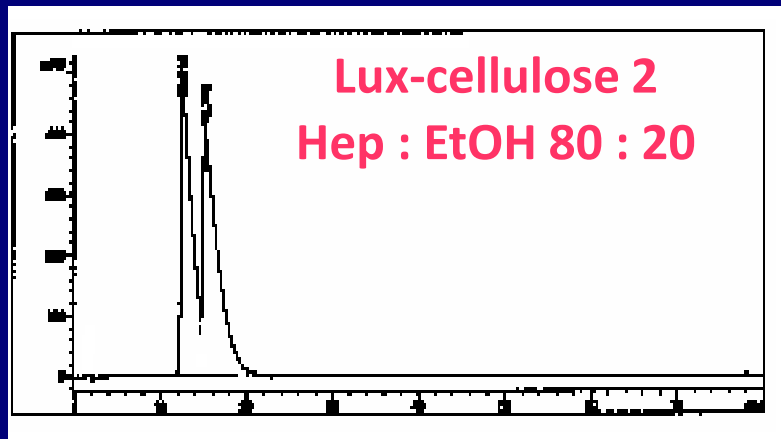
struttura	sostituente	Nome commerciale	Supplier
		Lux Cellulose-2	Phenomenex
		Lux Cellulose 1 Chiralcel [®] OD [™]	Phenomenex DAICEL
		Regispak Chiralpak [®] AD [™]	Regis DAICEL
		Lux Amylose-2	Phenomenex

Miscela Eluente	Composizione (vol%)
Hep : EtOH	90:10
Hep : EtOH	80:20
Hep : IPA	90:10
Hep : IPA	80:20
IPA	100
ACN : IPA	90:10
ACN	100
MeOH	100
EtOH : MeOH	50:50
EtOH	100

Risultati *screening* analitico

Solvent mixture	Chiralcel OD-H			Lux Cellulose 1			Lux Cellulose 2			Lux Amylose 2			Chiralpak AD-H		
	α	R_s	t_r	α	R_s	t_r	α	R_s	t_r	α	R_s	t_r	α	R_s	t_r
Hep : EtOH 90 : 10	1.18	1.51	20.7; 24	-	-	n.e.	1.22 0	0.91 0	48 ; 58	-	-	> 80	-	-	n.e.
Hep : EtOH 80 : 20	1.17	1.20	9.3; 10.3	-	-	15.5	1.24 0	1.01 0	12.6 ; 15.0	-	-	> 35	-	-	n.e.
Hep : IPA 90 : 10	1.29	1.63	43; 54.6	-	-	> 90	-	-	> 80	-	-	> 80	1.49	7.18	42.4; 62
Hep : IPA 80 : 20	1.19	1.40	11.8; 14	-	-	30	1.14	0.4	17.5; 20.4	-	-	> 30	1.44	5.13	10.5; 14
IPA 100	-	-	4.8	-	-	11.6	-	-	4.2	-	-	6.49	1.08	6.12	11.6; 12
ACN : IPA 90 : 10	-	-	4.6	-	-	8.6	-	-	3.3	-	-	22.8	-	-	3.7
ACN 100	-	-	6.4	-	-	47.5	-	-	4.2	-	-	n.e.	-	-	4.1
MeOH 100	-	-	4	-	-	4.9	-	-	2.3	-	-	5.19	1.49	3.48	9; 12.3
EtOH : MeOH 50 : 50	-	-	3.7	-	-	4.3	-	-	2.6	-	-	3.38	-	-	5.9
EtOH 100	-	-	3.6	-	-	3.9	-	-	3.1	-	-	3.20	-	-	4.1

Risultati *screening* analitico

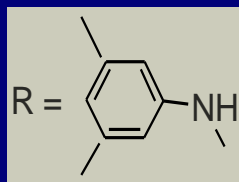
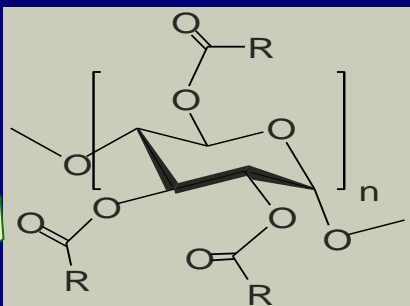


α : 1.49; R_s : 3.48;

