



ESTUDIO CROMATOGRÁFICO DE LOS EQUILIBRIOS QUE AFECTAN A LA ESTABILIDAD DE LOS FÁRMACOS ANTITUMORALES

Autor: Miguel Largo Almoguera. DNI: 03929389T. Convocatoria: Febrero 2015.

1. Introducción

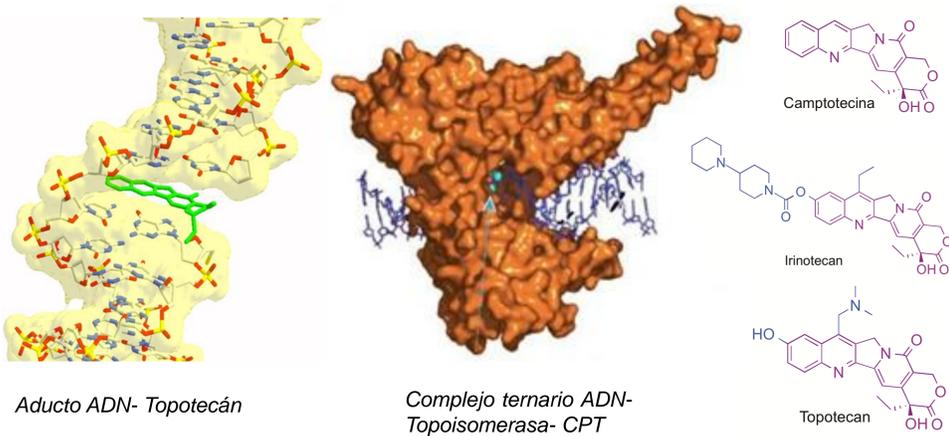
La **camptotecina** es el cabeza de serie de un grupo de fármacos antitumorales con actividad inhibitoria de topoisomerasas. Esta molécula posee singulares características por lo que ha sido seleccionada como un ejemplo en el que recopilar la mayoría de las competencias adquiridas en las distintas materias que componen el Grado en Farmacia.

Fármacos Antitumorales: En el tratamiento del cáncer o quimioterapia se emplean dos tipos de fármacos. Fármacos citotóxicos, capaces de causar la muerte celular, y los citostáticos encaminados a detener la proliferación celular. A pesar de la existencia de un prolífico arsenal terapéutico (1) sigue siendo un desafío la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

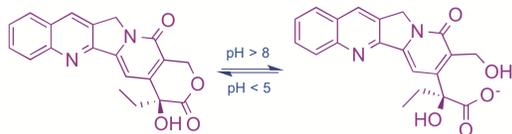


DENOMINACIÓN	MODO DE ACCIÓN	EJEMPLOS REPRESENTATIVOS
Agentes formadores de aductos con el ADN	Formación de enlaces covalentes con el ADN. La unión al ADN impide la replicación del mismo conduciendo a la apoptosis celular.	- Agentes alquilantes - Derivados del platino - Agentes que interaccionan con el "surco menor" del ADN
Antimetabolitos	Imprescindibles para la síntesis de las biomoléculas se incorporan "fraudulentamente" a las mismas y producen apoptosis celular.	Metotrexato, tioguanina, mercaptopurina.
Antibióticos	Mecanismos múltiples, intercalación con el ADN, generación de radicales libres tóxicos e inhibición de topoisomerasas	Doxorubicina y epirubicina.
Inhibidores de la funcionalidad del huso mitótico	Impiden la polimerización de las tubulinas que forman el uso mitótico en el proceso de división celular	- Alcaloides - Taxanos
Inhibidores de topoisomerasas	Impiden la acción de las enzimas encargadas de facilitar el desenrollamiento del ADN como paso previo a la replicación y transcripción.	- Derivados de camptotecina - Epipodofilotoxinas
Terapia hormonal	Agentes que actúan bloqueando la síntesis de las hormona esteroideas o bloqueando sus receptores en las células tumorales	- Inhibidores de aromatasa
Terapia inmunológica	Administración de vacunas elaboradas con fragmentos de células tumorales	- Agonistas de los receptores - Terapia activa: vacunas - Terapia pasiva: anticuerpos (rituximab) o reticulocitos. - Mediadores del sistema inmunológico (interferones, interleucinas)
Terapia fotodinámica	Compuestos que al ser iluminados generan sustancias muy tóxicas (oxígeno superóxido) pero con una semivida muy corta	Porfirinas
Otras terapias	Inhibidores de tirosin-quinasa Inhibidores de la angiénesis Silenciadores de genes	- Imatinib - Neovastat - Oblimersen

