

# INTERAZIONE FARMACO-RECETTORE

**DEFINIZIONE DI FARMACO (principio attivo): QUALUNQUE MOLECOLA  
DOTATA DI ATTIVITÀ BIOLOGICA**

**L'ATTIVITÀ DI UN FARMACO È DOVUTA AD INTERAZIONE CON  
RECETTORE** (*corpora non agunt nisi fixata*)

**IL FARMACO NON CREA L'EFFETTO MA MODULA UNA FUNZIONE  
PREESISTENTE CONNESSA CON L'ATTIVITÀ DEL  
RECETTORE PER IL FARMACO**

**DEFINIZIONE CLASSICA DEL TERMINE RECETTORE**

Macromolecola deputata al riconoscimento di sostanze chimiche endogene (neurotrasmettitori, ormoni, ecc) e alla generazione di risposte biologiche

**DEFINIZIONE FARMACOLOGICA DEL TERMINE RECETTORE**

Macromolecola a cui il farmaco si lega e di cui modifica la funzione

Sinonimi: bersaglio, sito di legame

**BERSAGLI DI FARMACI**

1 Recettori classici	-	benzodiazepine, oppiacei
2 Enzimi	-	aspirina, digitale
3 Canali ionici	-	anestetici locali, calcio- antagonisti
4 Proteine strutturali	-	colchicina
5 Acidi nucleici	-	cisplatino

**FARMACI SENZA RECETTORE/BERSAGLIO**

bicarbonato  
disinfettanti

## **RELAZIONI FARMACO/RECETTORE**

### **1 UN RECETTORE PUÒ ESSERE LEGATO/MODULATO DA FARMACI DI CLASSI DIVERSE**

Es. Recettore GABA<sub>A</sub> modulato da benzodiazepine (ansiolitici) e da barbiturici (ipnotici-sedativi)

### **2 UN FARMACO PUO' LEGARE PIÙ RECETTORI (SPECIFICITÀ?)**

Es. Amiloride (diuretico risparmiatore di potassio) modula l'attività di canali per il Na (non voltaggio-dipendenti) e del cotrasportatore H/Na

### **3 SPESSO SI CONOSCE IL FARMACO E NON IL SUO RECETTORE**

### **4 ANCOR PIÙ SPESSO SI CONOSCE IL RECETTORE MA NON SI HANNO DISPONIBILI FARMACI**

## INTERAZIONI FARMACO-RECETTORE

**1 MODELLO FISICO:** efficienza e stabilità di interazione è funzione del numero di legami chimici coinvolti e quindi della struttura chimica del farmaco e del recettore

### 2 TIPI DI LEGAMI CHIMICI

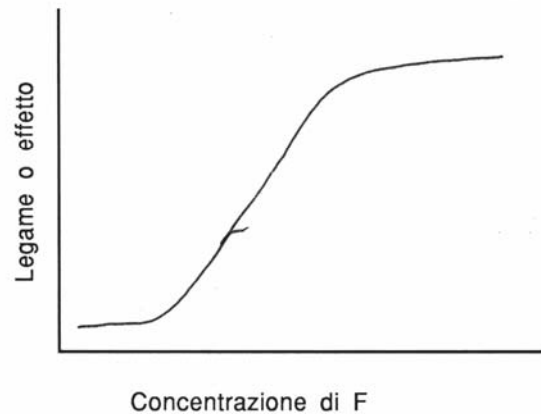
	distanza in nm	Forza necessaria per rompere (Kcal/mol)	
<b>Covalenti</b>	<b>0.15</b>	<b>90</b>	
<b>Ionici</b>	<b>0.25</b>	<b>≈ 1</b>	-tra cariche di segno opposto
<b>Idrogeno</b>	<b>0.30</b>	<b>≈ 1</b>	-spartiti tra atomi (-) (O, N)
<b>Van der Waals</b>	<b>0.10-0.20</b>	<b>≈ 1</b>	- molto numerosi;
	ogni atomo ha raggio al quale la forza è massima:	H = 0.12	
	nm		
			C = 0.20
			N = 0.15
			= = 0.14

### 3 A SECONDA DEL TIPO E DEL NUMERO DI LEGAMI CHIMICI COINVOLTI, L'INTERAZIONE FARMACO-RECETTORE PUÒ ESSERE REVERSIBILE O IRREVERSIBILE

