

ICB - CNR - ICB	
Tit:	F:
Cl:	
<b>N. 0001704</b>	<b>17/06/2011</b>



## Relazione STM Dott. Gennaro Roberto Abbamondi

---

**Periodo: 20 Aprile 2011 – 11 Maggio 2011**

**Istituto ospitante: Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, FRANCIA**

**Gruppo di ricerca: Vectorologie et thérapeutiques anti-cancéreuses (Vettorologia e terapie anti-cancro), Direttore Dott. Lluis M. Mir, [luis.mir@igr.fr](mailto:luis.mir@igr.fr)**

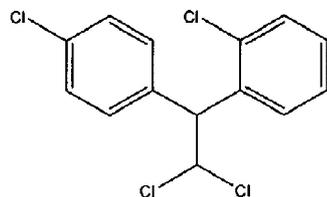
**Supervisor: Dott. Angelo Paci (IGR, Villejuif), [angelo.paci@igr.fr](mailto:angelo.paci@igr.fr)**

**Proponente STM: Dott.ssa Giuseppina Tommonaro (ICB-CNR, Pozzuoli), [giuseppina.tommonaro@icb.cnr.it](mailto:giuseppina.tommonaro@icb.cnr.it)**

**Oggetto della ricerca: "Valutazione dei fattori predittivi della risposta al Mitotano con utilizzo di metodiche estrattive ed analitiche (HPLC-UV)"**

---

Il composto o,p'-DDD (mitotano o Lysodren ®) [fig.1] è un farmaco chemioterapico che viene utilizzato nel trattamento del carcinoma corticosurrenale (CS):



- in adiuvante: quando il paziente, trattato chirurgicamente, è ad alto rischio di ripresa di malattia;
- in palliazione: quando non è possibile rimuovere chirurgicamente la lesione.

fig.1 o,p'-DDD (mitotano o Lysodren ®)

Il carcinoma corticosurrenale è una rara patologia che colpisce le ghiandole surrenali. Origina dalla porzione corticale del surrene, per cui si possono avere carcinomi CS funzionanti (che causano un aumento della produzione ormonale) o non funzionanti (che causano dolore da compressione sugli organi addominali).

Il mitotano è un derivato del DDT (para-diclorodifeniltricloroetano) [fig.2], primo

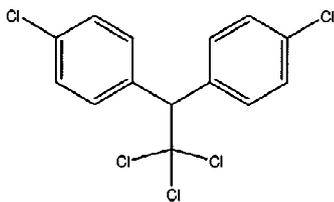


fig.2 DDT (para-diclorodifeniltricloroetano)

insetticida moderno, pesticida clorurato più usato negli anni '40 e '50 e proibito nel 1972 negli Stati Uniti e nel 1978 anche in Italia per possibili effetti cancerogeni.

Come il DDT, l'o,p'-DDD è un composto altamente lipofilo, per cui, quando assunto per via orale, si ripartisce nella parte idrofoba delle varie lipoproteine (chilomicroni, HDL, LDL, VLDL).

Dopo l'assorbimento, il mitotano entra nel circolo enteroepatico e viene metabolizzato. Si ha quindi la formazione, dopo ossidazione e idrossilazione, di due metaboliti: l'o,p'-DDA [fig. 3], presunto attivo, e l'o,p'-DDE [fig.4], ritenuto non attivo.

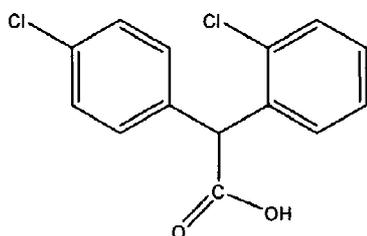


fig.3 o,p'-DDA

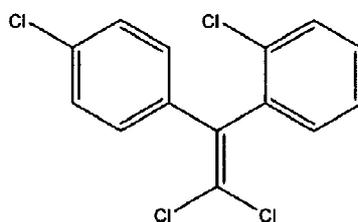


fig.4 o,p'-DDE

La mitotanemia (livello plasmatico di mitotano) è proposta come fattore predittivo della risposta alla terapia. Van Slooten e poi Haak hanno messo in evidenza una relazione tra livelli plasmatici superiori a 14 mg/L ed una maggiore frequenza di risposta positiva al trattamento (1,2). Altri ricercatori ipotizzano, inoltre, che l'analisi dei livelli plasmatici di o,p'-DDA e di o,p'-DDD potrebbe migliorare la previsione di una risposta positiva al trattamento.

