



Metodologie di Sintesi e Sviluppo Farmaceutico

Synthesis and Development Pharmaceutical Methodologies

IV ed

Laurea Magistrale in Chimica a.a. 2018/2019



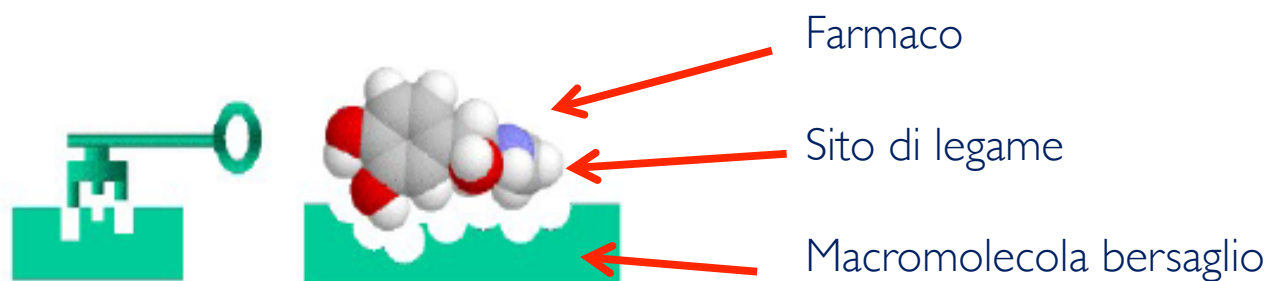
Molecular targets

- Quali sono i target molecolari di un farmaco ad attività specifica?
- Enzimi e recettori: che differenze ci sono?



Fase **Farmacodinamica**: *ciò che il Farmaco fa all'organismo*

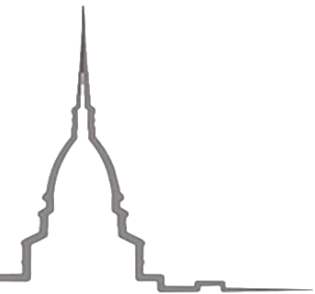
Studio del comportamento del farmaco nella BIOFASE ovvero di come interagisce con il suo bersaglio macromolecolare attraverso le interazioni di legame.



Fase **Farmacodinamica**: *ciò che il Farmaco fa all'organismo*

I farmaci possono essere:

- **Strutturalmente aspecifici**: non hanno un bersaglio molecolare ben definito
- **Strutturalmente specifici**: agiscono attraverso l'interazione con un recettore o un enzima



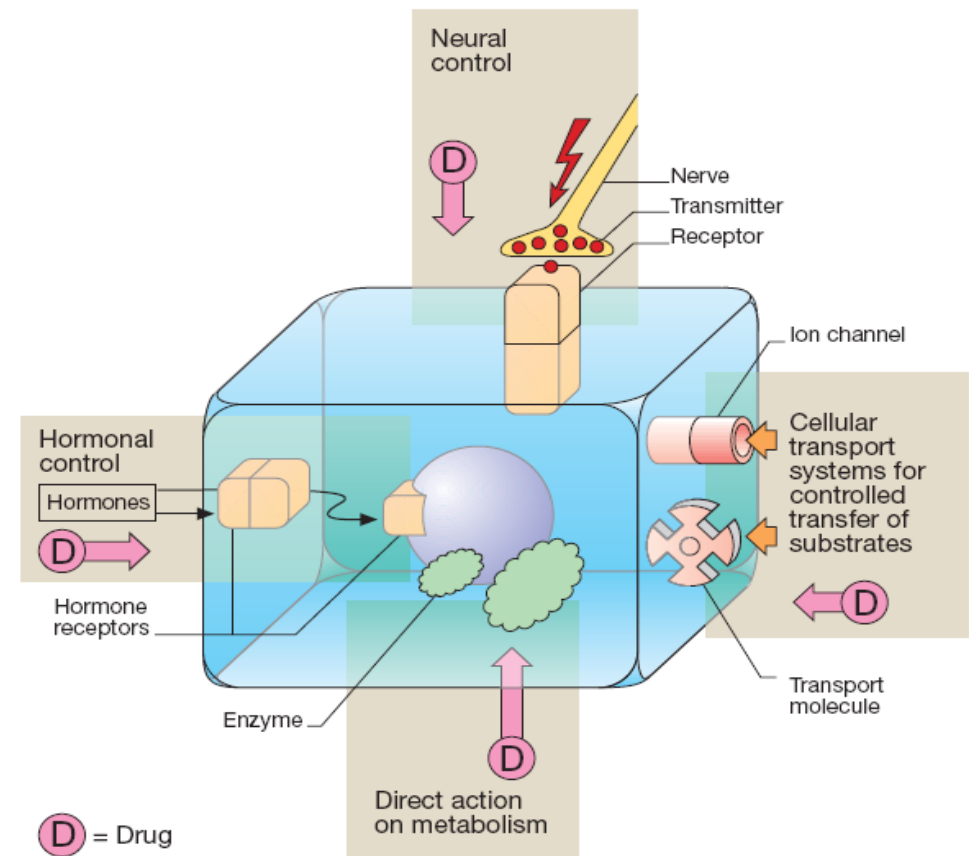
Farmaci strutturalmente specifici:

Teoria recettoriale

Caratterizzati da rigorosi requisiti strutturali, elevata potenza e da interazioni competitive.

Bersagli dei farmaci strutturalmente specifici:

Macromolecole quali proteine (enzimi, recettori, proteine di trasporto) ed acidi nucleici (DNA, RNA).



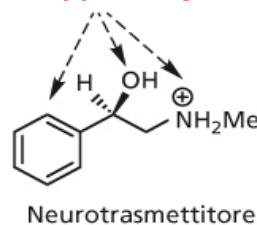
Drug targets:

- Recettori
- Enzimi

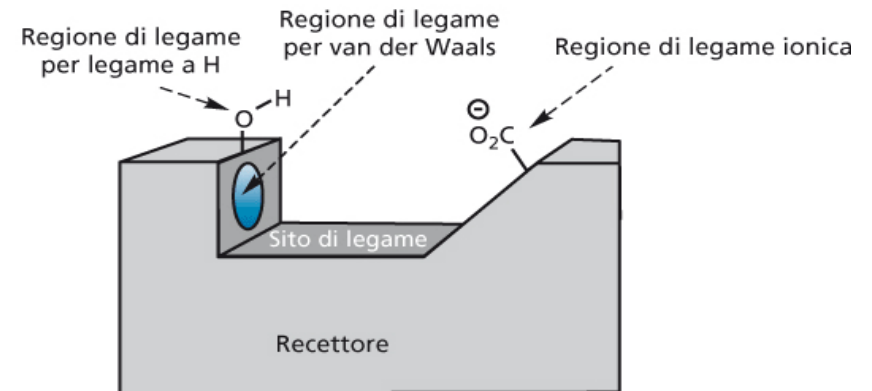
Gruppi funzionali e residui carboniosi presenti nel farmaco interagiscono con gruppi funzionali e residui carboniosi complementari presenti nel recettore.

I primi si definiscono **gruppi di legame**, i secondi **siti di legame**.

Gruppi di legame:



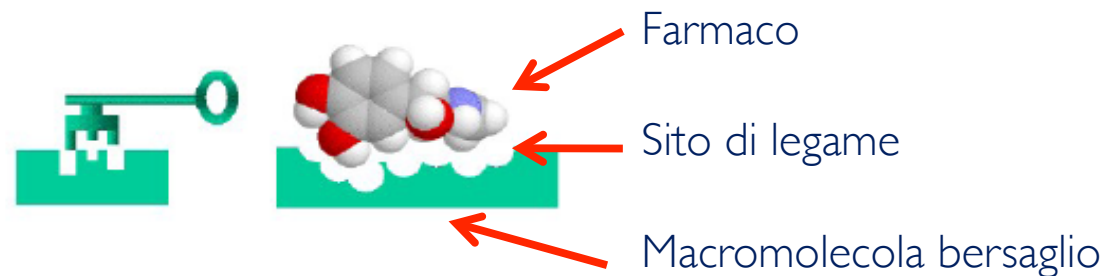
Siti di legame:



Sito di legame (sito di binding): piccola e specifica zona della macromolecola in cui ha luogo l'interazione di legame tra il farmaco e la macromolecola stessa.

Tipicamente una insenatura o una fenditura nella superficie macromolecolare.

La complementarità strutturale richiesta è analoga a quella richiesta tra una chiave ed una serratura.

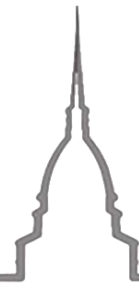




Molecular targets



Receptors

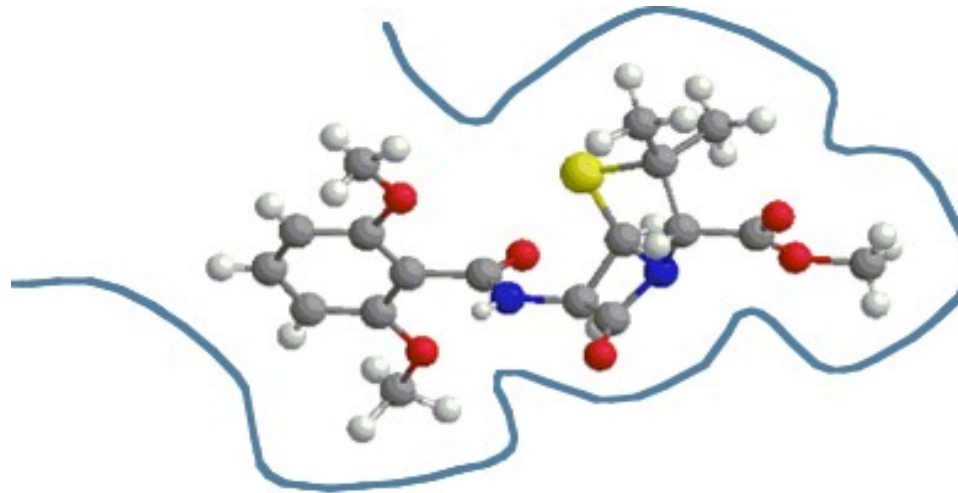


Recettori

Il concetto di recettore risale al 1878 durante gli studi di **John Langley**, un fisiologo Britannico, sulle proprietà biologiche dell'*atropina* e della *pilocarpina*.

Tuttavia il termine di recettore fu introdotto da **Paul Erlich**, un famoso pioniere della chemioterapia e dell'immunochimica.

La sua definizione *corpora non agunt nisi fixata* (i composti non agiscono se non vengono legati), il concetto di *bioattivazione*, di indice terapeutico, e di resistenza ai farmaci sono tuttora validi, anche se sono stati profondamente affinati.



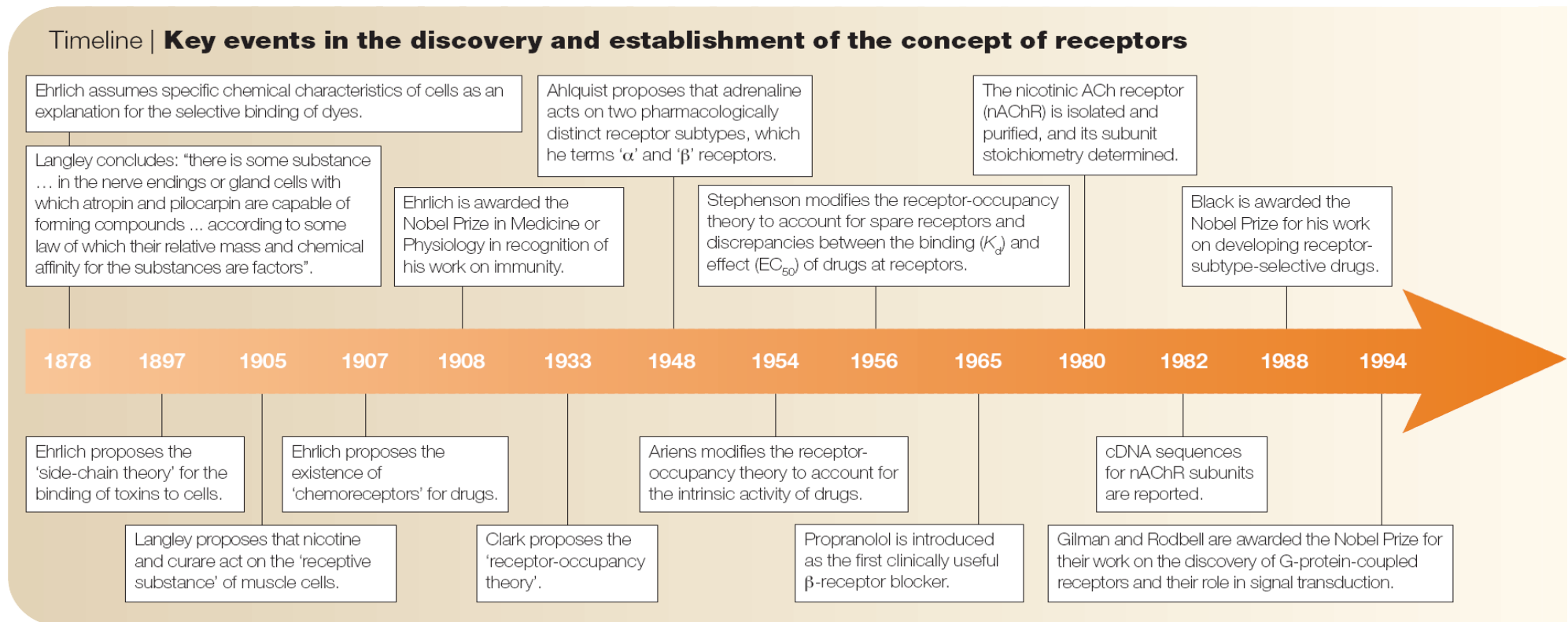
Qualche definizione....

- *I recettori sono macromolecole funzionali che costituiscono il bersaglio per l'azione dei Farmaci.*
- *Strutture biologiche in grado di iniziare una serie di eventi fisico-chimici che conducono ad una risposta biologica.*
- *Strutture biologiche finalizzate all'identificazione di substrati naturali ben determinati (mediatori chimici, ormoni) e specializzate:*

1. nella ricezione di un segnale proveniente dall'esterno della cellula

2. nella trasduzione del segnale stesso all'interno della cellula

possono essere presenti all'interno della cellula oppure sulla membrana cellulare.



Maehle, A.-H.; Prüll, C.-R.; Halliwell, R. F., "The emergence of the Drug Receptor Theory" *Nature Reviews (Drug Discovery)* **2002**, 1, 637-641

Erlich, Langley, Clark, Alquist, Ariens, Stephenson, attraverso questi ricercatori dalla fine dell'ottocento ad oggi si è venuto a delineare la moderna teoria recettoriale.

Recettori: struttura e funzione

SISTEMA DI COMUNICAZIONE

Deriva dal SNC che riceve ed invia messaggi attraverso una vasta rete di nervi, come un impulso elettrico che viaggia lungo la cellula nervosa verso il bersaglio.

I neuroni terminano poco prima della superficie della cellula bersaglio.

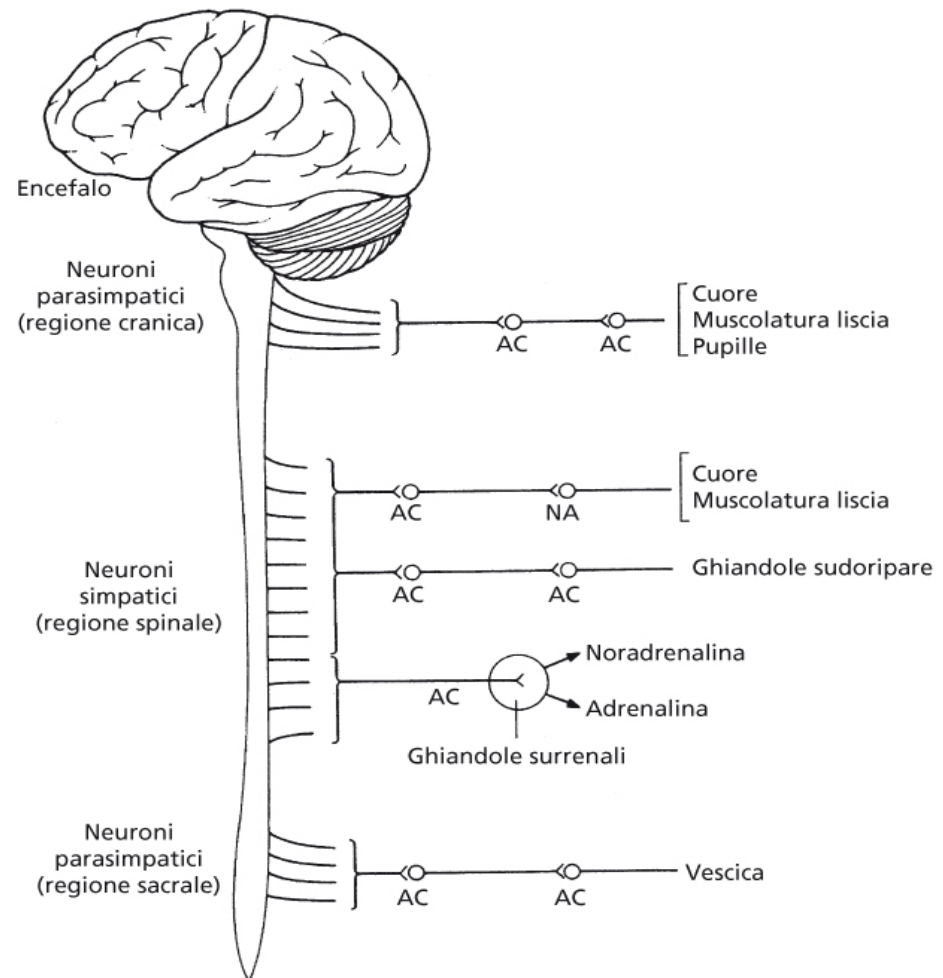
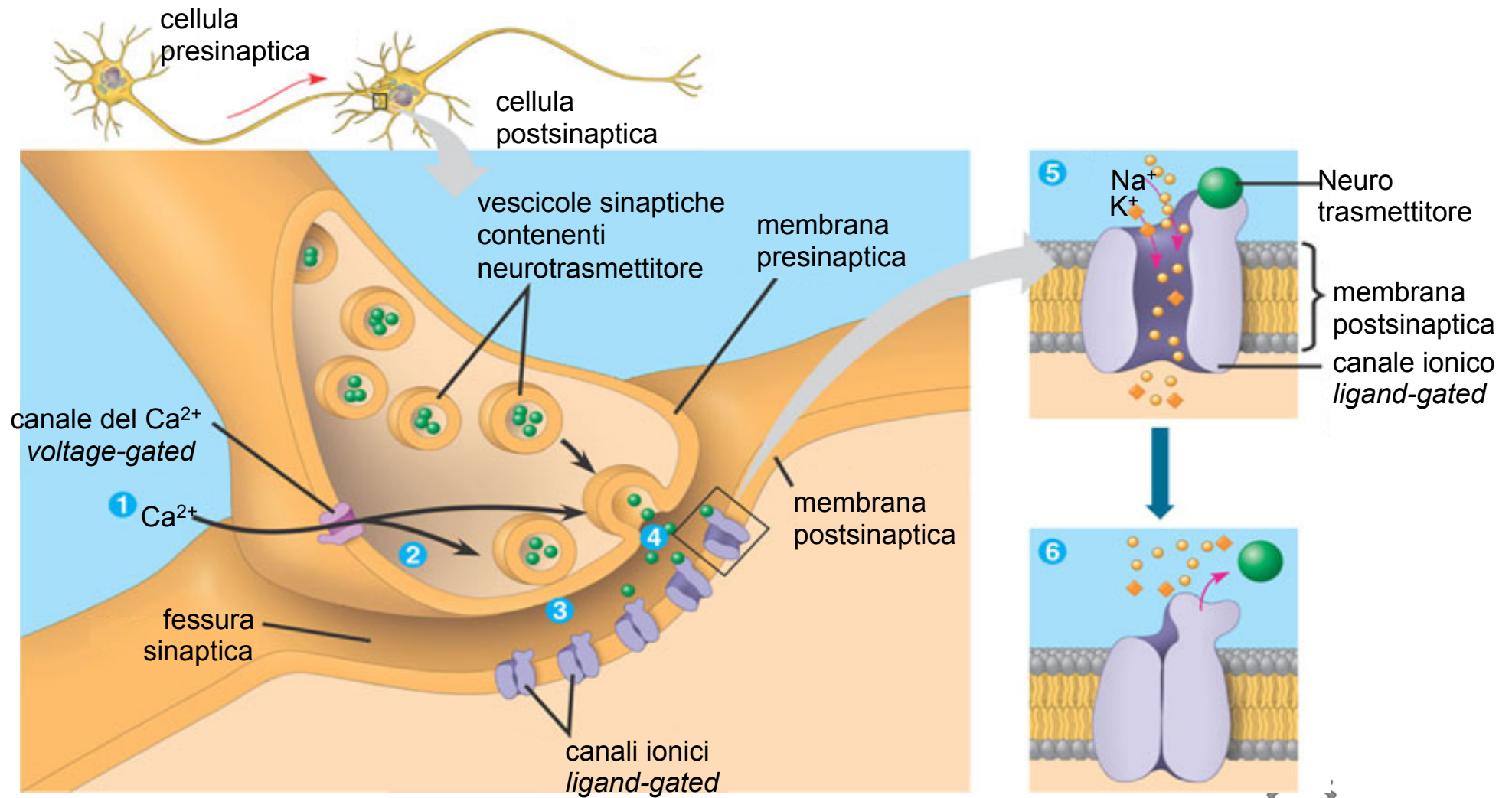