Camptotecina y otros inhibidores de topoisomerasa: los ensayos iniciales se hicieron con la sal sódica de la camptotecina, sin embargo esta produjo efectos secundarios como la cistitis hemorrágica. El descubrimiento de la diana farmacológica de estos compuestos, la topoisomerasa I, produjo la aparición de dos análogos el **topotecán** y el **irinotecan**. Actualmente estos compuestos se utilizan en el tratamiento de cáncer de colon y de ovario.



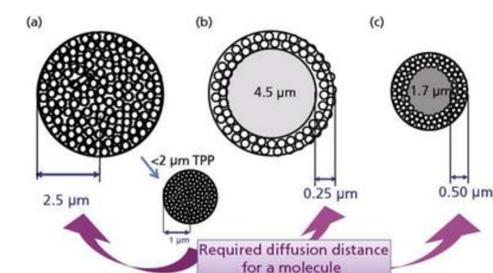
Estabilidad química de la camptotecina y análogos: el anillo de lactona resulta fundamental para la actividad farmacológica de la camptotecina pero es causa al mismo tiempo de su inestabilidad química.



Reacción de equilibrio de apertura del anillo de lactona en la camptotecina y sus análogos. La presencia del anillo le confiere carácter lábil pudiéndose obtener ambas formas regulando sólo las condiciones del equilibrio.

λ_{ex}	λ_{em}	λ_{ex}	λ_{em}
370	428	373	448

Métodos de cuantificación de la camptotecina:



Comparación esquemática de una partícula de sílice totalmente porosa, columnas convencionales, y dos partículas de sílice superficialmente porosas con distinto diámetro de partícula, columnas tipo "core-shell".

COMPUESTO	SEPARACIÓN CROMAGRÁFICA
Camptotecina	Fase inversa. Elución en gradiente. Detección fluorimétrica. Estudio de la cinética de apertura del anillo de lactona.
Camptotecina	Fase inversa. Elución en gradiente. Detección fluorimétrica. Liberación de la CPT de nanopartículas de sílice.
Irinotecan	Fase inversa. Elución en gradiente. Detección fluorimétrica. Tejidos y cultivos celulares.
Irinotecan	Fase inversa. Elución en gradiente. Detección Espectrometría de masas
Amino-camptotecina	Fase inversa. Elución isocrática. Detección fluorimétrica
Camptotecina y Tioamptotecina	Fase inversa. Elución isocrática. Detección fluorimétrica y UV-vis. Estudio del equilibrio de hidrólisis.

Métodos de separación de las formas lactona y carboxilato de la camptotecina y sus análogos inhibidores de topoisomerasas de tal manera que la concentración que determinan se corresponde con los niveles de ambas formas en plasma.

2. Objetivos

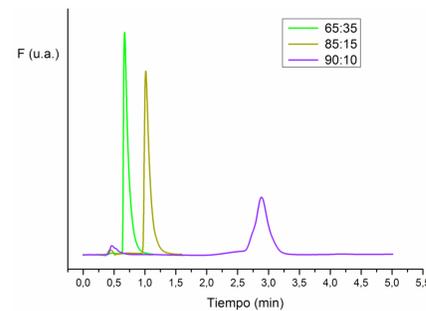
- Revisión bibliográfica de los fármacos antitumorales: farmacología, mecanismo de acción, análisis y aspectos fisiológicos del cáncer.
- Aplicación de un método de HPLC-FD a la determinación de CPT y estudio de los factores físico-químicos que afectan al equilibrio y estabilidad de este antitumoral