La mitotanemia non è solo indice di risposta al trattamento antitumorale; Van Slooten, infatti, nel 1984 ha suggerito una relazione tra neurotossicità e valori plasmatici di mitotano superiori a 20 mg/L (2). Questa relazione è stata confermata dagli studi in corso all'IGR, che pongono quindi come obiettivo terapeutico una concentrazione plasmatica del farmaco di 14-20 mg/L.

L'assorbimento di mitotano avviene nell'intestino, dove viene assorbito per il 40%. È un farmaco lipofilo, e questa caratteristica contribuisce probabilmente alla sua lunga ed eterogenea emivita (18-159 giorni).

In questo lavoro si ipotizza che la risposta terapeutica, ma anche il profilo di tossicità del mitotano, possano essere meglio spiegate dalla distribuzione del farmaco nelle varie frazioni lipoproteiche del plasma piuttosto che dalla semplice mitotanemia plasmatica. Si ritiene infatti che la componente attiva del mitotano venga veicolata dalle LDL e dalle HDL verso il ciclo surrenalico, così come avviene per il colesterolo.

## OBIETTIVO PRINCIPALE

Migliorare il valore predittivo della determinazione plasmatica del mitotano in pazienti con carcinoma cortico-surrenale determinando le concentrazioni plasmatiche del mitotano e dei suoi due metaboliti nelle frazioni lipoproteiche e quindi correlandole alla risposta al trattamento.

## METODOLOGIA

Analisi di campioni di plasma prelevati prima del trattamento o al momento della migliore risposta terapeutica di una serie di 55 pazienti che erano già stati oggetto di analisi della risposta al trattamento antitumorale (Malandrino P et al ERC 2010, rif.3).

### 1) Dosaggio dell'op'-DDA nel plasma

È stato sviluppato un metodo analitico valido secondo i criteri ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) per determinare le concentrazioni plasmatiche di o,p'-DDA in presenza di pp'-DDA utilizzato come standard interno.

Questo metodo potrà essere utilizzato sui pazienti con l'obiettivo di ricercare una correlazione diretta tra concentrazioni plasmatiche di op'-DDA rilevate e risposta al trattamento.

Per liberare la frazione del metabolita ripartita nelle lipoproteine, si procede alla denaturazione delle stesse con urea e HCl 4 M. Viene utilizzato pp'-DDA come standard interno.

I campioni vengono quindi estratti per 2 volte con eptano/alcol isoamilico (3-metil-1-butanol) 98.5/1.5.

La metodica prevede poi l'analisi degli estratti plasmatici in HPLC-UV:

- Colonna: Nucléodur C18 Gravity 250x4.6, 5 µm
- Temperatura : 30°C
- Flusso: 1.0 mL/min
- Volume iniettato: 50 µL
- Fase mobile A: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM / MeOH 24/76 (portato a pH=3 con acido orto-fosforico)
- Fase mobile B: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM / MeOH 1/9 (portato a pH=3 con acido orto-fosforico)
- Lunghezza d'onda: 215 nm

Nelle condizioni di analisi descritte, il tempo di ritenzione dell'op'-DDA è ≈ 9 min, quello del pp'-DDA è ≈ 11,5 min.

### 2) Sviluppo di una metodologia per il dosaggio di op'-DDD, op'-DDE e op'-DDA nelle diverse frazioni lipoproteiche

L'obiettivo è quello di avere un metodo analitico valido secondo i criteri ICH per determinare le concentrazioni plasmatiche di questi tre composti nelle VLDL, LDL e HDL permettendo:

- lo studio degli effetti della distribuzione del mitotano e dei suoi metaboliti nelle diverse frazioni lipoproteiche sulla efficacia/tossicità del mitotano. L'ipotesi è che:

- la componente di o,p'-DDD, op'-DDA e op'-DDE ripartita in VLDL e chilomicroni sia inattiva/protettrice
- la componente ripartita in HDL e LDL sia attiva, con un tropismo per le ghiandole surrenali e per il sistema nervoso centrale.