FIGURA 4.1 Il sistema nervoso centrale (AC = acetilcolina; NA = noradrenalina).
Riprodotta da Mann, J. (1992), *Murder magic, and medicine*, Oxford University Press,
per gent. conc.

La Sinapsi



Neurotrasmettitore: messaggero chimico, trasporta il messaggio al di là dell'interruzione sinaptica, si lega con una specifica proteina (recettore) incorporata nella membrana cellulare, provocando una cascata di effetti secondari dai quali risulta una risposta biologica.

Autacoidi (ormoni locali): sostanze che agiscono nelle immediate vicinanze del sito di produzione.

Ormoni: messaggeri chimici che devono percorrere lunghe distanze (es. adrenalina).

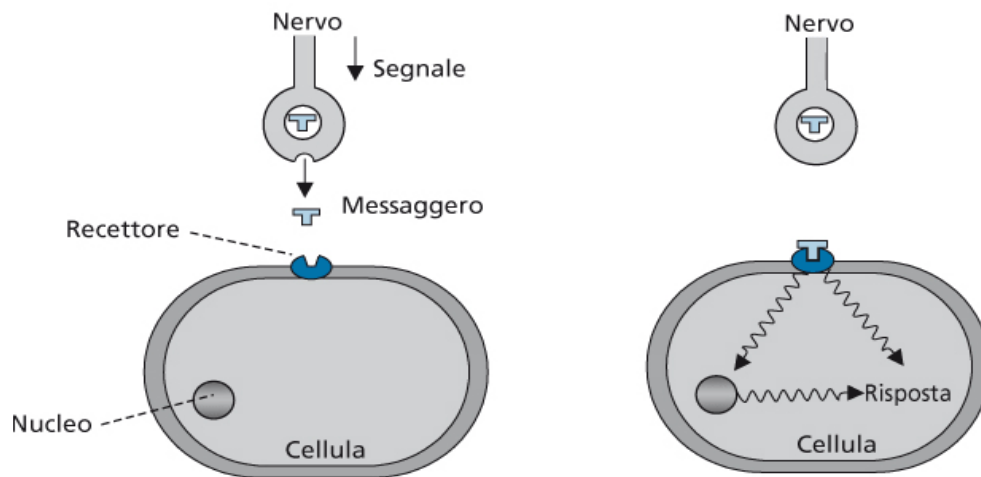


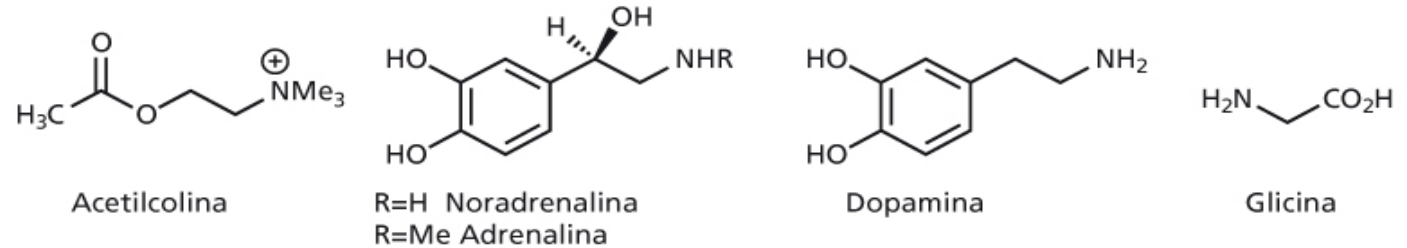
FIGURA 4.2 I neurotrasmettitori agiscono come messaggeri chimici che si legano a recettori e innescano reazioni all'interno di una cellula.

Siccome è coinvolto un processo chimico nel sistema di comunicazione, è possibile per altri agenti chimici (farmaci) interferire o interagire con il processo.

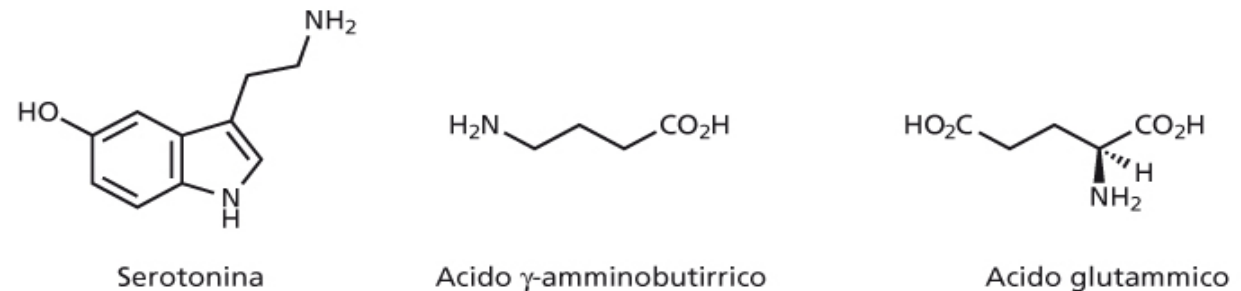
Tipi di messaggeri endogeni

Molecole semplici:

1. Monoammine



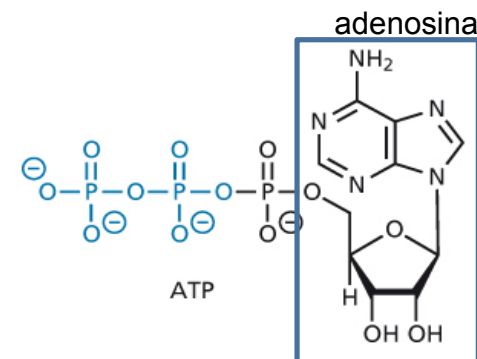
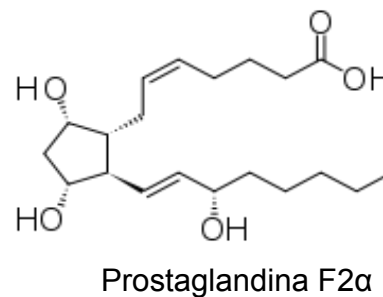
2. Amminoacidi



3. Ioni (Ca^{++} , K^{+} , Na^{+})

Molecole complesse:

1. Lipidi (prostaglandine)
2. Purine (adenosina, ATP)
3. Peptidi (endorfine, enkefaline, angiotensina)
4. Enzimi (trombina)



Tipi e sottotipi recettoriali

I **tipi** di recettori sono classificati dallo specifico neurotrasmettitore o ormone che li attiva. Il recettore attivato dalla dopamina è detto dopaminergico, quello attivato dall'acetilcolina colinergico, dall'adrenalina adrenergico.

Non tutti i recettori attivati dallo stesso messaggero chimico sono esattamente gli stessi (**sottotipi**). Per esempio i recettori adrenergici dei polmoni sono simili ma diversi da quelli del cuore. Piccole differenze derivano da piccole variazioni aminoacidiche e se queste variazioni sono a livello del sito di legame, allora si possono trovare farmaci che distinguono tra essi.

Endogenous ligand	Subtypes
Biogenic amines	
Acetylcholine	M ₁ , M ₂ , M ₃ , M ₄ , M ₅
Adrenaline, noradrenaline	β ₁ , β ₂ , β ₃ , α _{1A} , α _{1B} , α _{1D} , α _{2A} , α _{2B} , α _{2C}
Dopamine	D ₁ , D ₂ , D ₃ , D ₄ , D ₅
Histamine	H ₁ , H ₂ , H ₃ , H ₄
Serotonin	5-HT _{1A/B/D/E/F} ; 5-HT _{2A/B/C} ; 5-HT _{4/6/7} ; 5-HT _{5A/B}

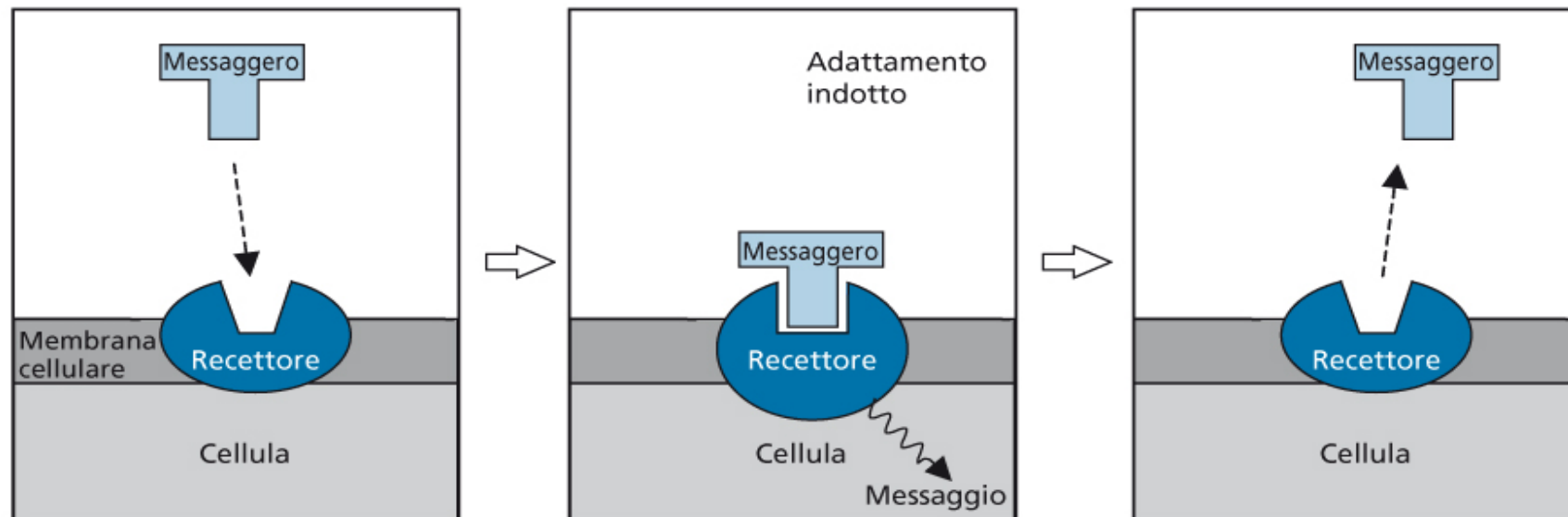
I sottotipi possono essere classificati con dei **numeri** o con il nome dei prodotti naturali che si legano ad essi (sottotipo muscarinico o nicotinico del recettore colinergico).

Attivazione dei recettori (Adattamento indotto)

Nel recettore, incorporato nella membrana, c'è un'area che ha la forma adeguata per accettare il messaggero che si avvicina.

Quando il messaggero si sistema nel sito di legame, il recettore, cambia forma, si "accende", il messaggio è ricevuto e parte la catena di eventi.

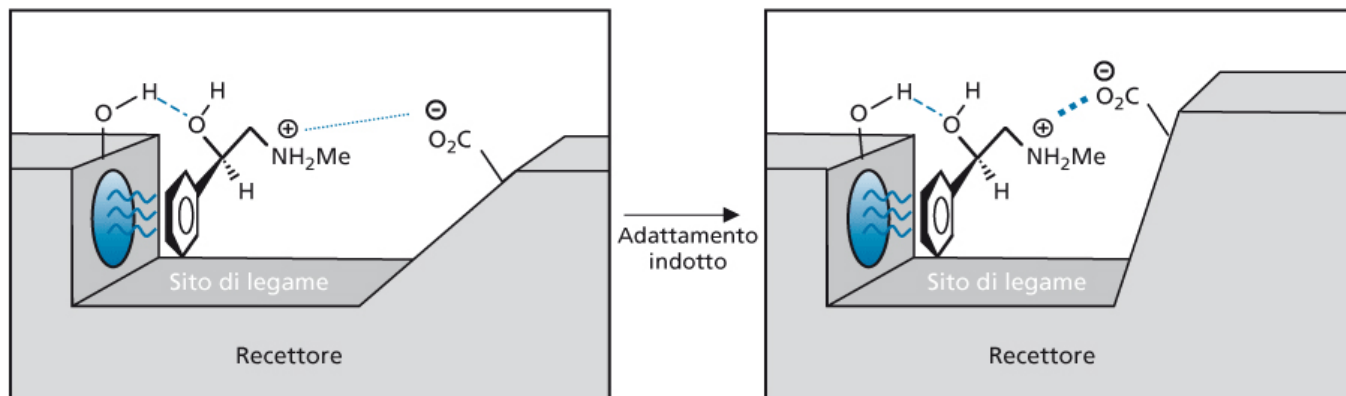
Le interazioni devono essere abbastanza forti da permettere il processo ma abbastanza deboli da permettere che alla fine il messaggero si allontani invariato.



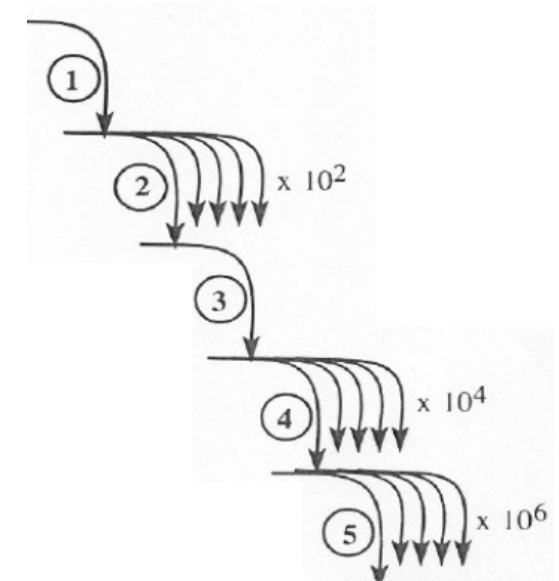
Recettori

L'adattamento indotto ha un effetto urto che modifica la forma complessiva della proteina.

Questo cambiamento innesca un effetto domino che influenza la chimica interna della cellula attraverso un processo detto trasduzione del segnale che ha anche un effetto di amplificazione.



Trasduzione del segnale



Effetto Biologico

Distinguiamo i recettori in:

- di membrana
- intracellulari

E' fondamentale che si formi un complesso tra il farmaco (D) ed il recettore (R) grazie a legami intermolecolari che possono essere continuamente rotti e riformati.

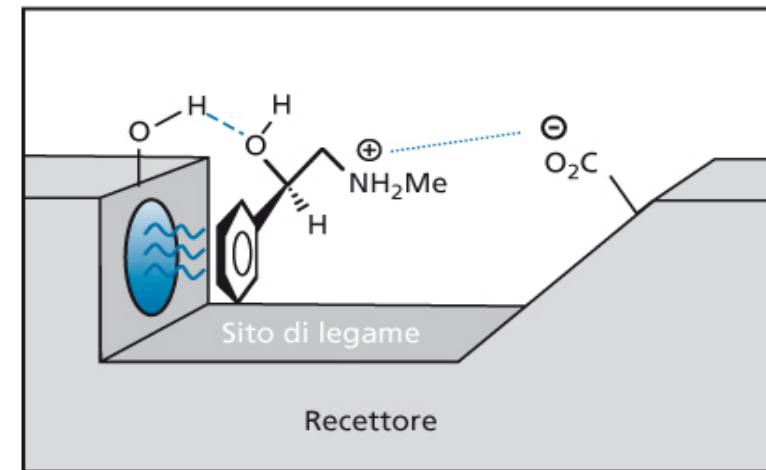


Si instaura un equilibrio tra il farmaco in soluzione D ed il farmaco legato al recettore DR.