3. Parte experimental



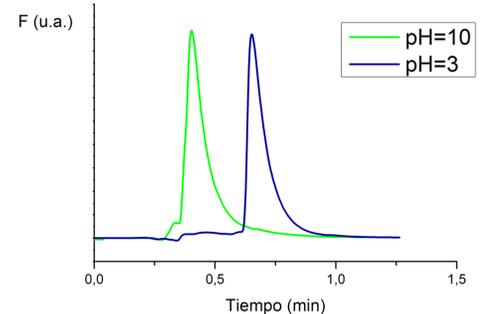
4. Resultados

Efecto de la Fase Móvil



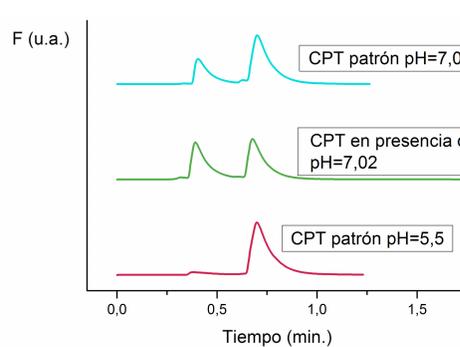
Cromatogramas de la separación de las formas lactona y carboxilato de la CPT a distintas proporciones de tampón acetato de trietilamina: acetonitrilo en elución isocrática. Fase estacionaria: columna core-shell C-18.

Efecto del pH



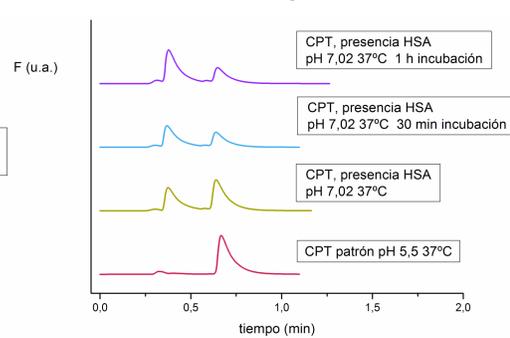
El pH de la disolución en el que se encuentra, va a afectar al equilibrio de la CPT. Las disoluciones de CPT a pH 3 muestran un único pico cromatográfico que aparece a 0,7 min atribuible a la forma lactona. A pH 10 este equilibrio se haya desplazado completamente hacia la forma carboxilato.

Efecto de la albúmina



El pH de la disolución en el que se encuentra, va a afectar al equilibrio de la CPT. Las disoluciones de CPT a pH 3 muestran un único pico cromatográfico que aparece a 0,7 min atribuible a la forma lactona. A pH 10 este equilibrio se haya desplazado completamente hacia la forma carboxilato.

Efecto del tiempo incubación



El incremento de la temperatura favorece la apertura del anillo de lactona al ser esta una forma menos estable que la forma carboxilato. La disolución de CPT incubada, a 37 °C y en presencia de HSA a pH 7,02 demuestra que el equilibrio se va desplazando paulatinamente hacia la forma carboxilato de la CPT.

5. Conclusiones

- Revisión bibliográfica de los mecanismos de acción de antitumorales, su vehiculización y los aspectos fisiopatológicos de los procesos tumorales. Además, se estudiaron los distintos métodos de análisis de antitumorales.
- Hemos deducido la importancia de la camptotecina como modelo en el que interconectar las diversas materias que componen el Grado de Farmacia.
- Se han adquirido las habilidades y la destreza para la puesta a punto y el trabajo de rutina en cromatografía y otras técnicas básicas de laboratorio.
- Se ha logrado reproducir un método que permite la separación de las formas activa y farmacológicamente inactiva de la camptotecina. Usando métodos actuales como las "core-shell".
- Las variables físico-químicas que afectan al equilibrio de la camptotecina han sido estudiadas mediante cromatografía adquiriendo el conocimiento de la importancia de las mismas sobre la estabilidad de este antitumoral.

6. Bibliografía

- Pommier Y, Marchand C. Nature Reviews Drug Discovery. 2012. p. 250-250.
- Mullangi R, Ahlawat P, Srinivas NR: Review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. Biomedical Chromatography. 2010. p. 104-23.
- Kazakevich Y, LoBrutto R. HPLC for Pharmaceutical Scientists. HPLC for Pharmaceutical Scientists. 2006.
- Poole CF. The essence of chromatography. Elsevier. 2003.