- la valutazione della distribuzione del mitotano e dei suoi metaboliti in risposta a cambiamenti nella posologia (strategia ad Alte Dosi).

- la valutazione dell'impatto di dislipidemia/ipertigliceridemia sulla distribuzione del mitotano e dei suoi metaboliti.

La metodica prevede una fase preliminare di separazione delle lipoproteine sia nel plasma vergine che nei campioni di plasma dei pazienti tramite ultracentrifuga.

Al plasma viene aggiunta un'uguale aliquota di NaCl 0,9%, e si procede ad una prima ultracentrifuga (2h, 100'000 rpm, 20°C), ottenendo quindi la separazione delle VLDL. Si aggiunge quindi un'aliquota di NaCl 1,8%, ed una seconda ultracentrifuga (3h, 100'000 rpm, 20°C) permette la separazione di LDL ed HDL.

Per l'estrazione dell'o,p'-DDA dalle frazioni lipoproteiche e per l'analisi dei campioni all'HPLC-UV si procede come per l'analisi del plasma prima descritta.

Per l'estrazione dell'o,p'-DDD e dell'o,p'-DDE si procede invece alla denaturazione delle lipoproteine con HCl 1 M.

I campioni vengono quindi estratti per 2 volte con eptano/alcol isoamilico (3-metil-1-butanol) 98.5/1.5.

La metodica prevede poi l'analisi degli estratti plasmatici in HPLC-UV:

- Colonna: Nucléodur C18 Gravity 250x4.6, 5 µm
- Temperatura : 30°C
- Flusso: 1.3 mL/min
- Volume iniettato: 50 µL
- Fase mobile: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM / MeOH 17/83 (portato a pH=3 con acido orto-fosforico)
- Lunghezza d'onda: 230 nm

## RISULTATI

Durante il mio soggiorno scientifico presso l' Institut de Cancérologie Gustave Roussy, mi sono occupato della determinazione della concentrazione di o,p'-DDD (mitotano), o,p'-DDE e o,p'-DDA nel plasma e nelle frazioni lipoproteiche (VLDL, LDL e HDL) di un gruppo di 12 pazienti.

- Determinazione della concentrazione di o,p'-DDA nel plasma:

L'analisi è stata effettuata su 8 dei 12 pazienti selezionati.

- Determinazione della concentrazione di o,p'-DDD e o,p'-DDE nel plasma:

L'analisi è stata effettuata su 9 dei 12 pazienti selezionati.

- Determinazione della concentrazione di o,p'-DDA nelle frazioni lipoproteiche:

L'analisi è stata effettuata su tutti i pazienti. Per il paziente A, l'analisi è stata effettuata su 400 µL di plasma (rispetto ai 500 µL utilizzati per gli altri pazienti) perché la quantità non era sufficiente per tutte le analisi.

- Determinazione della concentrazione di o,p'-DDD e o,p'-DDE nelle lipoproteine:

L'analisi è stata effettuata su tutti i pazienti.

Dalle analisi effettuate si è evidenziata una distribuzione eterogenea del farmaco e dei due metaboliti nelle diverse frazioni lipoproteiche, ma caratterizzata da un maggior accumulo nelle HDL e nelle LDL rispetto alle VLDL.

- Distribuzione dell'o,p'-DDD (mitotano) nelle frazioni lipoproteiche:

L'analisi, effettuata su 9 dei 12 pazienti selezionati, ha evidenziato una maggiore ripartizione del farmaco nelle LDL (47%). E' stata poi rilevata una percentuale simile nelle HDL (43%) e solo una piccola frazione ripartita nelle VLDL (10%). [grafico n.1]