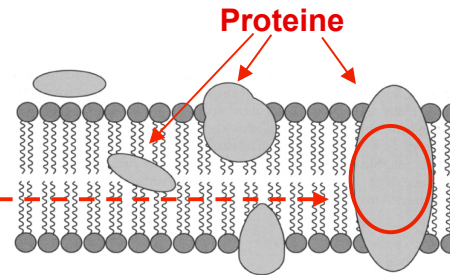
K_d : costante di dissociazione (mol/L)

Il tempo in cui il farmaco rimane legato dipende dal numero e dal tipo di interazioni intermolecolari che si formano.

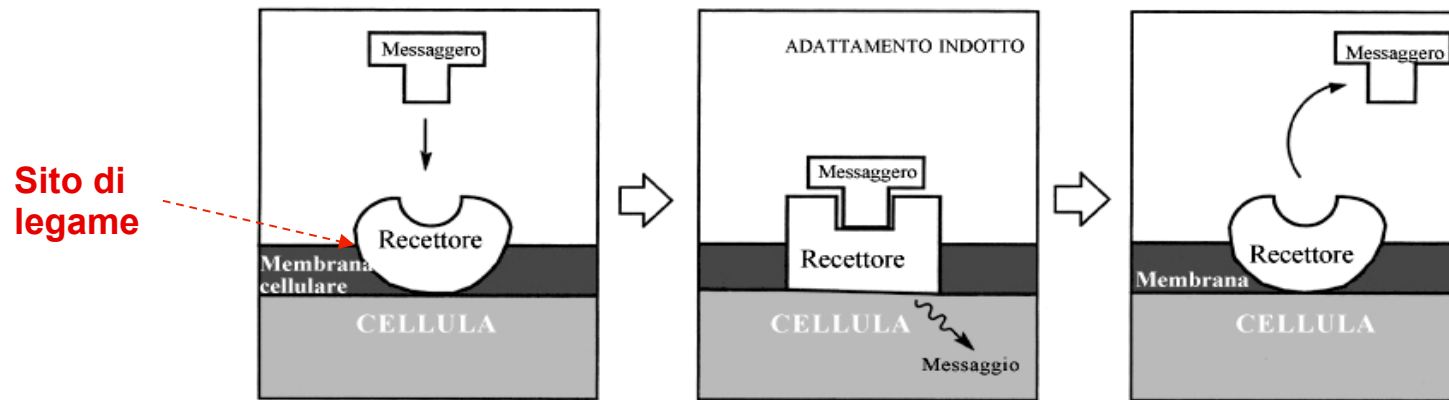
Bassi valori di K_d : elevata affinità per il recettore e maggiore stabilità del complesso Farmaco - recettore DR



Recettori di Membrana



RECETTORE: molecola proteica inglobata nella membrana cellulare; nella porzione affacciata verso lo spazio extracellulare: **sito di legame**



Adattamento indotto coinvolge altri componenti cellulari

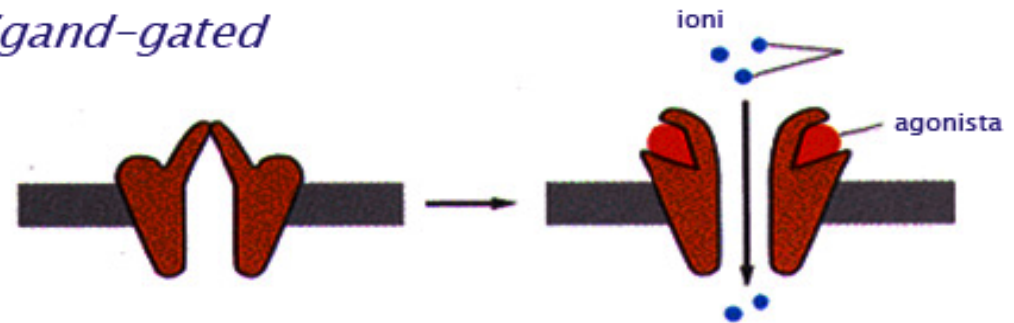
effetto biologico

Trasduzione del segnale:

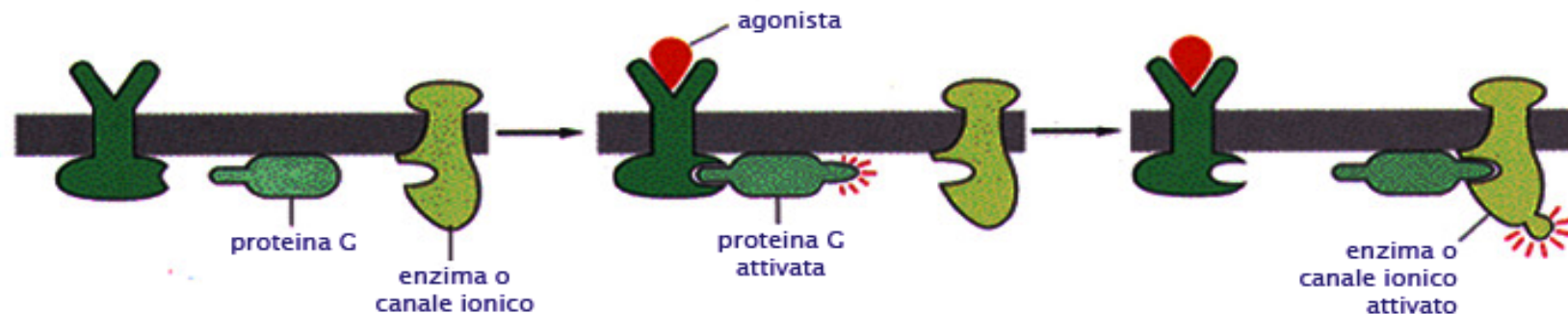
- ✓ AFFLUSSO di IONI nella cellula
- ✓ PROTEINE G di membrana
- ✓ ENZIMI DI MEMBRANA

Classificazione dei recettori di membrana sulla base della trasduzione del segnale

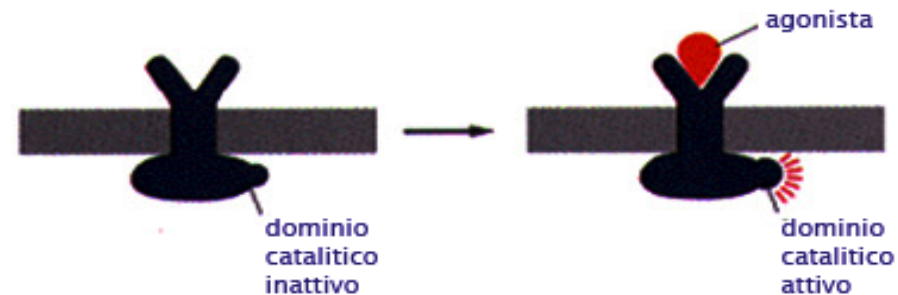
- Recettori **ionotropi**: canali ionici *ligand-gated*



- Recettori **metabotropi**: recettori accoppiati a proteine G

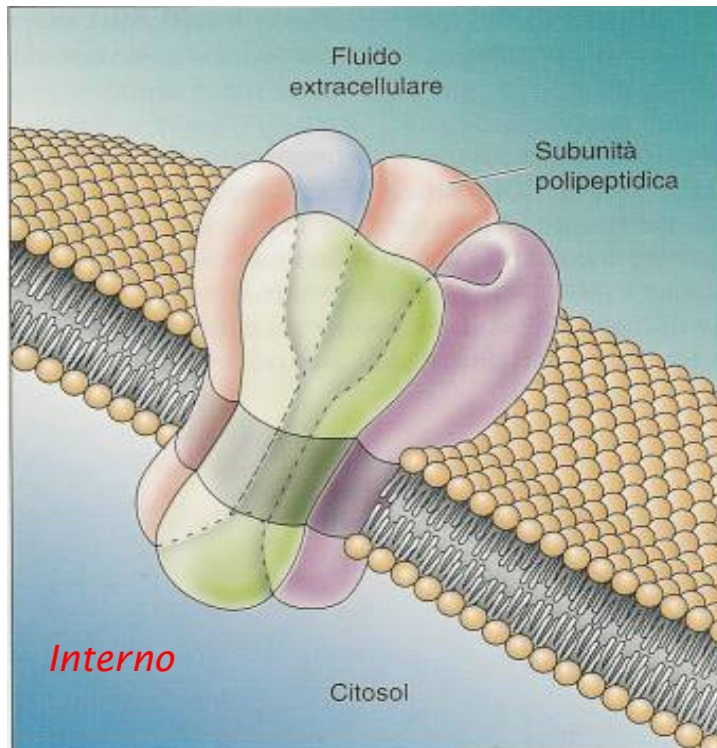


- Recettori ad attività enzimatica intrinseca

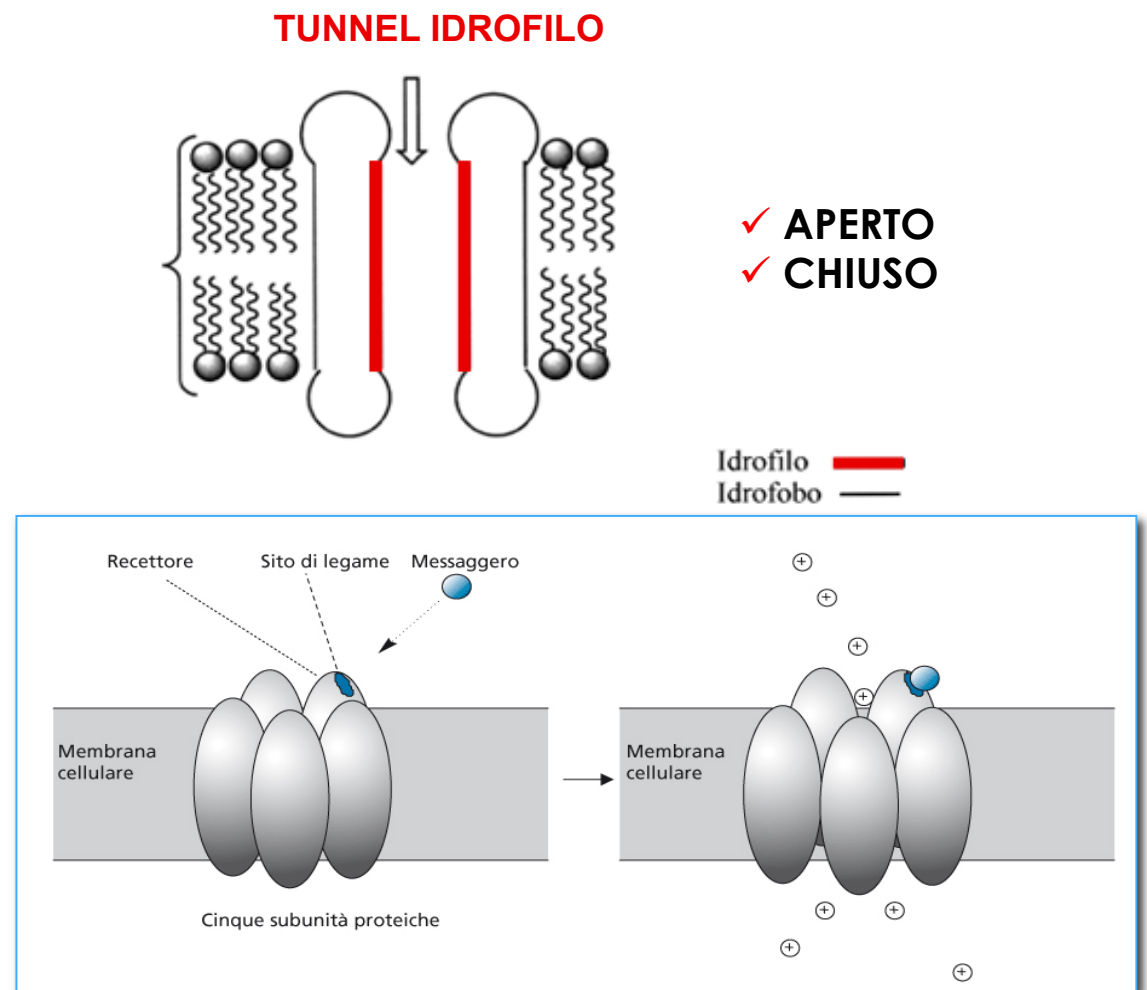


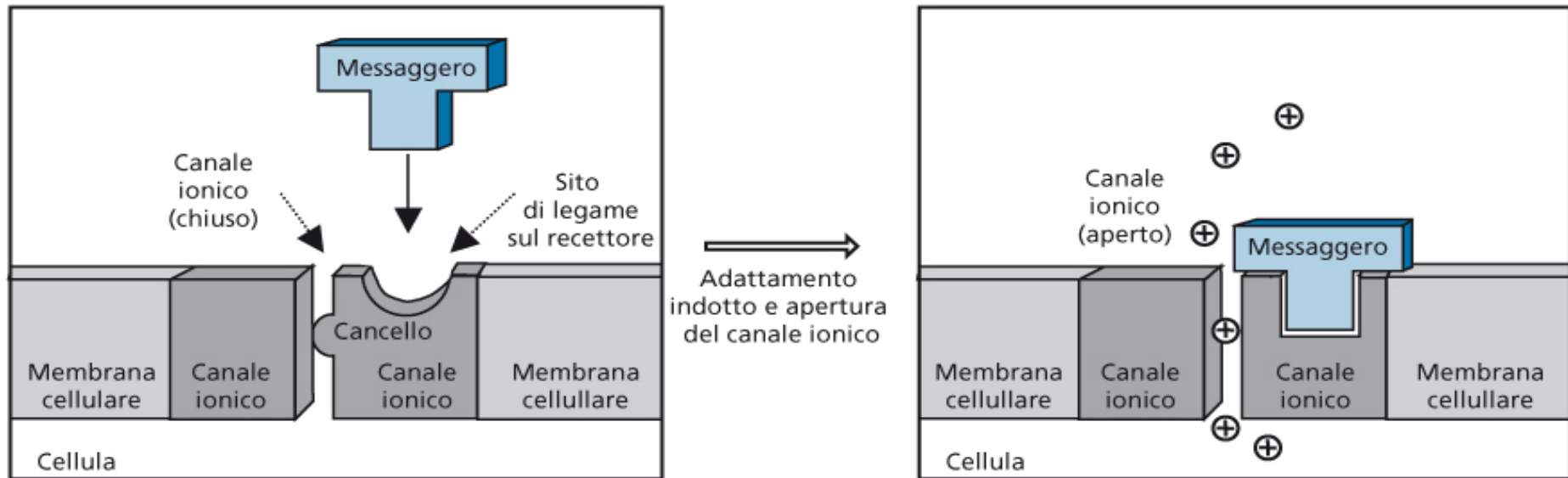
I. CANALI IONICI LIGANDO-DIPENDENTE (LIGAND-GATED ion channels)

Complessi proteici che attraversano la membrana cellulare (5 subunità di natura glicoproteica)



recettore: una delle subunità proteiche del canale sensibile ad un neurotrasmettitore

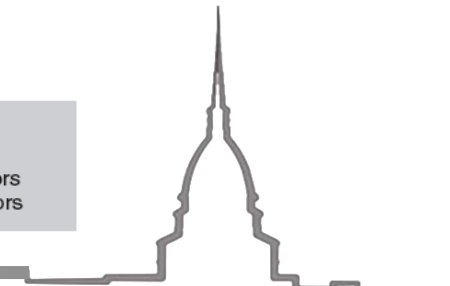
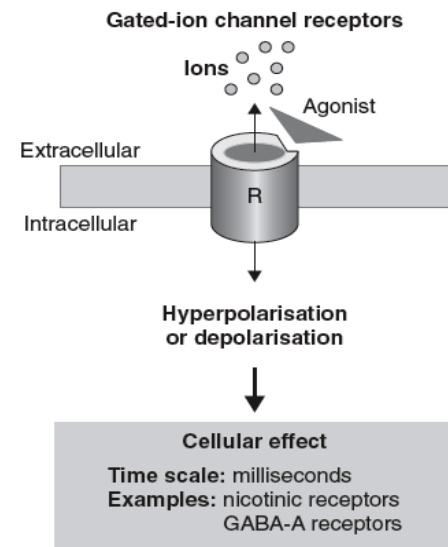




Recettori Ionotropi:

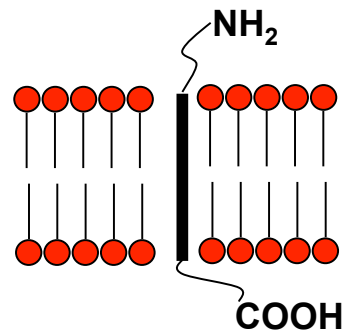
- recettori nicotinici per l'acetilcolina
- recettori per il glutammato
- recettori GABA_A per l'acido γ -aminobutirrico (GABA)
- recettori per la glicina

Acetilcolina e Glutammato: neurotrasmettitori eccitatori
GABA e Glicina: neurotrasmettitori inibitori



2. RECETTORI CON ATTIVITÀ ENZIMATICA INTRINSECA

Il recettore è un enzima, una tirosina chinasi o una guanilato ciclasi; il legame con il messaggero nella porzione extracellulare promuove direttamente l'attività enzimatica nella porzione intracellulare del recettore



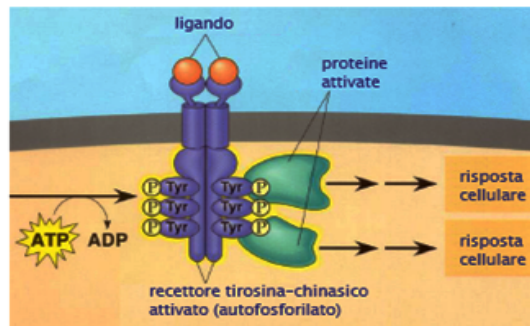
Recettori di diversi ormoni (es. insulina) e fattori di crescita (insulino simile, epiteliale, delle piastrine)

Recettori ad attività tirosin-chinasica

(es. insulina e fattori di crescita) legame col ligando: porzione citoplasmatica del recettore subisce autofosforilazione