$R_t < 11$ min

Colonna preparativa

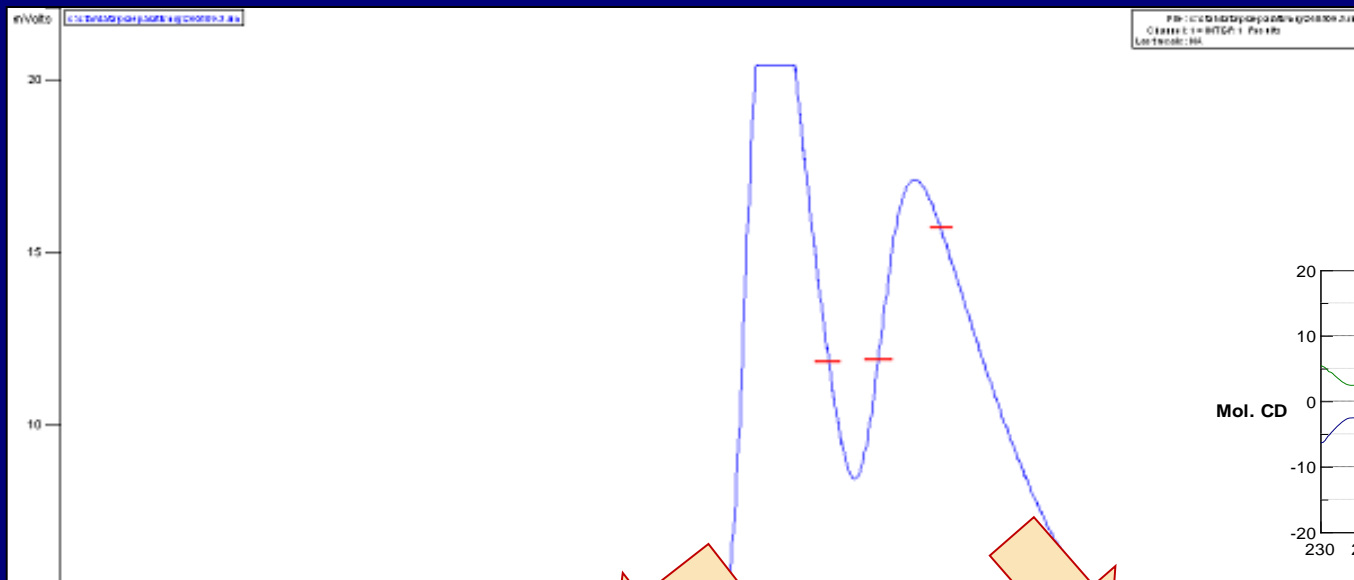
CPS Packing Material:
Chiralpak AD 20 μm
(DAICEL)



Column Packing Station:
Dynamax RamPak
(VARIAN)



Separazione in scala preparativa



t.r.: 8.7 min

ee: 99%

**$[\alpha]_{589}^{25} = -25.3^\circ$
(c = 0.30%; EtOH)**

(-)-S-NRG

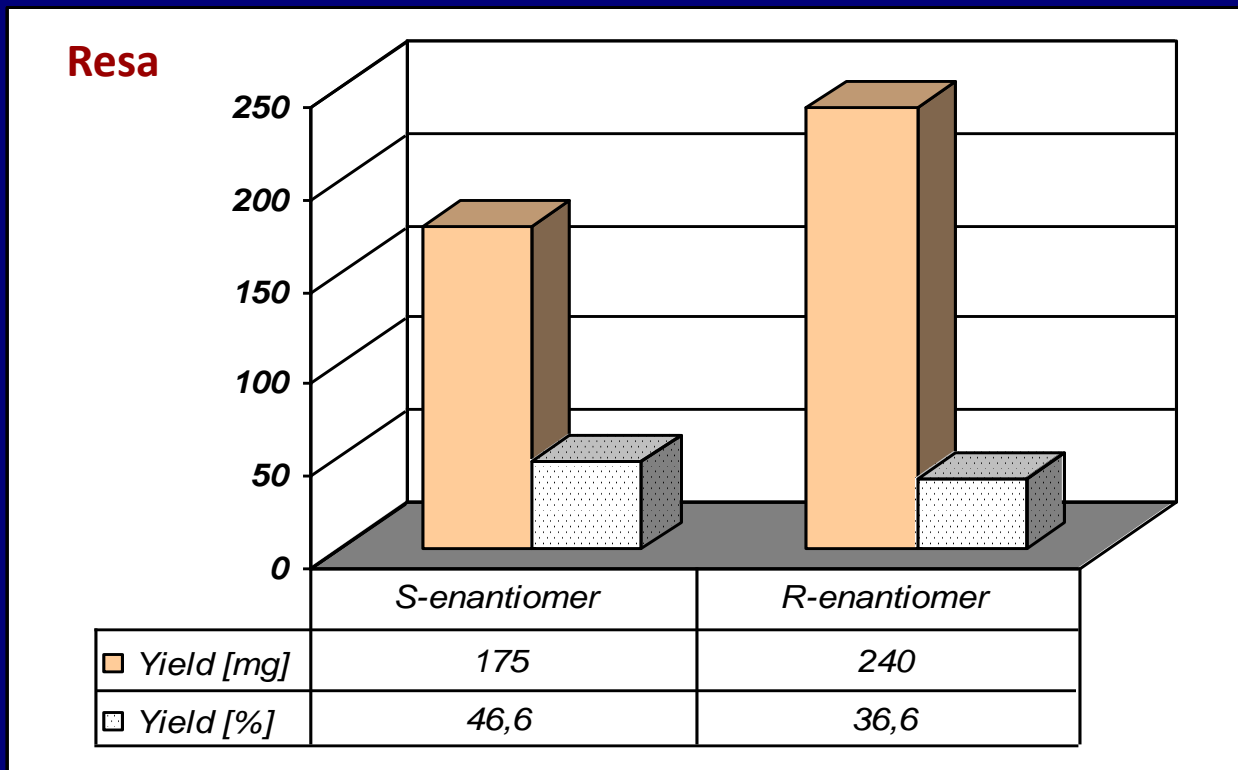
t.r.: 11.8 min

ee: 96.2%

**$[\alpha]_{589}^{25} = +23.4^\circ$
(c = 0.30%; EtOH)**

(+)-R-NRG

Separazione in scala preparativa



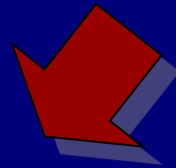
Entrambi gli enantiomeri di NRG sono stati isolati con grado di purezza e in quantità adeguate per effettuare i saggi biologici