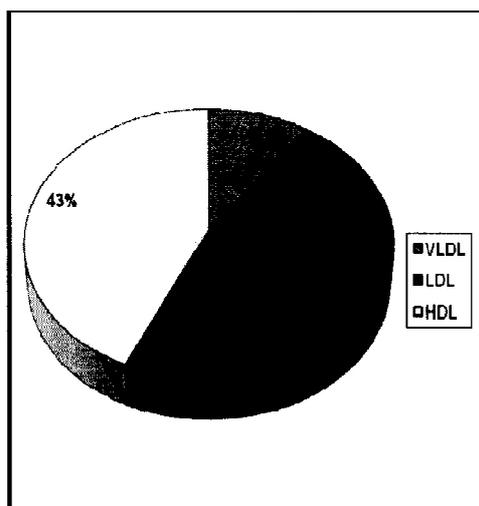


Grafico n.1 Distribuzione del mitotano (o,p'-DDD) nelle lipoproteine

- Distribuzione dell'o,p'-DDE (metabolita ritenuto non attivo) nelle frazioni lipoproteiche:

Nel caso dell'o,p'-DDE è stata rilevata una ripartizione prevalente (65%) nella componente ad alta densità delle lipoproteine (HDL), quindi una minore percentuale nelle LDL (33%), e solo in piccole quantità nelle VLDL (2%). [grafico n. 2]

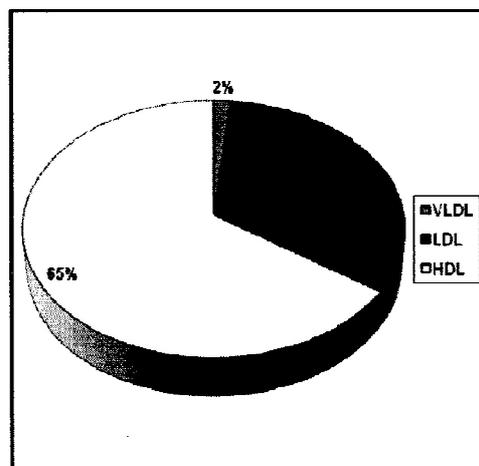


Grafico n.2 Distribuzione dell'o,p'-DDE (metabolita ritenuto non attivo) nelle lipoproteine

- Distribuzione dell'o,p'-DDA (metabolita presunto attivo) nelle frazioni lipoproteiche:

A differenza del mitotano e dell'o,p'-DDE, dei quali abbiamo rilevato una ripartizione prevalente nelle LDL ed HDL, l'o,p'-DDA va a distribuirsi quasi completamente (91%) nella componente ad alta densità delle lipoproteine (HDL), mentre lo ritroviamo solo in piccola quantità in LDL (6%) e VLDL (3%). [grafico n.3]

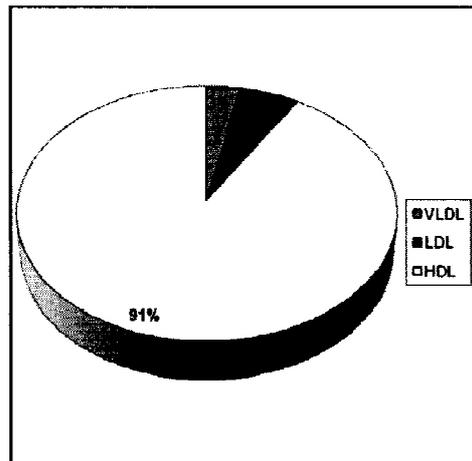


Grafico n.3 Distribuzione dell'o,p'-DDA (metabolita presunto attivo) nelle lipoproteine

#### Riferimenti:

- 1- Van Slooten H, van Seters AP, Smeenk D, Moolenaar AJ. 1982 o,p'-DDD (mitotane) levels in plasma and tissues during chemotherapy and at autopsy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 9:85-88.
- 2- Haak HR, Hermans J, van de Velde CJ, et al. 1994 Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients. *Br J Cancer.* 69:947-951.
- 3- Malandrino P, Al Ghuzlan A, Castaing M, Young J, Caillou B, Travagli J-P, Elias D, de Baere T, Dromain C, Paci A et al. 2010 Prognostic markers of survival after combined mitotane- and platinum-based chemotherapy in metastatic adrenocortical carcinoma (ACC). *Endocr Relat Cancer.*2010; 17:797.

Data: 16 Giugno 2011

FIRMA  
(Dr. Gennaro Roberto Abbamondi)