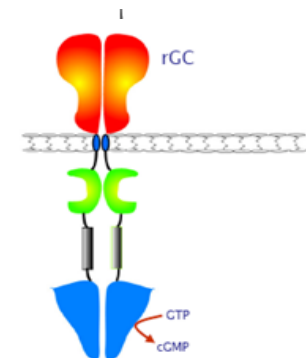
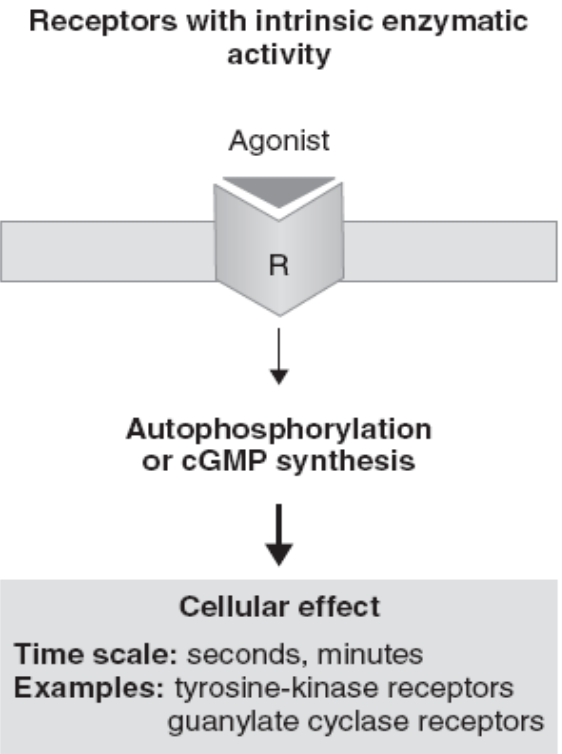


cascate di fosforilazioni

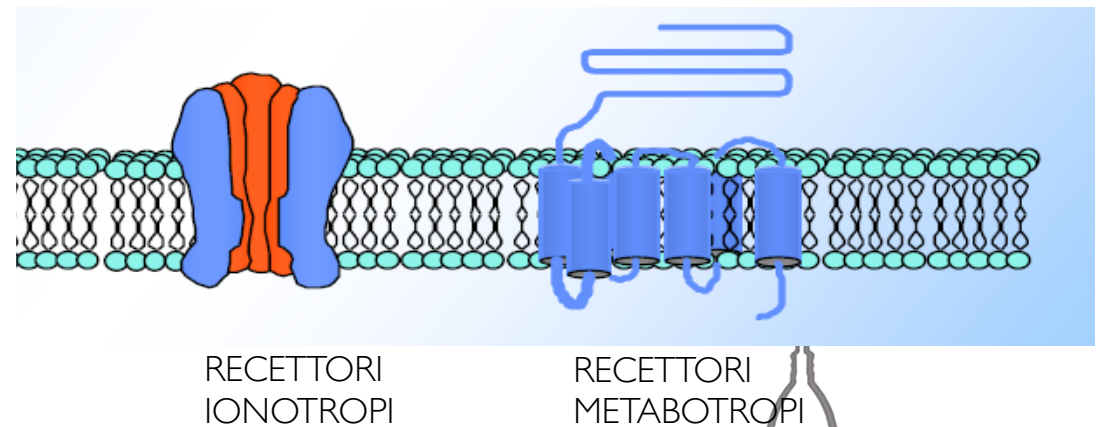
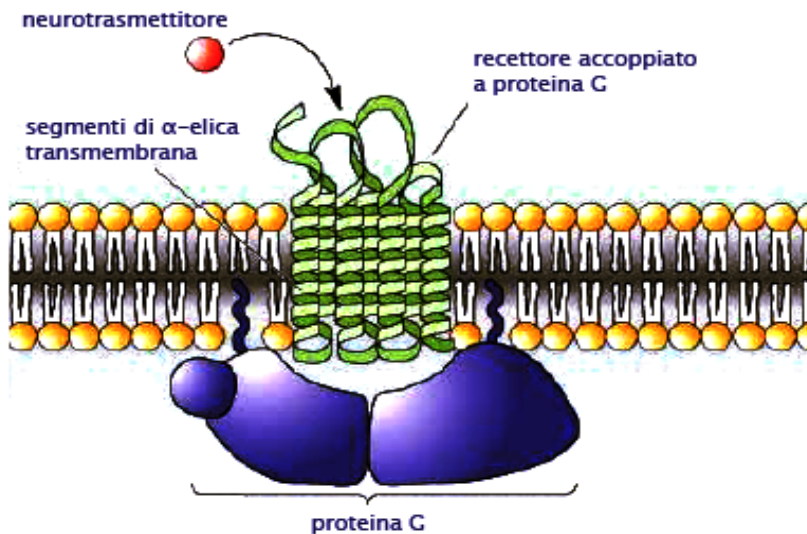
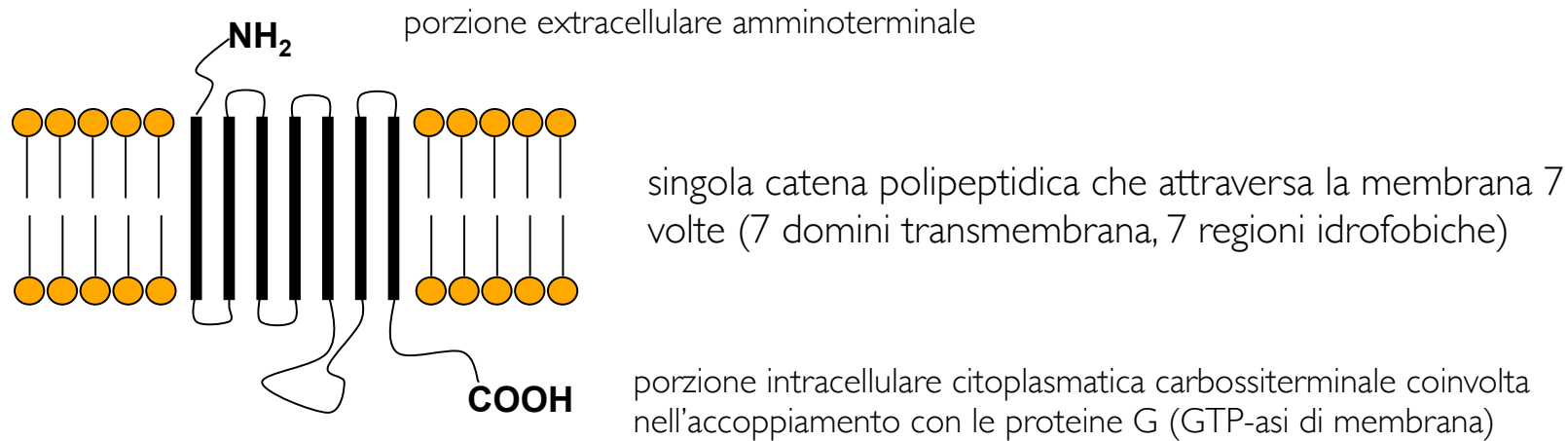


Recettori ad attività guanilato-ciclasica

legame col ligando attiva l'enzima $\Rightarrow$ ciclizzazione del GTP a cGMP



3. **RECETTORI ACCOPPIATI ALLE PROTEINE G** (proteine di membrana contenenti guanosina difosfato = GDP) $\Rightarrow$ trasducono il segnale mediante secondi messaggeri





Molecular targets



Enzymes



Enzimi come catalizzatori

Enzimi

Agenti che velocizzano una reazione chimica senza essere consumati.

Catalizzano le reazioni cellulari, che in loro assenza sarebbero troppo lente per essere utili.

Agiscono abbassando l'energia di attivazione contribuendo a stabilizzare lo stato di transizione.

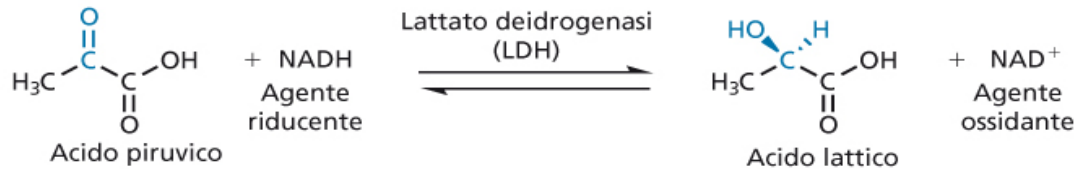


FIGURA 3.1 Reazione catalizzata da lattato deidrogenasi.

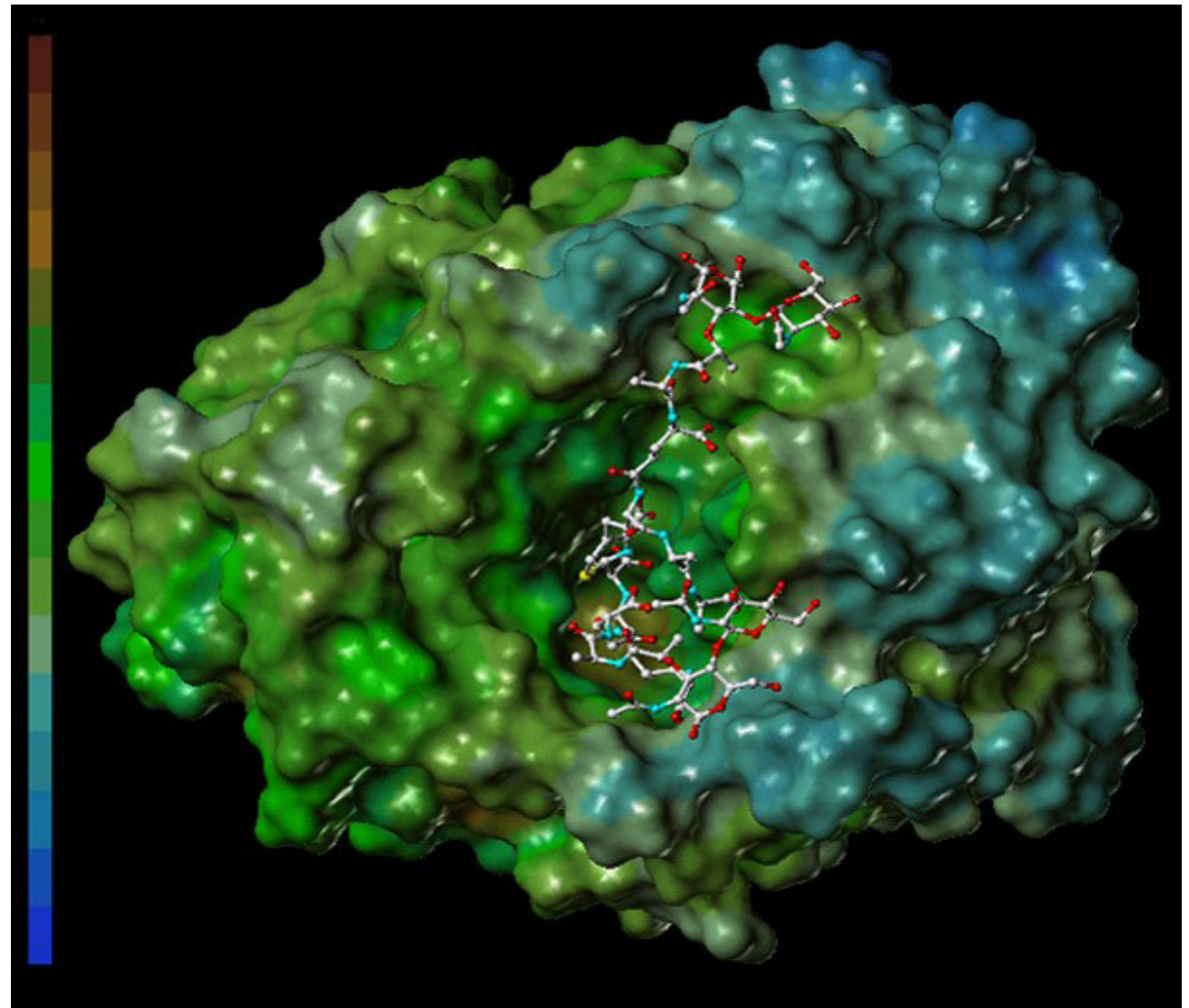
1. Forniscono una superficie di reazione ed un ambiente adatto.
2. Avvicinano i reagenti e li posizionano correttamente nella configurazione del loro stato di transizione.
3. Rendono deboli nei reagenti i legami che devono essere rotti.
4. Possono partecipare al meccanismo.

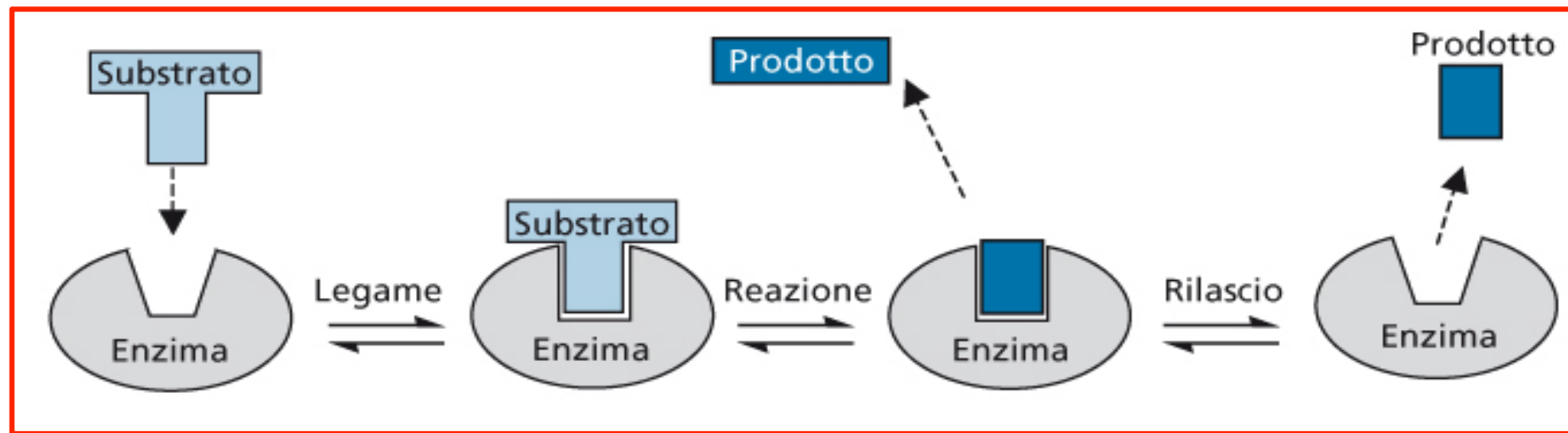


Il sito attivo di un enzima può essere una cavità, o un solco in una proteina in cui sono presenti importanti aminoacidi che legano il substrato o partecipano al meccanismo della reazione.

Gli aminoacidi del sito attivo hanno perciò più ruoli:

1. *di legame*
2. *catalitico*





Legame del substrato attivo

Il substrato induce il sito attivo ad assumere la forma ideale per accoglierlo e massimizzare le interazioni di legame (*adattamento indotto*).

Nel contempo anche il substrato modifica la sua forma: per esempio può ruotare un legame e assumere una particolare conformazione (non necessariamente la più stabile!), può allungare e indebolire dei legami che si devono rompere.

Ovvero si disporrà nella conformazione ideale per la reazione che seguirà.

Le interazioni però devono essere sufficientemente forti da bloccare il substrato per la successiva reazione, ma sufficientemente deboli per lasciare il sito attivo alla fine della reazione e non bloccarlo per una successiva reazione.

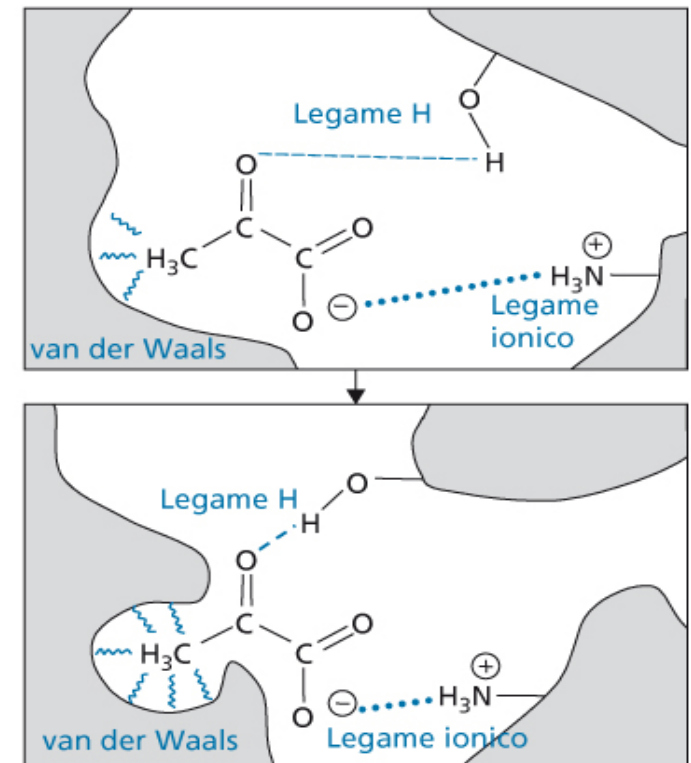


FIGURA 3.8 Esempio di un adattamento indotto.

- I. Acido base: spesso interviene l'istidina quale donatore ed accettore di protoni.