Non sempre covalente vuol dire irreversibile: es fisostigmina

### 4 SOSTITUZIONI CHIMICHE NELLA MOLECOLA DEL FARMACO POSSONO MODIFICARNE LE CARATTERISTICHE DI LEGAME AL RECETTORE O IL TIPO DI RISPOSTA INDOTTA

## Correlazioni dose effetto



Ogni curva ha 4 variabili caratteristiche:

- 1) Potenza : dipende da affinità ( $k$ ) ma anche da variabili farmacodinamiche  
non c'è in genere motivo per cui un farmaco più potente debba essere considerato migliore.
- 2) Efficacia massima : corrisponde al plateau della curva dose/effetto  
in vivo può essere limitata da effetti collaterali  
non confondere efficacia con potenza  
definire il parametro su cui si calcola l'efficacia  
(es: digitale inotropismo o cronotropismo?)  
(es: dolore e morfina/aspirina)
- 3) Pendenza : dipende da legame con recettore e transfer di effetto.  
generalmente pendenza ripida significa effetto tossico a dosi vicine a quelle terapeutiche  
(es: depressione SNC sonno coma)
- 4) Variazioni biologiche e di popolazione

**Estratto da****INTERAZIONI FARMACO-RECETTORE E RISPOSTA QUANTITATIVA AI FARMACI**

Simonetta Nicosia

Istituto di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

**Da: Farmacologia Generale e Molecolare, di Clementi e Fumagalli, UTET**

Il concetto che le cellule posseggano siti specifici in grado di riconoscere determinate sostanze e di mediarne l'effetto risale agli inizi di questo secolo, grazie ai lavori di Erlich (1854-1915) e di Langley (1852-1926). Il primo, lavorando sui chemioterapici e sull'interazione fra anticorpi e tossine batteriche, affermò che una sostanza, per esercitare la sua azione, deve venire in contatto fisico con il suo bersaglio ("Corpora non agunt nisi fixata"); il secondo, in modo del tutto indipendente, sulla base dei suoi studi sull'azione di nicotina e curari a livello dei gangli del sistema nervoso vegetativo, arrivò a ipotizzare l'esistenza di una "sostanza ricettiva", ovvero di ciò che la farmacologia moderna ha chiamato "recettore". Tuttavia, fino ai primi anni '70, quando furono disegnati ed eseguiti i primi studi di *binding* i recettori erano soltanto un'entità un po' astratta, che nessuno sapeva esattamente come identificare.

**IL RECETTORE: GENERALITÀ E PROPRIETÀ**

*I recettori per i farmaci sono molecole rilevanti per le funzioni cellulari*

Con il termine "farmaco" (dal greco φάρμακον, principio attivo) si intende qualunque molecola dotata di attività biologica: quindi, non soltanto sostanze dotate di proprietà terapeutiche (farmaci in senso stretto), ma anche sostanze endogene, quali ormoni, neuroormoni, neurotrasmettitori e autacoidi, e sostanze, per lo più esogene, di interesse prevalentemente tossicologico.

Per generare il loro effetto biologico, la maggior parte dei farmaci (non tutti: vedi più oltre) deve interagire con macromolecole specifiche, per lo più di natura proteica, presenti sulla superficie o all'interno della cellula, definite con il termine generico di "recettori" e dotate di propria funzione. Un farmaco quindi non crea un effetto, ma modula una funzione preesistente alterando lo stato funzionale del suo recettore.

Il termine "recettore", classicamente riservato a quelle macromolecole cellulari deputate al riconoscimento di sostanze chimiche endogene (neurotrasmettitori, ormoni, fattori di crescita, autacoidi, ecc;) e alla generazione di risposte biologiche, è in farmacologia utilizzato in modo più esteso ad indicare la macromolecola a cui il farmaco si lega e ne modifica la funzione. Per esempio, il recettore della D-tubocurarina (un farmaco che provoca paralisi muscolare) è allo stesso tempo il recettore per il neurotrasmettitore acetilcolina; invece il recettore per la digossina (un glicoside cardioattivo usato nello scompenso cardiaco) è un enzima che trasporta ioni attraverso la membrana cellulare, la pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi.