4) Valutazione biologica

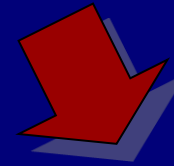
(±) NRG; (S)-NRG e (R)-NRG;

Microsfere di sericina e Microsfere di sericina e
(±) NRG;

(S)-NRG estratta da *Prunus persica*.



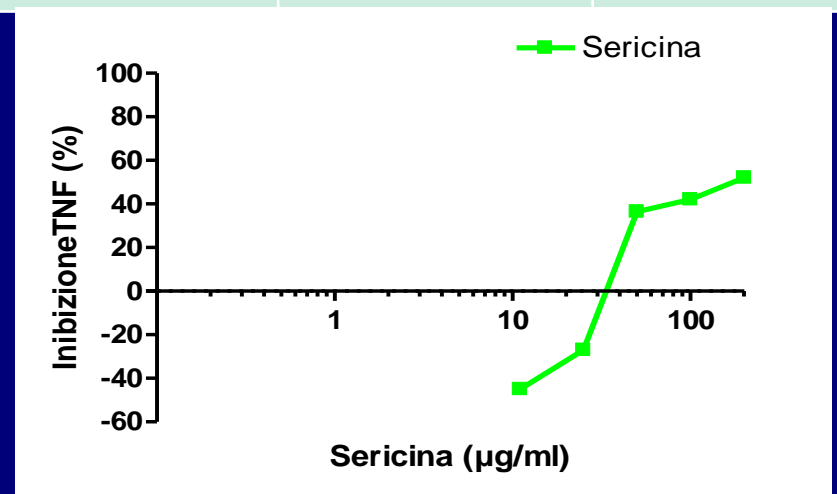
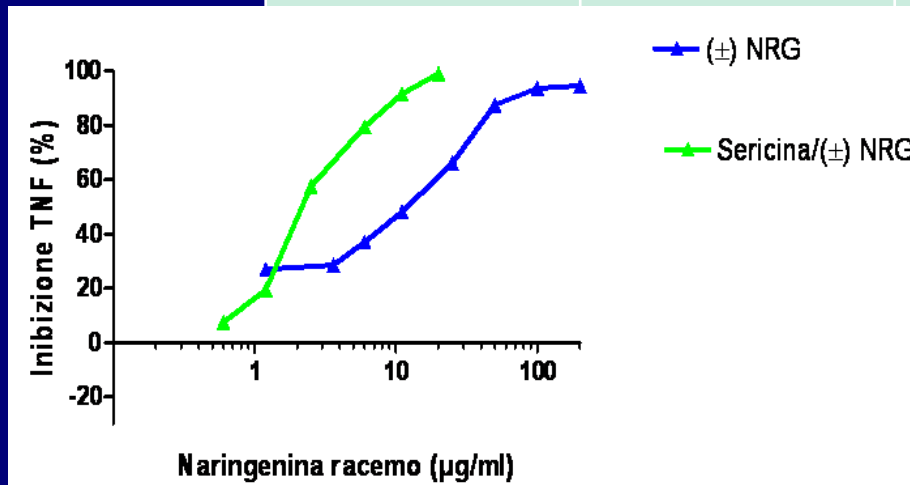
**Test *in vitro* su cellule
polinucleate di sangue umano
di 10 donatori sani in cui lo
stato infiammatorio è stato
indotto dal trattamento con
lipopolisaccaride (LPS, da
E.coli)**



**Test *in vitro* di
citotossicità
(Alamar Blue)**

	(±) NRG	(S)-NRG	(R)-NRG	Sericina + (±) NRG
IC50 (µg/mL)	23,2	14,1	39,8	3,2

	(±) NRG	(S)-NRG	(R)-NRG	Sericina + (±) NRG
ED50 (µg/mL)	> 200	> 200	> 200	> 200



Punto dipartenza per lo sviluppo di una formulazione adatta all'uso topico

Conclusioni

✓ Lo studio condotto è servito a chiarire il profilo di attività anti-TNF- α degli enantiomeri di NRG e ad individuare una formulazione adatta a veicolare il principio attivo, priva di tossicità e in grado di produrre un effetto sinergico in termini di efficacia anti-TNF- α .

Prospettive Future

- ✓ Veicolare l'eutomero di NRG e l'estratto arricchito di *Prunus persica* in microsfere di sericina
 - ✓ Saggiare *in vivo* le formulazioni così preparate