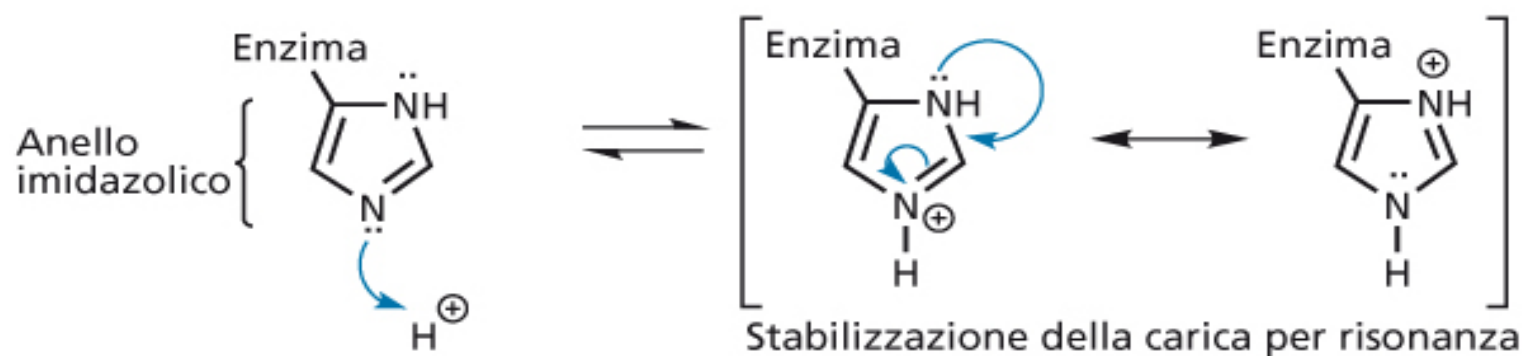
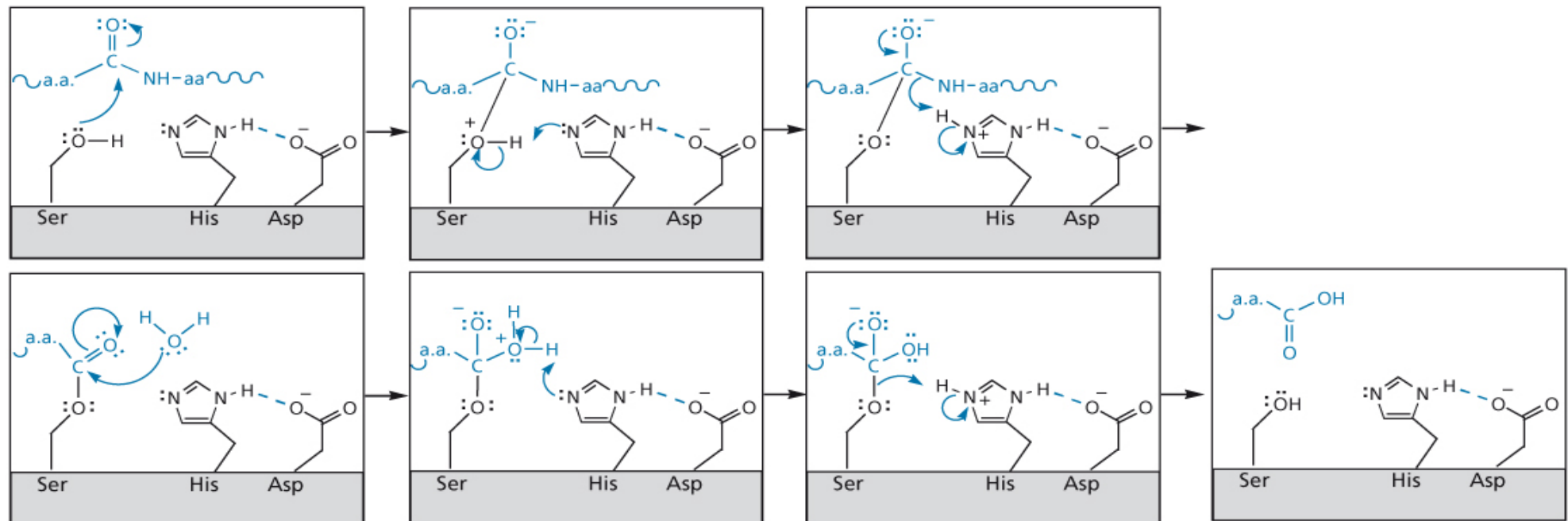


FIGURA 3.9 L'istidina che agisce come una base debole.

Ruolo catalitico

Enzimi

2. **Attacco nucleofilo:** serina e cisteina possiedono rispettivamente residui OH ed SH in grado di reagire con il substrato formando intermedi che possono evitare lo stato di transizione ad alta energia ed aumentare la velocità. Normalmente nelle vicinanze c'è un residuo di istidina a catalizzare l'attacco nucleofilo. Si riporta sotto l'idrolisi dei legami peptidici della chimotripsina che coinvolge una triade catalitica: serina come nucleofilo, istidina come catalizzatore acido-base, aspartato come orientatore dell'anello imidazolico nella posizione corretta.



Regolazione degli enzimi

Enzimi

Tutti gli enzimi hanno controlli interni od esterni che inibiscono o aumentano l'attività catalitica.

Il controllo può aver luogo a livello dei siti di legami allosterici, ovvero siti il cui legame con il proprio agente regolatore provoca un adattamento indotto che altera il sito attivo e lo rende irriconoscibile al substrato.

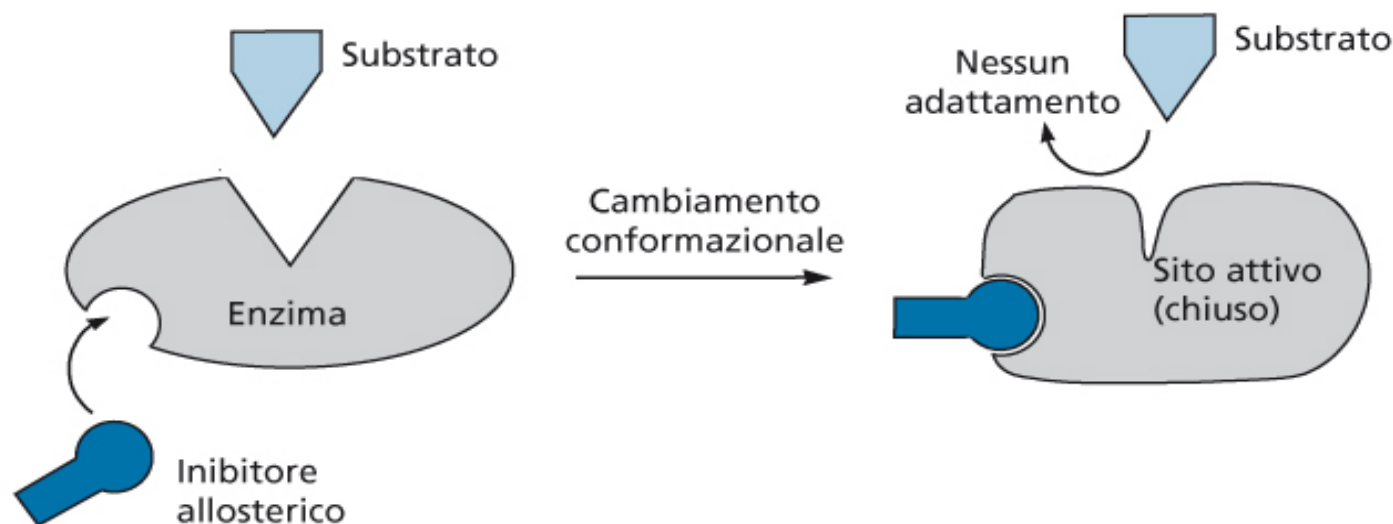


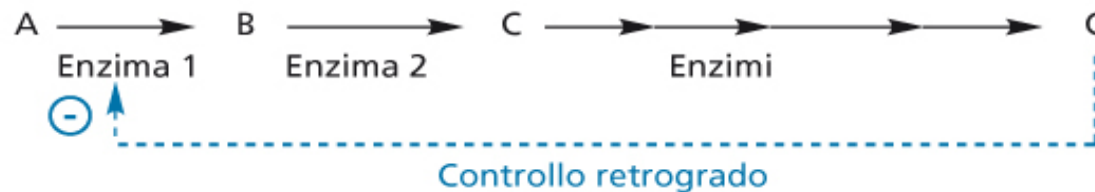
FIGURA 3.14 Inibizione allosterica di un enzima.

Regolazione degli enzimi

Enzimi

Controllo interno:

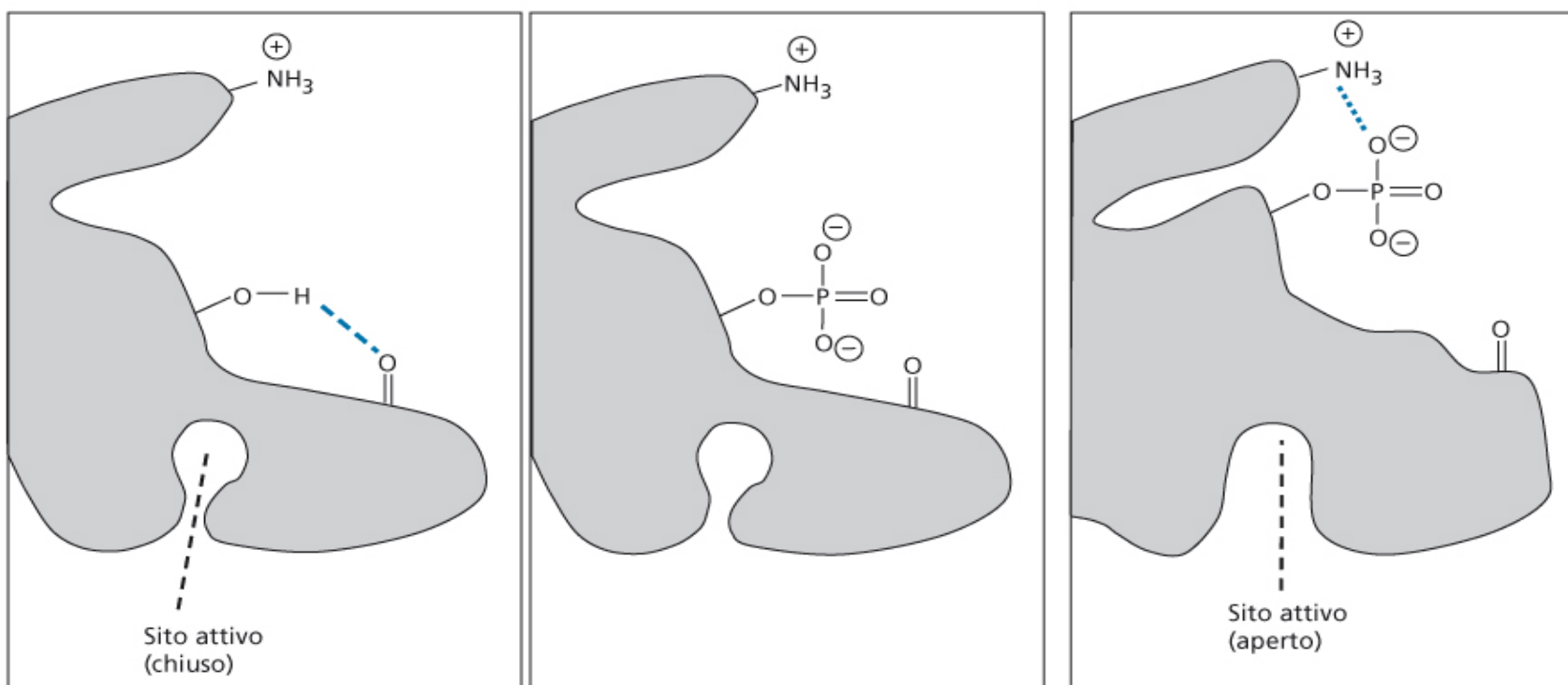
Un esempio di controllo interno è il controllo retrogrado: il prodotto di un percorso biosintetico controlla la propria sintesi inibendo il primo enzima del percorso stesso adattandosi ad un Sito di legame allosterico e provocando un adattamento indotto.



Controllo esterno:

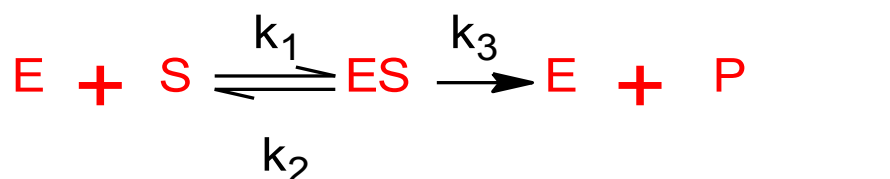
Neurotrasmettitori che innescano una cascata di segnali all'interno della cellula che a loro volta attivano un gruppo di enzimi, le protein kinasi, che fosforilando aminoacidi quali serina, treonina o tirosina in enzimi bersaglio, con un legame covalente li trasformano da inattivi ad attivi o viceversa.

La fosforilazione è una reazione chiave nell'attivazione e disattivazione di enzimi. Elimina interazioni a legame idrogeno con gli OH che fosforila e consente la formazione di nuovi legami ionici con il nuovo gruppo fosfato che introduce cambiando la struttura terziaria dell'enzima.



Cinetica enzimatica: eq. di *Michaelis-Menten*

Vale per un enzima **E** che si combina con il suo substrato **S** per formare un complesso enzima-substrato **ES**. Il substrato può poi dissociarsi per ridare **E + S** o andare avanti a formare il prodotto **P**. Si assume che la formazione del prodotto sia irreversibile:



$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad \text{Eq. Michaelis Menten}$$

A basse concentrazioni di substrato la velocità di reazione aumenta in maniera quasi proporzionale alla concentrazione del substrato, mentre a concentrazioni elevate la velocità diventa praticamente costante; questo andamento riflette la saturazione dei siti attivi disponibili.

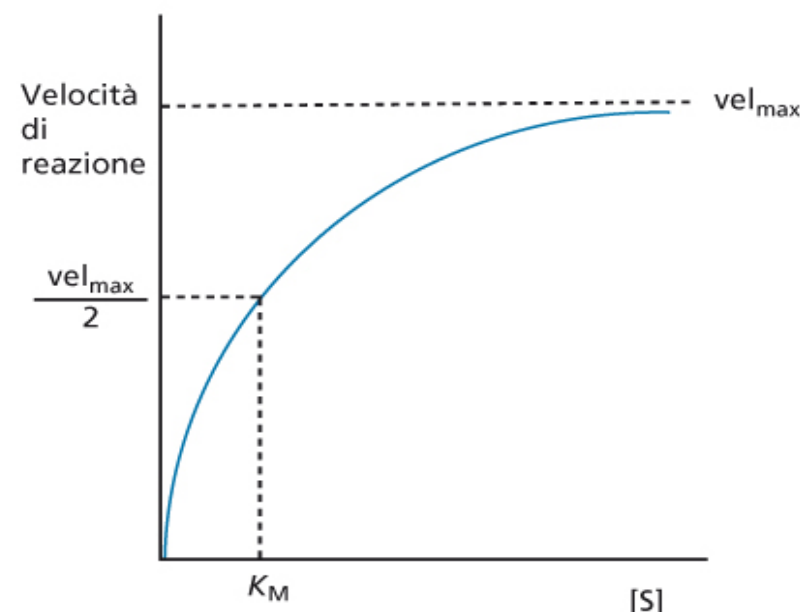
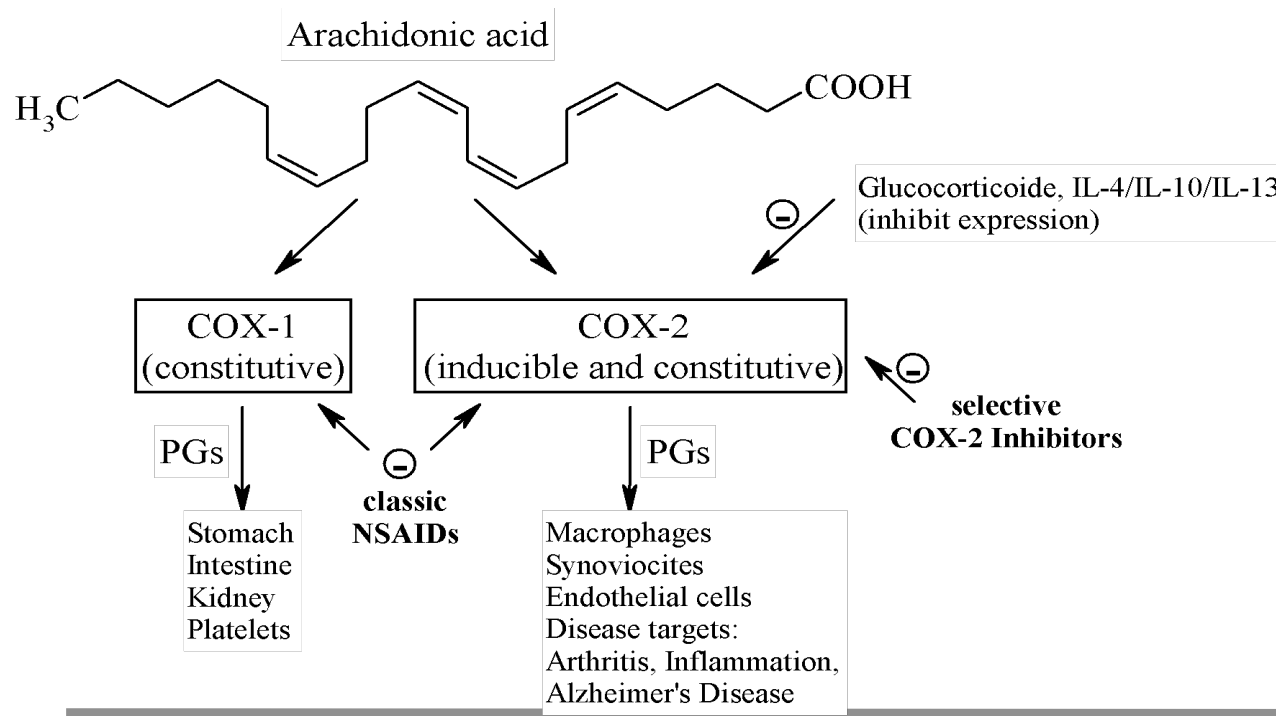


FIGURA 3.17 Velocità di reazione contro concentrazione di substrato.

Isoenzimi

Varianti dello stesso enzima, catalizzano la stessa reazione ma differiscono nella struttura primaria, nella specificità di substrato e nella distribuzione tissutale.

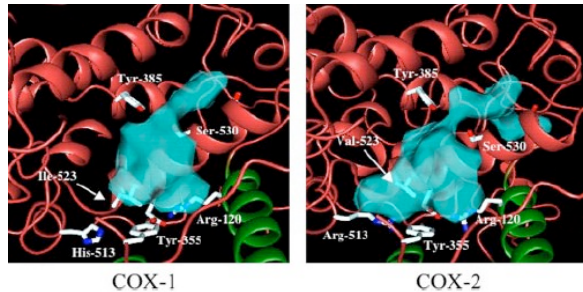
Ad esempio la cicloossigenasi (COX), enzima coinvolto nella biosintesi delle prostaglandine (PG, agenti responsabili del dolore e dell'infiammazione), esiste in più isoforme (ad oggi sono note le COX1 ,COX2, COX3).



Le COX1 sono presenti in condizioni fisiologiche (costitutive).

Le COX2 sono costitutive in cuore e reni e inducibili negli altri organi in stati infiammatori.