Possono essere bersagli (recettori) dei farmaci : *a*) recettori "classici" di sostanze endogene; *b*) enzimi; *c*) canali ionici; *d*) acidi nucleici; *e*) proteine strutturali. Fra i farmaci il cui sito d'azione è un enzima, il più utilizzato è probabilmente l'aspirina, che deve la sua azione anti-infiammatoria ed analgesica alla sua capacità di acetilare, e quindi inibire, la cicloossigenasi, enzima responsabile della formazione delle prostaglandine (vedi capitolo 27). Tra i farmaci i cui target sono canali ionici ricordiamo i calcio-antagonisti (usati per lo più nella terapia cardiovascolare) e gli anestetici locali. Molti antibiotici e antimetaboliti hanno come 'recettore' uno degli acidi nucleici, RNA o DNA, mentre la colchicina, farmaco usato nella terapia della gotta, è capace di interferire con il processo di polimerizzazione della tubulina.

È da tenere a mente che farmaci anche di categoria diversa possono interagire con recettori situati su una medesima macromolecola o complesso macromolecolare; è questo il caso del neurotrasmettitore GABA, delle benzodiazepine (ansiolitici) e dei barbiturici (ipnotico-sedativi). Tutte e tre i farmaci (endogeno il GABA, esogeni gli altri) interagiscono con lo stesso complesso eteromero, chiamato recettore  $\text{GABA}_A$  e presente in numerose cellule del Sistema Nervoso Centrale (vedi capitolo 21): tuttavia ciascuno di essi riconosce e si lega ad un suo "sito di legame" distinto presente nel complesso macromolecolare che forma il recettore  $\text{GABA}_A$ .

Non sempre sono conosciute l'identità o la funzione del recettore di un farmaco. In alcuni casi, l'identificazione di recettori per sostanze esogene ha preceduto la scoperta del ligando naturale "endogeno". È questo il caso dei recettori per gli oppioidi; il riconoscimento dell'esistenza di recettori specifici per la morfina, un agente esogeno, avvenne soltanto all'inizio degli anni '70 e stimolò la ricerca di sostanze endogene che si legassero normalmente a tale recettore. Da questa ricerca è poi scaturita l'importante scoperta di encefaline ed endorfine (vedi capitolo 23).

È importante ricordare che non tutti i farmaci necessitano di un recettore per esplicare la loro azione: è chiaro, ad esempio, che le proprietà disinfettanti dell'acqua ossigenata sono dovute alle sue generali

caratteristiche ossidanti; analogamente, l'uso del bicarbonato contro l'acidità gastrica non riflette l'esistenza di un recettore, ma semplicemente le sue caratteristiche acido-base; ancora, esistono farmaci che devono le loro azioni a proprietà osmotiche (certi lassativi) o surfattanti (disinfettanti). In generale, si può affermare che i farmaci che non esplicano il loro effetto attraverso un recettore agiscono a concentrazioni nettamente più alte di quelli la cui azione è invece mediata da un recettore specifico. Inoltre, molti farmaci possono anche legarsi, oltre che a recettori specifici, anche a componenti tissutali e a proteine plasmatiche senza indurre effetti biologici; in questo caso i siti di legame possono avere funzione di deposito o trasporto del farmaco (vedi capitolo 35).

*Per molti farmaci, l'attività biologica è dovuta alla formazione di un complesso con i loro recettori*

Nel resto di questo capitolo, si prenderà in considerazione l'interazione di agenti con i loro recettori secondo la modalità che presuppone un'interazione reversibile e stechiometrica di una molecola di farmaco con una molecola di recettore. Questa è la modalità più diffusa per le sostanze endogene (ormoni, neurotrasmettitori, etc.)

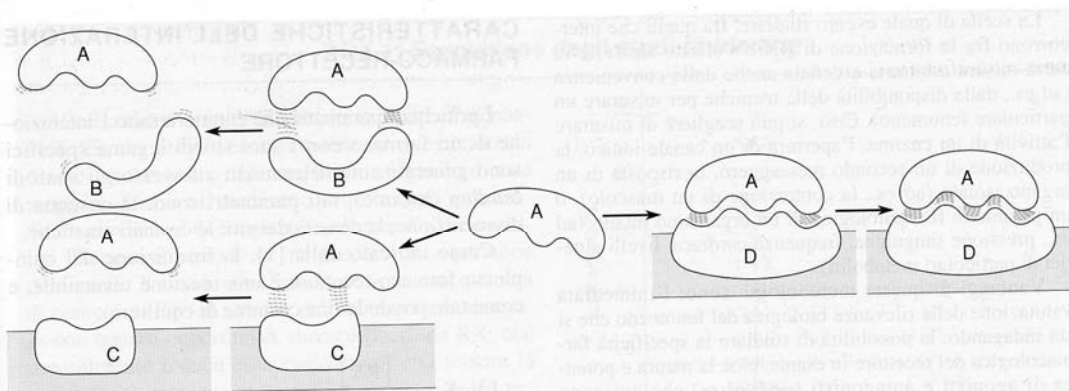
*L'interazione tra farmaco e recettore è generalmente mediata da legami chimici deboli*

I legami chimici che si possono formare in un mezzo acquoso tra sostanze chimiche che giungono in contatto tra loro possono essere ad alta e bassa energia. Gli ultimi sono i più comuni e si suddividono in: 1) **legami ionici** che si formano fra atomi con carica opposta; 2) **ponti idrogeno** in cui un atomo di idrogeno legato ad un atomo elettronegativo, es. ossigeno o azoto, si lega ad un altro atomo elettronegativo; 3) **attrazioni di van der Waals** che si generano fra due atomi qualsiasi, che si trovino a distanza molto ravvicinata, ad opera delle loro cariche elettriche fluttuanti; 4) **interazioni idrofobiche** causate dalle molecole di acqua che, per minimizzare l'effetto dei gruppi idrofobici sui legami di idrogeno dell'acqua stessa, costringono tali gruppi idrofobici a raggrupparsi fra di loro. Tutte queste forze di legame hanno in comune la caratteristica di richiedere un'energia 20-200 volte inferiore rispetto a quella necessaria per rompere i legami covalenti (legame ad alta energia) che tengono insieme gli atomi di una stessa molecola, e di essere appena più forti dell'energia media di una collisione termica a temperature fisiologiche.

Affinché il contatto tra un farmaco ed il suo recettore persista per un tempo significativo e sufficiente a generare l'effetto biologico del farmaco, occorre che il numero di legami a bassa energia sia relativamente elevato. Inoltre, poiché i legami chimici deboli si formano solo se gli atomi coinvolti giungono in stretta vicinanza tra loro, è necessario che la superficie della molecola di farmaco e quella della molecola di recettore siano chimicamente complementari l'una all'altra. Questa **complementarità farmaco-recettore** è alla base della specificità dell'interazione farmacologica.

Interazioni farmaco-recettore e risposta quantitativa ai farmaci

45



**Fig. 4.1.** La formazione di legami deboli è responsabile del processo di riconoscimento fra farmaco e recettore. La molecola A, a causa del moto termico, incontra casualmente altre molecole (in questo esempio B è una molecola solubile, C e D sono proteine intrinseche di membrana). Mentre con B e C si possono formare soltanto pochi legami deboli, che si scindono rapidamente, le superfici di A e D sono complementari fra loro nelle zone di contatto e si formano numerosi legami; in questo caso l'interazione è più duratura.

È importante tuttavia ricordare che il farmaco può riconoscere superfici molecolari complementari presenti su macromolecole diverse dal suo "recettore" principale. Per esempio, i farmaci beta-2 agonisti

(broncodilatatori) sono in grado di attivare in modo specifico i recettori adrenergici di tipo beta-2 presenti nella muscolatura bronchiale, ma a concentrazioni più alte sono anche in grado di produrre un'importante attivazione dei recettori adrenergici di tipo beta-1 presenti nel tessuto cardiaco. Il modello che meglio spiega questo fenomeno prevede che i farmaci in questione abbiano un sito di legame altamente complementare (e quindi si leghino saldamente), sul recettore beta-2. Sul recettore beta-1 tale sito è solo parzialmente complementare e il legame è più labile: l'attivazione del recettore può però diventare significativa se si aumenta la probabilità d'interazione tra farmaco e recettore, cioè se si aumenta la concentrazione del farmaco, allungando quindi il tempo di occupazione del sito di legame. Quindi la "specificità" di un farmaco è anche funzione della sua concentrazione.

### *Le interazioni farmaco-recettore possono essere reversibili o irreversibili*

Il fatto che farmaco e recettore siano tenuti uniti tra loro da forze chimiche deboli è anche responsabile del fatto che l'interazione è, nella maggior parte dei casi, limitata nel tempo: una molecola di farmaco si stacca dal suo recettore, diffonde ed eventualmente si lega ad un'altra molecola recettoriale, mentre il sito sulla prima macromolecola rimane vacante finché è occupato da un'altra molecola di farmaco. L'interazione farmaco-recettore è in questo caso *reversibile*.