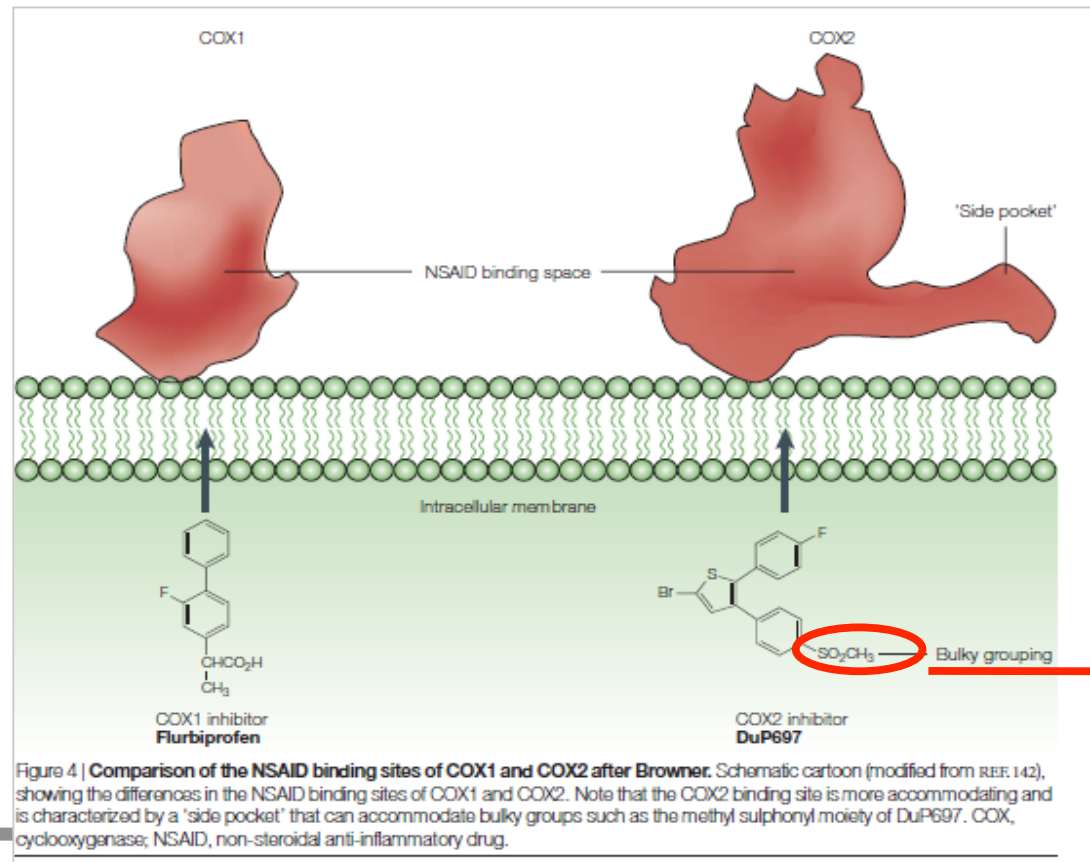
Isoenzimi: inibitori competitivi della cicloossigenasi COX

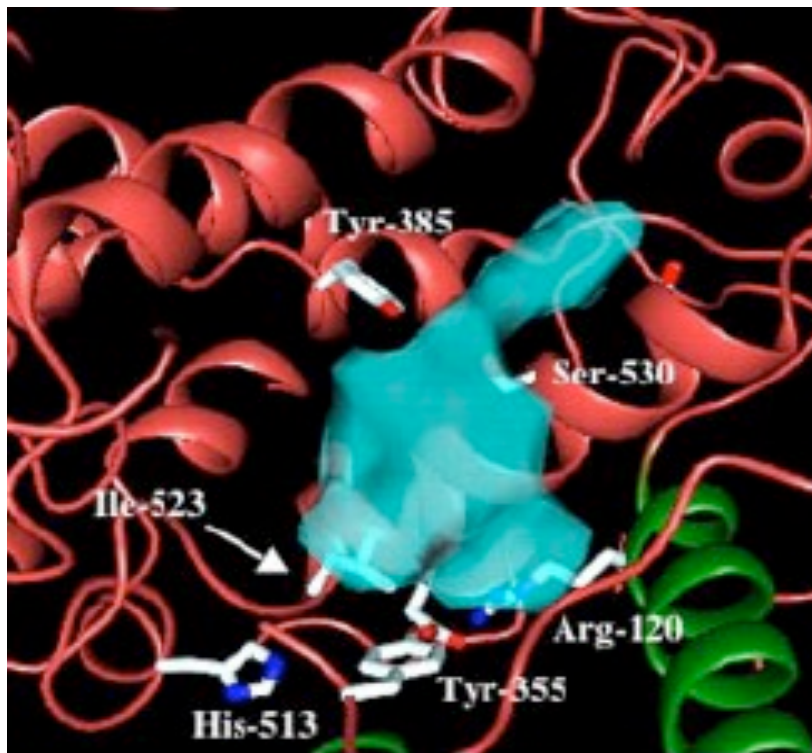


L'inibizione dell'enzima COX abbassa i livelli di PG e allevia i sintomi della infiammazione, tuttavia ci sono PG con effetti benefici nel tratto GI e nei reni.

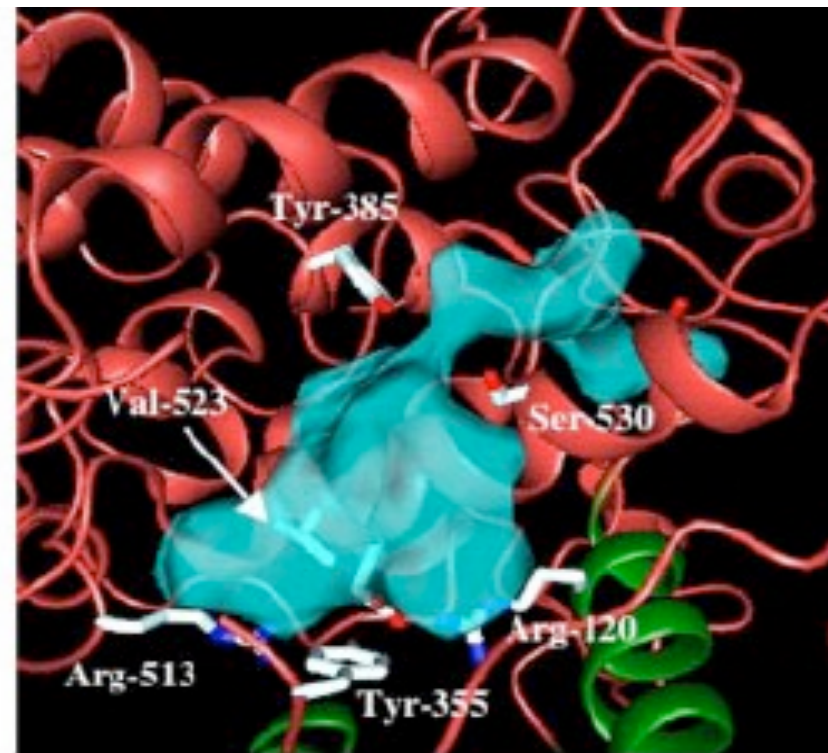
La maggior parte degli antiinfiammatori non steroidei (NSAIDs) agisce bloccando entrambe le isoforme (no selettività).

Inibitori competitivi: si legano in una zona dell'enzima dedicata *binding* col substrato. Competono quindi con il substrato stesso nel il sito attivo.





COX-1

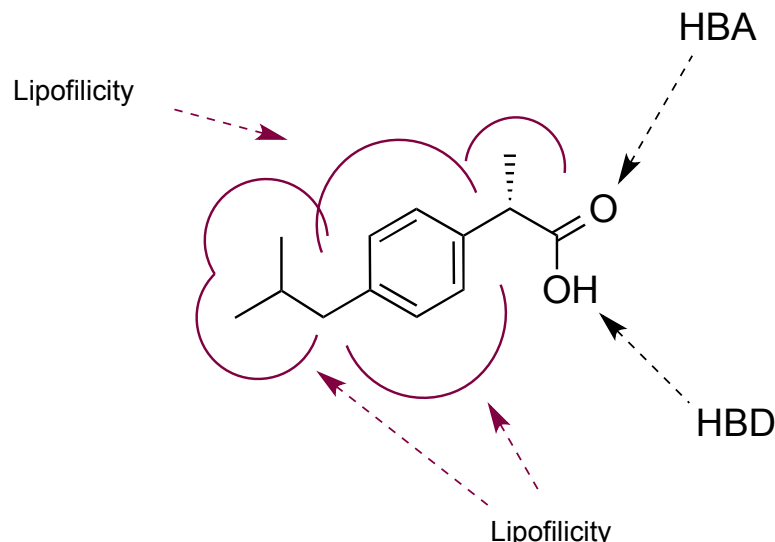


COX-2

In rosso il dominio catalitico e in verde il dominio di legame di membrana della COX. I residui aminoacidici che si affacciano all'interno del sito attivo sono riportati in bianco e in azzurro la superficie accessibile al solvente.



- Nome: **Ibuprofen**
- (2R,S)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoic acid.
- Classe: Antiinfiammatori non steroidei (FANS)
- Meccanismo: inibizione della ciclossigenasi COX



DEFINITION

(2R,S)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoic acid.

Content: 98.5 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white, crystalline powder or colourless crystals.

Solubility: practically insoluble in water, freely soluble in acetone, in methanol and in methylene chloride. It dissolves in dilute solutions of alkali hydroxides and carbonates.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 4.2

Ibuprofen

07/2002:0721 TESTS

Solution S. Dissolve 2.0 g in *methanol R* and dilute to 20 ml with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, Method II).

Angle of optical rotation (2.2.7): -0.05° to $+0.05^\circ$. Dissolve 0.50 g in *methanol R* and dilute to 20.0 ml with the same solvent.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29). **Test solution.** Dissolve 20 mg of the substance to be examined in 2 ml of *acetonitrile R* and dilute to 10.0 ml with mobile phase A.

Reference solution (a). Dilute 1.0 ml of the test solution to 100.0 ml with mobile phase A.

Reference solution (b). Dissolve 20 mg of *ibuprofen CRS* in 2 ml of *acetonitrile R*, add 1.0 ml of a 0.06 g/l solution of *ibuprofen impurity B CRS* in *acetonitrile R* and dilute to 10.0 ml with mobile phase A.

Column:

- size: $l = 0.15$ m, $\phi = 4.6$ mm,
- stationary phase: octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 μ m).

Mobile phase:

- mobile phase A: mix 0.5 volumes of *phosphoric acid R*, 340 volumes of *acetonitrile R* and 600 volumes of *water R*; allow to equilibrate and dilute to 1000 volumes with *water R*,
- mobile phase B: *acetonitrile R*,

Time (min)	Mobile phase A (per cent V/V)	Mobile phase B (per cent V/V)
0 - 25	100	0
25 - 55	100 $\rightarrow$ 15	0 $\rightarrow$ 85
55 - 70	15	85
70 - 75	15 $\rightarrow$ 100	85 $\rightarrow$ 0

Flow rate: 2 ml/min.

Detection: spectrophotometer at 214 nm.

Equilibration: for about 45 min with mobile phase A.

Injection: 20 μ l.

System suitability: reference solution (b):

- peak-to-valley ratio: minimum of 1.5, where H_p = height above the baseline of the peak due to impurity B, and H_v = height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to ibuprofen. If necessary, adjust the concentration of the reference solution.

Limits:

- impurity B: not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.3 per cent),
- any other impurity: not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.3 per cent),
- total of all impurities apart from impurity B: not more than 0.7 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.7 per cent),
- disregard limit: 0.05 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

Impurity F. Gas chromatography (2.2.28). Normalisation procedure.

IBUPROFEN
Ibuprofenum

CC(C)Cc1ccc(cc1)[C@H](C(=O)O)C and enantiomer

$C_{13}H_{18}O_2$ M_r 206.3

DEFINITION
(2R,S)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoic acid.
Content: 98.5 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS
Appearance: white, crystalline powder or colourless crystals.
Solubility: practically insoluble in water, freely soluble in acetone, in methanol and in methylene chloride. It dissolves in dilute solutions of alkali hydroxides and carbonates.

IDENTIFICATION
First identification: A, C.
Second identification: A, B, D.
A. Melting point (2.2.14): 75°C to 78°C .
B. Dissolve 50.0 mg in a 4 g/l solution of *sodium hydroxide R* and dilute to 100.0 ml with the same alkaline solution. Examined between 240 nm and 300 nm (2.2.25), using a spectrophotometer with a band width of 1.0 nm and a scan speed of not more than 50 nm/min, the solution shows a shoulder at 258 nm and 2 absorption maxima, at 264 nm and 272 nm. The ratio of the absorbance measured at the maximum at 264 nm to that measured at the shoulder at 258 nm is 1.20 to 1.30. The ratio of the absorbance measured at the maximum at 272 nm to that measured at the shoulder at 258 nm is 1.00 to 1.10.
C. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).
Preparation: discs.
Comparison: *ibuprofen CRS*.
D. Thin-layer chromatography (2.2.27).
Test solution. Dissolve 50 mg of the substance to be examined in *methylene chloride R* and dilute to 10 ml with the same solvent.
Reference solution. Dissolve 50 mg of *ibuprofen CRS* in *methylene chloride R* and dilute to 10 ml with the same solvent.
Plate: TLC silica gel plate R.
Mobile phase: *anhydrous acetic acid R*, *ethyl acetate R*, *hexane R* (5:24:71 V/V/V).
Application: 5 μ l.
Development: over a path of 10 cm.
Drying: at 120°C for 30 min.
Detection: lightly spray with a 10 g/l solution of *potassium permanganate R* in *dilute sulphuric acid R* and heat at 120°C for 20 min. Examine in ultraviolet light at 365 nm.
Results: the principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position, colour and size to the principal spot in the chromatogram obtained with the reference solution.

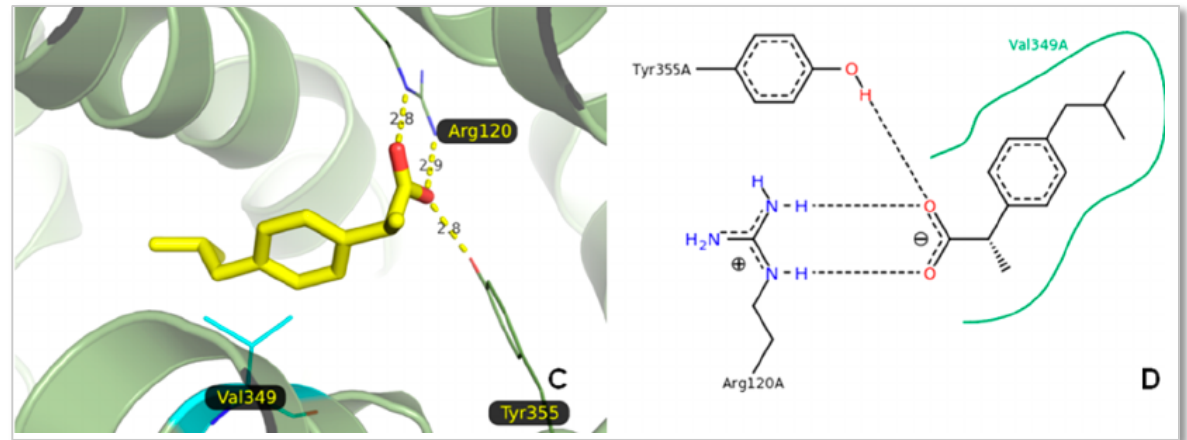
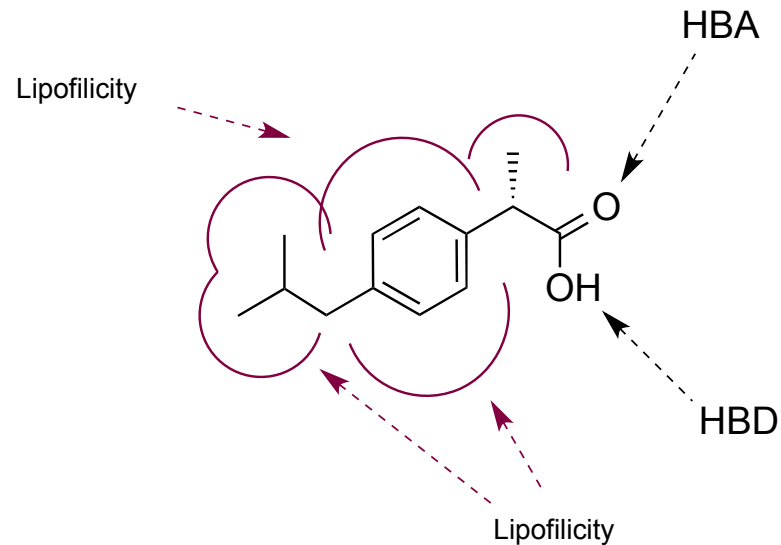
General Notices (1) apply to all monographs and other texts

2737

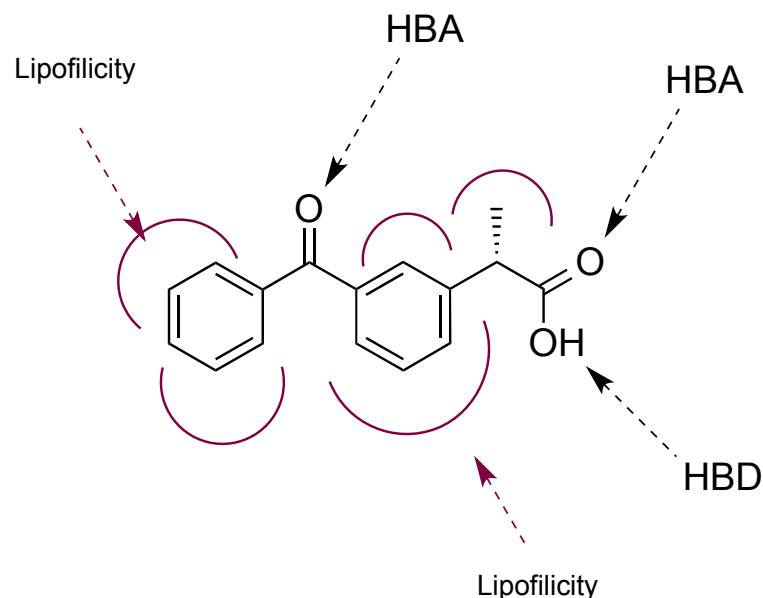
European Pharmacopoeia 9.0 Volume I

A. Melting point (2.2.14): 75°C to 78°C .

- Nome: **Ibuprofen**
- (2R,S)-2-[4-(2-Methylpropyl)phenyl]propanoic acid.
- Classe: Antiinfiammatori non steroidei (FANS)
- Meccanismo: inibizione della ciclossigenasi COX



- Nome: **Ketoprofen**
- (2*RS*)-2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid.
- Classe: Antiinfiammatori non steroidei (FANS)
- Meccanismo: inibizione della ciclossigenasi COX



DEFINITION

Ketoprofen contains not less than 99.0 per cent and not more than the equivalent of 100.5 per cent of (2*RS*)-2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid, calculated with reference to the dried substance.

CHARACTERS

A white or almost white, crystalline powder, practically insoluble in water, freely soluble in acetone, in ethanol (96 per cent) and in methylene chloride.

IDENTIFICATION

First identification: C.

Second identification: A, B, D.

A. Melting point (2.2.14): 94 °C to 97 °C.

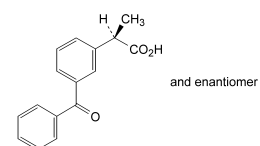
Ketoprofen

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0

01/2005:0922 TESTS

KETOPROFEN

Ketoprofenum



and enantiomer

C₁₈H₁₄O₃

M_r 254.3

DEFINITION

Ketoprofen contains not less than 99.0 per cent and not more than the equivalent of 100.5 per cent of (2*RS*)-2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid, calculated with reference to the dried substance.

CHARACTERS

A white or almost white, crystalline powder, practically insoluble in water, freely soluble in acetone, in ethanol (96 per cent) and in methylene chloride.

IDENTIFICATION

First identification: C.

Second identification: A, B, D.

A. Melting point (2.2.14): 94 °C to 97 °C.

B. Dissolve 50.0 mg in ethanol (96 per cent) R and dilute to 100.0 ml with the same solvent. Dilute 1.0 ml to 50.0 ml with ethanol (96 per cent) R. Examined between 230 nm and 350 nm (2.2.25), the solution shows an absorption maximum at 255 nm. The specific absorbance at the absorption maximum is 615 to 680.

C. Examine by infrared absorption spectrophotometry (2.2.24), comparing with the spectrum obtained with ketoprofen CRS.

D. Examine by thin-layer chromatography (2.2.27), using silica gel GF₂₅₄ R as the coating substance.

Test solution. Dissolve 10 mg of the substance to be examined in acetone R and dilute to 10 ml with the same solvent.

Reference solution (a). Dissolve 10 mg of ketoprofen CRS in acetone R and dilute to 10 ml with the same solvent.

Reference solution (b). Dissolve 10 mg of indometacin CRS in acetone R and dilute to 10 ml with the same solvent. To 1 ml of the solution add 1 ml of reference solution (a).

Apply separately to the plate 10 µl of each solution. Develop over a path of 15 cm using a mixture of 1 volume of glacial acetic acid R, 49 volumes of methylene chloride R and 50 volumes of acetone R. Allow the plate to dry in air and examine in ultraviolet light at 254 nm. The principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position and size to the principal spot in the chromatogram obtained with reference solution (a). The test is not valid unless the chromatogram obtained with reference solution (b) shows 2 clearly separated principal spots.

Appearance of solution. Dissolve 1.0 g in acetone R and dilute to 10 ml with the same solvent. The solution is clear (2.2.1) and not more intensely coloured than reference solution Y₆ (2.2.2, Method II).

Related substances. Prepare the solutions immediately before use. Examine by liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 20.0 mg of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 20.0 ml with the mobile phase.

Reference solution (a). Dilute 1.0 ml of the test solution to 50.0 ml with the mobile phase. Dilute 1.0 ml to 10.0 ml with the mobile phase.

Reference solution (b). Dissolve 5.0 mg of ketoprofen impurity A CRS in the mobile phase and dilute to 50.0 ml with the mobile phase. Dilute 1.0 ml to 50.0 ml with the mobile phase.

Reference solution (c). Dissolve 5.0 mg of ketoprofen impurity C CRS in the mobile phase and dilute to 50.0 ml with the mobile phase. Dilute 1.0 ml to 50.0 ml with the mobile phase.

Reference solution (d). Dilute 1.0 ml of the test solution to 100.0 ml with the mobile phase. To 1.0 ml add 1.0 ml of reference solution (b).

The chromatographic procedure may be carried out using:

- a stainless steel column 0.15 m long and 4.6 mm in internal diameter packed with a spherical octadecylsilyl silica gel for chromatography R (5 µm) with a specific surface area of 350 m²/g and a pore size of 10 nm,
- as mobile phase at a flow rate of 1 ml/min a mixture of 2 volumes of phosphate buffer solution pH 3.5 R, freshly prepared, 43 volumes of acetonitrile R and 55 volumes of water R,
- as detector a spectrophotometer set at 233 nm,
- a loop injector.

Inject 20 µl of reference solution (d). The substances are eluted in the following order: ketoprofen and ketoprofen impurity A. Adjust the sensitivity of the detector so that the heights of the 2 principal peaks in the chromatogram obtained are not less than 50 per cent of the full scale of the recorder. The test is not valid unless the resolution between the peaks corresponding to ketoprofen and ketoprofen impurity A is at least 7.0.

Inject 20 µl of the test solution, 20 µl of reference solution (a), 20 µl of reference solution (b) and 20 µl of reference solution (c). Continue the test solution for 7 times the retention time = about 7 min) are as follows: impurity H = about 0.39; impurity E = about 0.69; impurity D = about 1.35; impurity A = about 1.50; impurity F = about 1.95; impurity L = about 2.49. In the chromatogram obtained with the test solution: the areas of the peaks corresponding to ketoprofen impurity A and ketoprofen impurity C, is not greater than the areas of the peaks corresponding to ketoprofen impurity A and ketoprofen impurity C, respectively of any peak, apart from the principal peak corresponding to ketoprofen impurity C, is not greater than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.2 per cent); the sum of the areas of all the peaks, apart from the principal peak and any peaks corresponding to the

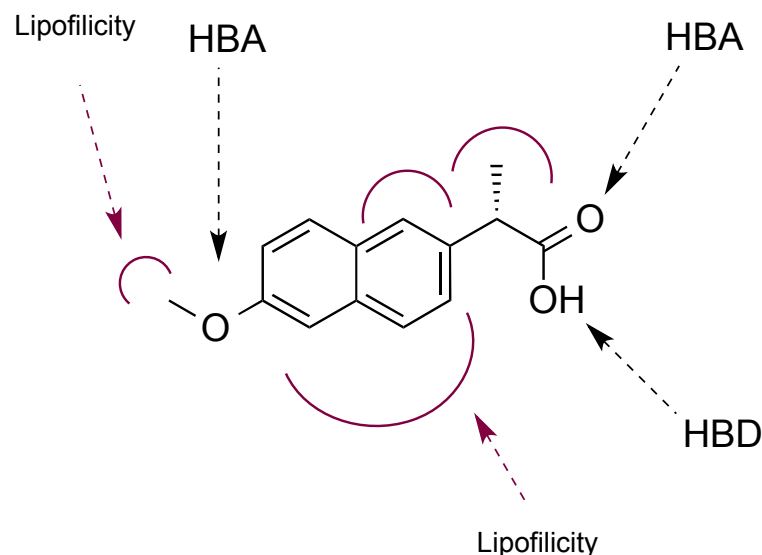


- Nome: **Naproxen**

(2S)-2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid

- Classe: Antiinfiammatori non steroidei (FANS)

- Meccanismo: inibizione della ciclossigenasi COX



CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder.

Solubility: practically insoluble in water, soluble in ethanol (96 per cent) and in methanol.

B. Melting point (2.2.14): 154 °C to 158 °C.

Naproxen

Test solution. Dissolve 50.0 mg in 0.01 M hydrochloric acid and dilute to 250.0 mL with the same acid. Dilute 25.0 mL of the solution to 100.0 mL with 0.01 M hydrochloric acid.

Spectral range: 230-350 nm.

Absorption maximum: at 270 nm, 280 nm, 287 nm and 291 nm.

Absorbance ratio:

– $A_{270}/A_{280} = 0.82$ to 0.86,

– $A_{291}/A_{280} = 0.65$ to 0.69.

C. Infrared absorption spectrophotometry (2.2.24).

Comparison: naphazoline nitrate CRS.

D. Dissolve 45 mg of the substance to be examined in 2 mL of water R. Add 1 mL of sulfuric acid R. Shake carefully and allow to cool. Add 1 mL of ferrous sulfate solution R2 dropwise along the walls of the container. At the junction of the 2 liquids, a brown colour develops.

TESTS

Solution S. Dissolve 0.5 g in carbon dioxide-free water R, warming gently, and dilute to 50 mL with the same solvent.

Appearance of solution. Solution S is clear (2.2.1) and colourless (2.2.2, Method II).

pH (2.2.3): 5.0 to 6.5 for solution S.

Related substances. Liquid chromatography (2.2.29).

Test solution. Dissolve 50.0 mg of the substance to be examined in the mobile phase and dilute to 100.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (a). Dissolve 5 mg of 1-naphthylacetic acid R in the mobile phase, add 5 mL of the test solution and dilute to 100 mL with the mobile phase.

Reference solution (b). Dissolve 5.0 mg of naphazoline impurity A CRS in the mobile phase and dilute to 100.0 mL with the same solvent. Dilute 5.0 mL of this solution to 100.0 mL with the mobile phase.

Reference solution (c). Dilute 2.0 mL of the test solution to 10.0 mL with the mobile phase. Dilute 1.0 mL of this solution to 100.0 mL with the mobile phase.

Column:

– size: $l = 0.25$ m, $\phi = 4.0$ mm,

– stationary phase: end-capped base-deactivated octylsilyl silica gel for chromatography R (4 μ m) with a pore size of 6 nm.

Mobile phase: dissolve 1.1 g of sodium octanesulfonate R in a mixture of 5 mL of glacial acetic acid R, 300 mL of acetonitrile R and 700 mL of water R.

Flow rate: 1 mL/min.

Detection: spectrophotometer at 280 nm.

Injection: 20 μ L.

Run time: 3 times the retention time of naphazoline.

Relative retention with reference to naphazoline (retention time = about 14 min): impurity A = about 0.76; impurity D = about 1.24; impurity B = about 1.27; impurity C = about 2.8.

System suitability: reference solution (a):

– resolution: minimum 5.0 between the peaks due to naphazoline and impurity B.

Limits:

– impurity A: not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b) (0.5 per cent),

– unspecified impurities: for each impurity, not more than 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.10 per cent),

– total: not more than 5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (1.0 per cent),

Targeting COX

– disregard limit: 0.25 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) (0.05 per cent); disregard the peak due to the nitrate ion.

Chlorides (2.4.4): maximum 330 ppm, determined on solution S.

Loss on drying (2.2.32): maximum 0.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

Sulfated ash (2.4.14): maximum 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Dissolve 0.200 g in 30 mL of 0.1 M perchloric acid R.

Titrate with 0.1 M perchloric acid R potentiometrically (2.2.20).

1 mL of 0.1 M perchloric acid R is equivalent to 0.230 g of $C_{14}H_{13}N_3O_3$.

STORAGE

Protected from light.

IMPURITIES

Specified impurities: A.

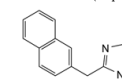
Other detectable impurities (B, C, D) if present at a sufficient level, the tests in the monograph. The acceptance criterion for other impurities is defined by the general monograph *Substances for pharmaceutical use* (2034). It is therefore not necessary to identify these impurities for demonstration of compliance. See also 5.10. *Control of impurities in substances for pharmaceutical use*: B, C, D.



A. R = $\text{CO-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2$: N-(2-aminoethyl)-2-(naphthalen-1-yl)acetamide (naphthylacetylenediamine),

B. R = CO_2H : (naphthalen-1-yl)acetic acid (1-naphthylacetic acid),

C. R = CN: (naphthalen-1-yl)acetonitrile (1-naphthylacetonitrile),

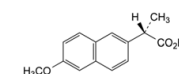


D. 2-(naphthalen-2-ylmethyl)-4,5-dihydro-1H-imidazole (β -naphazoline).

07/2008:0731

NAPROXEN

Naproxenum



$C_{14}H_{13}O_3$
[22204-53-1]

M_r 230.3

DEFINITION

(2S)-2-(6-Methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid.

Content: 99.0 per cent to 101.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS

Appearance: white or almost white, crystalline powder.

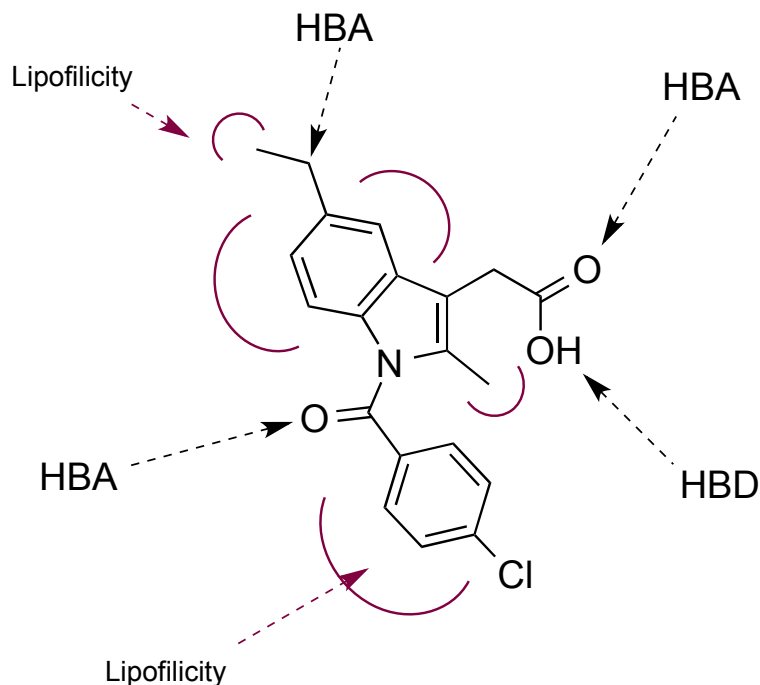
Solubility: practically insoluble in water, soluble in ethanol (96 per cent) and in methanol.

- Nome: Indometacine

[1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]acetic acid

- Classe: Antiinfiammatori non steroidei (FANS)

- Meccanismo: inibizione della ciclossigenasi COX



CHARACTERS

A white or yellow, crystalline powder, practically insoluble in water, sparingly soluble in alcohol.

IDENTIFICATION

First identification: A, C.

Second identification: A, B, D, E.

A. Melting point (2.2.14): 158 °C to 162 °C.

maintaining the temperature of the column at 30 °C.

Inject 0.1 ml of the solutions.

In the chromatogram obtained with the reference solution, measure from the baseline the height *A* of the peak corresponding to methylindrosindoline, appearing just before the principal peak, and the height *B* corresponding to the lowest point in the curve between this peak and the principal peak.

The test is not valid unless in the chromatogram obtained with the reference solution; the difference between *A* and *B* is at least 85 per cent of height *A*, the peak corresponding to methylindrosindoline appearing just before the principal peak has a signal-to-noise ratio of at least 3.

In the chromatogram obtained with the test solution, the area of any peak corresponding to methylindrosindoline is not greater than the difference between the areas of the peaks corresponding to methylindrosindoline in the chromatograms obtained with the reference solution and the test solution.

Heavy metals (2.4.8). 2.0 g complies with limit test C for heavy metals (10 ppm). Prepare the standard using 2 ml of lead standard solution (10 ppm Pb) R.

Water (2.5.12). Not more than 3.0 per cent, determined on 0.10 g by the semi-micro determination of water.

Sulphated ash (2.4.14). Not more than 0.1 per cent, determined on 1.0 g.

ASSAY

Examine by liquid chromatography (2.2.29).

Carry out the assay protected from light and prepare the solutions immediately before use or maintain them at 4 °C.

Test solution. Dissolve 20.0 mg of the substance to be examined in 7 ml of a mixture of equal volumes of acetonitrile R and methanol R and dilute to 20.0 ml with a 0.2 g/l solution of sodium edetate R.

Reference solution (a). Dissolve 30.0 mg of indapamide impurity B CRS in 35 ml of a mixture of equal volumes of acetonitrile R and methanol R and dilute to 100.0 ml with a 0.2 g/l solution of sodium edetate R. To 1.0 ml of the solution, add 35 ml of a mixture of equal volumes of acetonitrile R and methanol R and dilute to 100.0 ml with a 0.2 g/l solution of sodium edetate R.

Reference solution (b). Dilute 1.0 ml of the test solution to 50.0 ml with a mixture of 17.5 volumes of acetonitrile R, 17.5 volumes of methanol R and 65 volumes of a 0.2 g/l solution of sodium edetate R. Dilute 1.0 ml of the solution to 20.0 ml with a mixture of 17.5 volumes of acetonitrile R, 17.5 volumes of methanol R and 65 volumes of a 0.2 g/l solution of sodium edetate R.

Reference solution (c). Dissolve 20.0 mg of indapamide CRS in 7 ml of a mixture of equal volumes of acetonitrile R and methanol R and dilute to 20.0 ml with a 0.2 g/l solution of sodium edetate R.

Reference solution (d). Dissolve 25.0 mg of indapamide CRS and 45.0 mg of methylindrosindoline CRS in 17.5 ml of a mixture of equal volumes of acetonitrile R and methanol R and dilute to 50.0 ml with a 0.2 g/l solution of sodium edetate R.

The chromatographic procedure may be carried out using:

– a stainless steel column 0.20 m long and 4.6 mm in internal diameter packed with octadecylsilica gel for chromatography R (5 µm),

– as mobile phase at a flow rate of 2 ml/min a mixture of 0.1 volumes of glacial acetic acid R, 17.5 volumes of acetonitrile R, 17.5 volumes of methanol R and 65 volumes of a 0.2 g/l solution of sodium edetate R,

– as detector a spectrophotometer set at 254 nm, maintaining the temperature of the column at 40 °C.

When the chromatograms are recorded at the prescribed conditions, the retention time of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (c) is about 11 min.

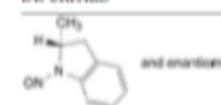
Inject reference solution (c) six times. The test is not valid unless the relative standard deviation of the peak area of indapamide is at most 1.0 per cent. Calculate the per cent m/m of indapamide in the test solution (c).

Calculate the per cent m/m of indapamide in the test solution.

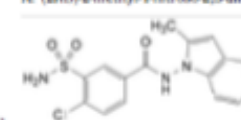
STORAGE

Store protected from light.

IMPURITIES



A. (2R)-2-methyl-1-nitroso-2,3-dihydro-1H-indole.

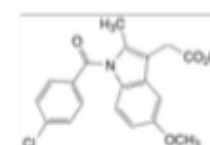


B. 4-chloro-N-(2-methyl-1H-indol-1-yl)-3-sulphamoylbenzamide.

01/2002:0092

INDOMETACIN

Indometacinum



C₁₇H₁₅ClNO₄

M_r 357.8

DEFINITION

Indometacin contains not less than 98.5 per cent and not more than the equivalent of 100.5 per cent of [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindol-3-yl]acetic acid, calculated with reference to the dried substance.

CHARACTERS

A white or yellow, crystalline powder, practically insoluble in water, sparingly soluble in alcohol.

IDENTIFICATION

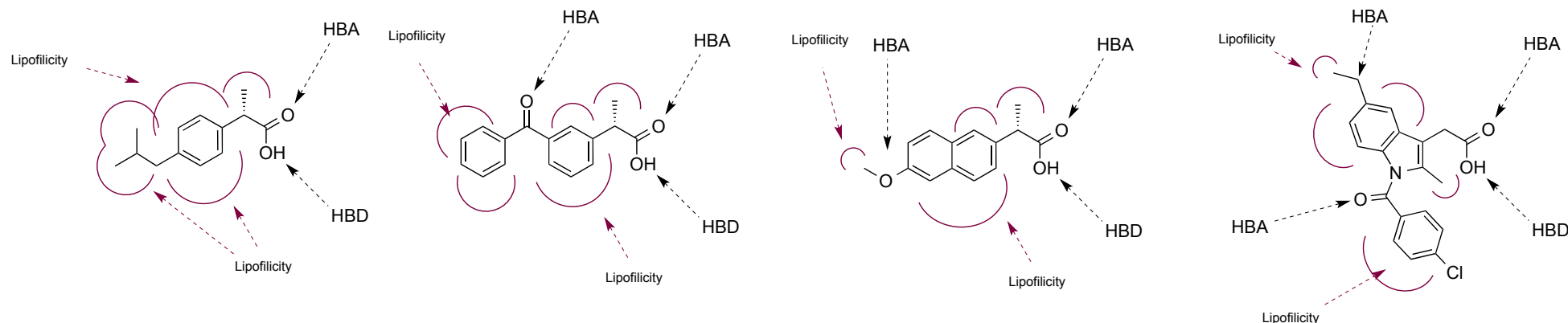
First identification: A, C.

Second identification: A, B, D, E.

A. Melting point (2.2.14): 158 °C to 162 °C.

Let's compare them!!!

(*)

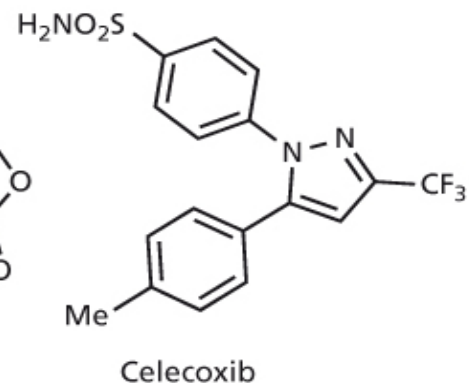
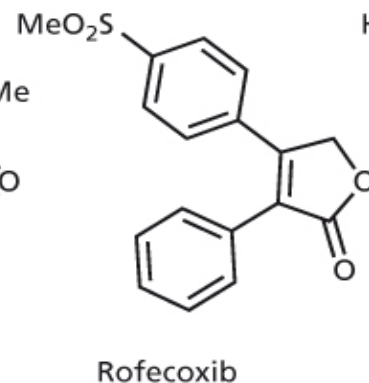
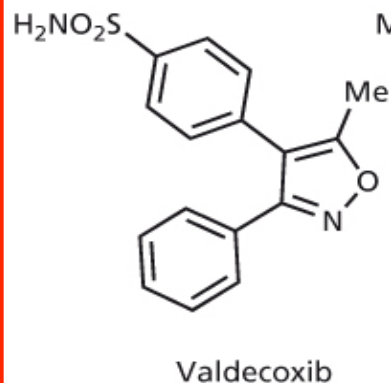
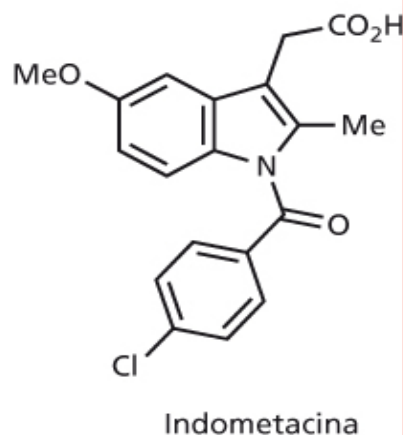


	Ibuprofen	Ketoprofen	Naproxen	Indomethacine
pK _a	4.34(**)	4.25	4.13(**)	4.29(**)
logP	3.97	3.61	3.29	4.25
from www.drugbank.com				

(**) From Marina Shalaeva et al *Measurement of Dissociation Constants (pKa Values) of Organic Compounds by Multiplexed Capillary Electrophoresis Using Aqueous and Cosolvent Buffers* Journal of Pharmaceutical Sciences **2007**, pag 1.

Marco L. Lolli

University of Torino (UniTO)



COXIB

Gli antiinfiammatori che nella struttura portano un gruppo ingombrante sulfonamidico bloccano selettivamente la COX2 (COXIB).

Pdb: 6COX

Inibitori non competitivi

Si legano in una zona dell'enzima diversa da quella a cui si lega il substrato: non competono con il substrato per il sito attivo.

Si verifica per alcuni inibitori **allosterici**, ossia capaci di legarsi ad un sito diverso dal sito attivo. Il legame causa uno shift nella conformazione dell'enzima, che causa una riduzione dell'efficienza catalitica.

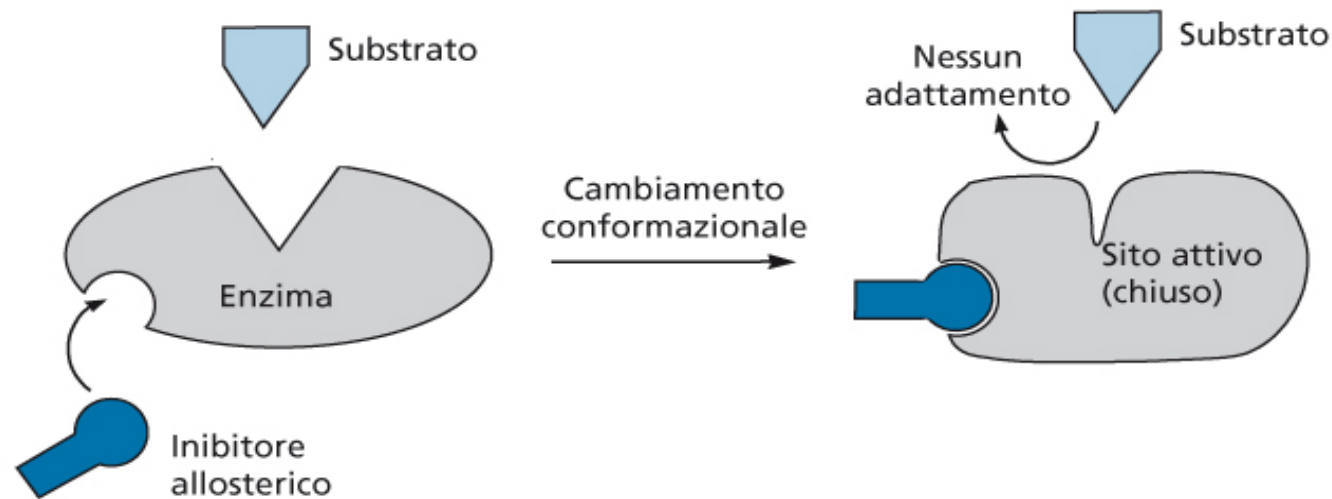
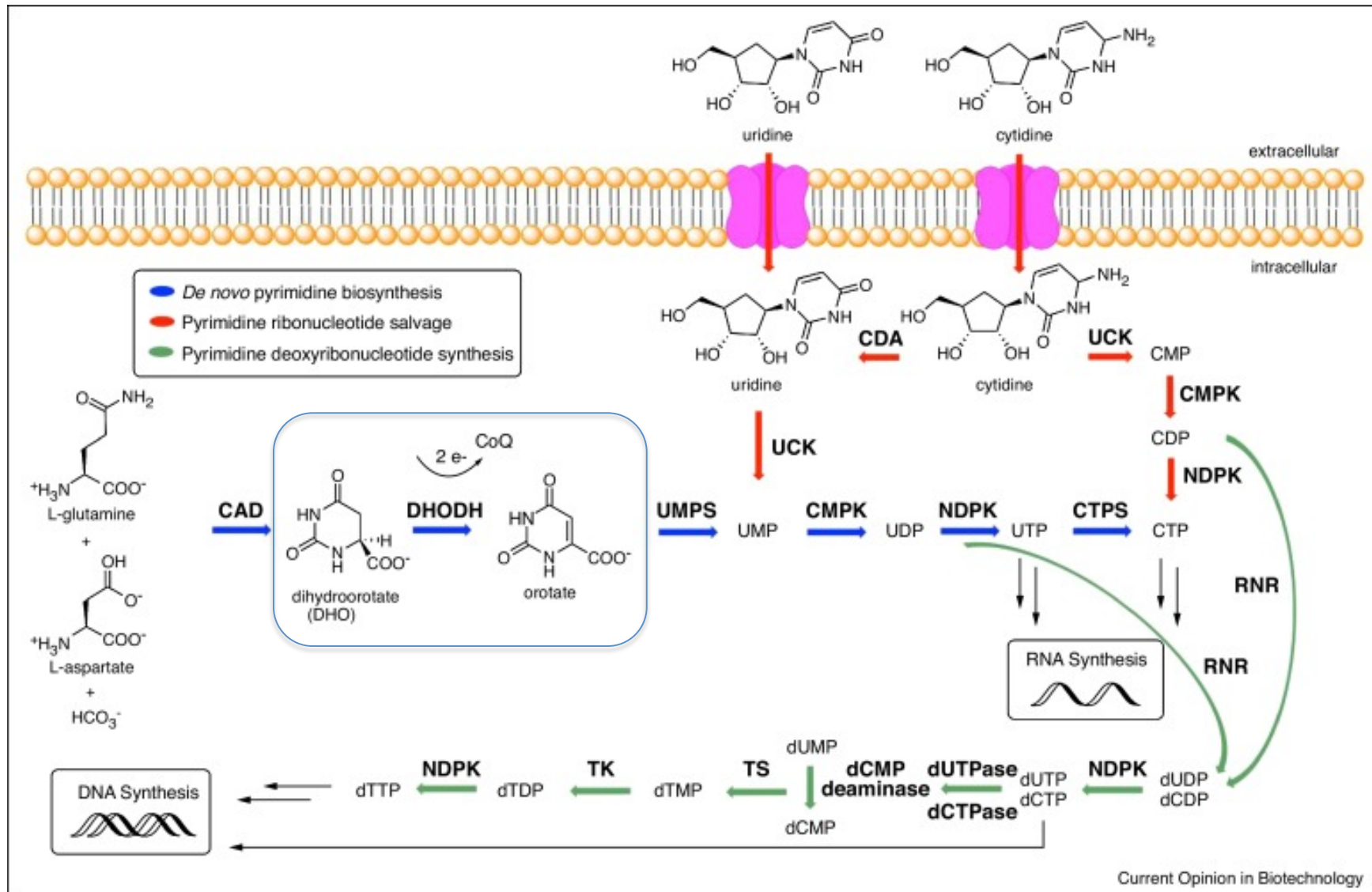


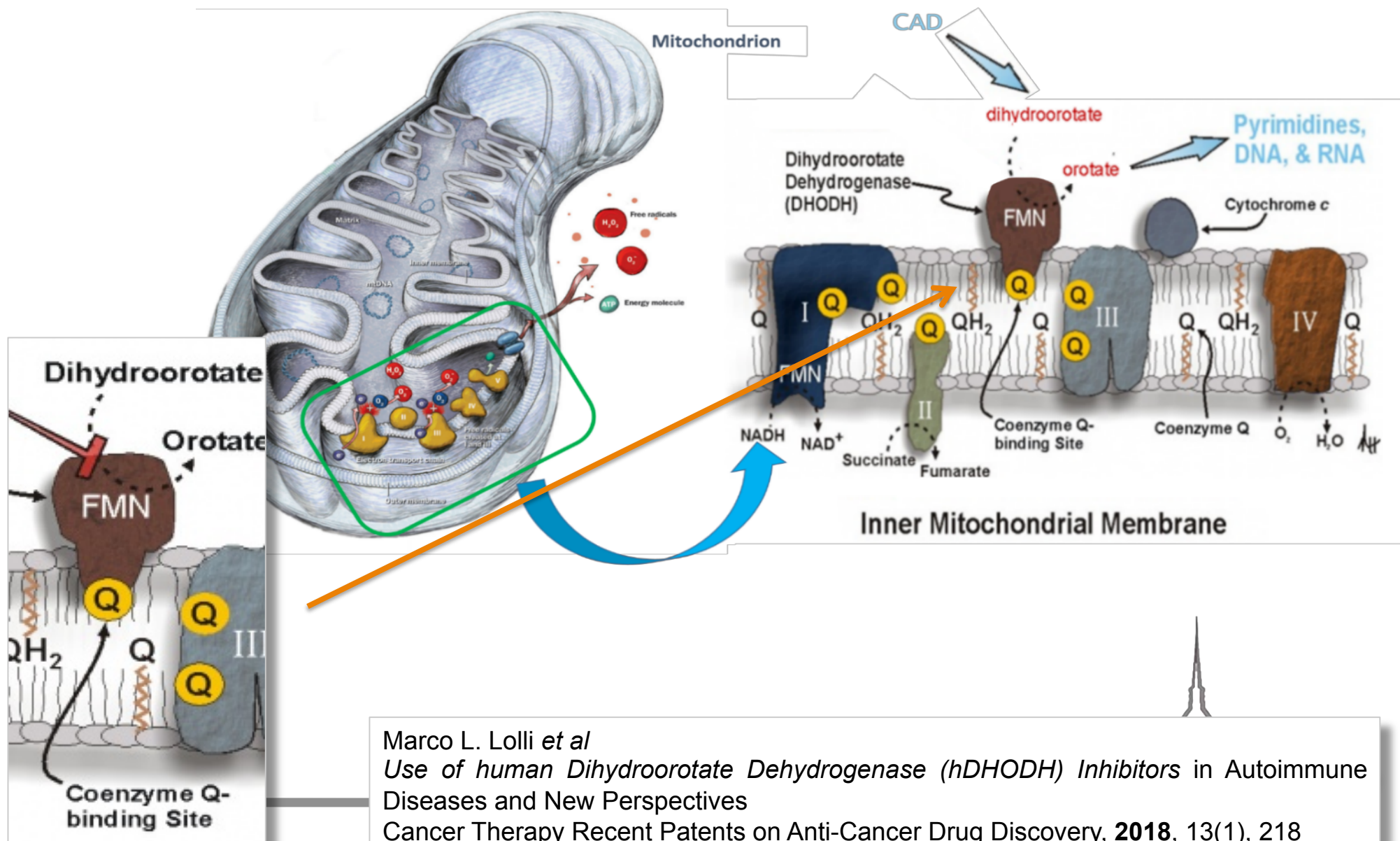
FIGURA 3.14 Inibizione allosterica di un enzima.

Non assomigliano al substrato naturale. Aumentando la concentrazione del substrato naturale non si osserva alcun effetto sull'inibizione.



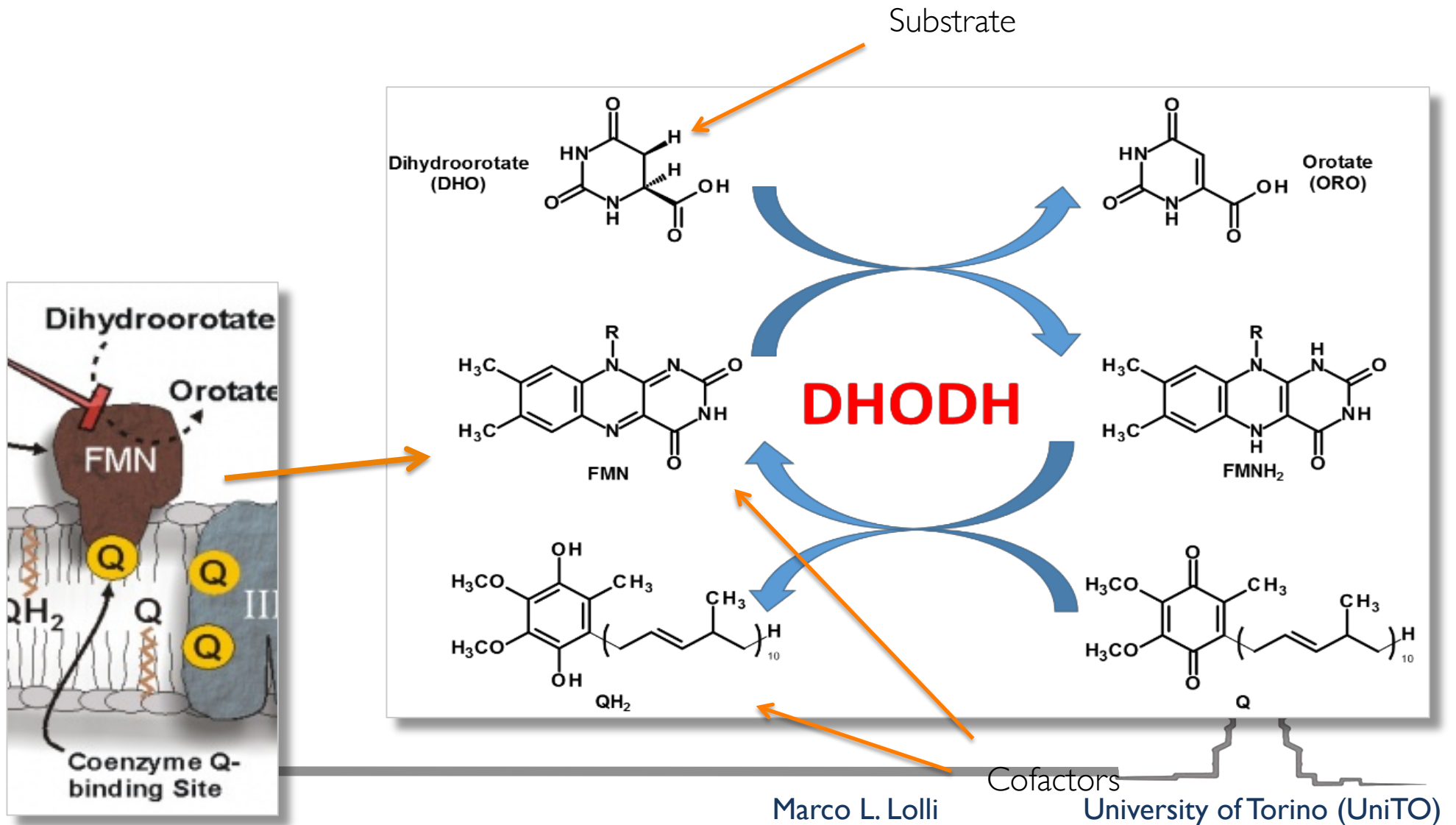
Class 2 human DHODH

Esempio



Marco L. Lolli *et al*
Use of human Dihydroorotate Dehydrogenase (hDHODH) Inhibitors in Autoimmune Diseases and New Perspectives
Cancer Therapy Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, **2018**, 13(1), 218

The *h*DHODH Ping Pong mechanism



The *h*DHODH Ping Pong mechanism