Quando il numero di legami chimici deboli è estremamente elevato, come nel caso dell'interazione tra una tossina paralizzante di cobra, detta alfa-bungarotossina, e il recettore nicotinico per l'acetilcolina, l'energia presente nel sistema biologico può essere insufficiente a causare il distacco del farmaco dal suo recettore: in questo caso l'interazione è *irreversibile*. Spesso le interazioni irreversibili sono causate dalla formazione di legami covalenti tra farmaco e recettore, come nel caso delle aloalchilamine e i recettori alfa-adrenergici. È importante però ricordare che i legami covalenti non sono tra loro tutti uguali, in termini di durata temporale: per esempio, farmaci anticolinesterasici "reversibili", come la fisostigmina e la neostigmina, formano un legame carbamileico con l'enzima acetilcolinesterasi che rimane così inattivo per un periodo di 15-30 minuti finché il legame si scinde spontaneamente. Altri farmaci anticolinesterasici, come i derivati organofosforici, sono invece in grado di fosforilare l'enzima, inibendone l'attività in modo irreversibile o almeno per diverse ore.

## CARATTERISTICHE DELL'INTERAZIONE FARMACO-RECETTORE

I principali parametri che caratterizzano l'interazione di un farmaco con i suoi siti di legame specifici sono generalmente determinati attraverso gli studi di *binding* (legame); tali parametri sono: - la "costante di dissociazione"; - la densità dei siti; - le costanti cinetiche.

Come indicato dall'Eq. 3.1, la formazione del complesso farmaco-recettore è una reazione reversibile, e come tale possiede una costante di equilibrio:

$$(3.3) \quad K_a = \frac{[RX]}{[R][X]}$$

dove [RX] è la concentrazione del complesso farmaco-recettore all'equilibrio, e [R] e [X] rappresentano rispettivamente le concentrazioni di recettore e di farmaco liberi all'equilibrio.

$K_a$  viene definita "costante di associazione o di affinità", indica quanto la reazione è spostata verso la formazione del complesso ed è pertanto correlata alla forza del legame chimico fra il farmaco ed il recettore (quindi fondamentalmente al numero di legami chimici deboli che si instaurano fra essi).

Per tradizione, però, negli studi di *binding* si usa più frequentemente la costante di equilibrio della reazione inversa, cioè della reazione di dissociazione del complesso  $R + X \rightleftharpoons RX$ :

$$(3.4) \quad K_d = \frac{[R][X]}{[RX]} = \frac{1}{K_a}$$

denominata "costante di dissociazione" e correlata inversamente all'affinità del ligando per il recettore.

Per densità dei siti, generalmente indicata con  $B_{max}$  o  $R_T$ , si intende il numero massimo di molecole di ligando che si possono legare (coincidente con il numero di siti di legame presenti) per cellula. Il numero di siti è coincidente con il numero di recettori, se ogni recettore viene legato da un'unica molecola di ligando, cioè se ogni molecola di recettore possiede un unico sito di legame. La densità dei siti può anche venire espressa per unità di peso in proteine cellulari, se lo studio viene condotto su una frazione subcellulare invece che su cellule intatte, o per unità di peso di tessuto, oppure semplicemente in moli/l.

Le costanti cinetiche sono le costanti di velocità della reazione diretta (formazione del complesso),  $k_{on}$ , ed inversa (scissione del complesso),  $k_{off}$ , per cui vale la relazione:

$$(3.5) \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = K_d$$

Le costanti cinetiche regolano i tempi dell'interazione farmaco-recettore; infatti,  $k_{\text{on}}$  è un indice del tempo necessario per raggiungere l'equilibrio nella reazione di legame del farmaco al recettore, mentre  $k_{\text{off}}$  è correlata alla permanenza del complesso stesso.  $k_{\text{on}}$  dipende in parte dalla facilità di accesso del farmaco al suo sito di legame che può trovarsi, per esempio, in una tasca interna della macromolecola recettoriale; sostituzioni chimiche che conferiscano una particolare flessibilità alla molecola di farmaco possono quindi comportare importanti variazioni di  $k_{\text{on}}$ .

$k_{\text{off}}$  dipende in gran parte dal numero di legami chimici deboli che si stabiliscono fra farmaco e recettore; maggiore è quindi la complementarità chimico-fisica tra farmaco e suo recettore, più lenta è la loro separazione. La dissociazione del complesso farmaco-recettore, in assenza di formazione di nuove molecole di complesso RX, porta alla cessazione del segnale all'origine della risposta biologica al farmaco.

È importante ricordare che le costanti elencate finora si riferiscono a situazioni di equilibrio, in cui il numero di molecole di complesso farmaco-recettore che si forma nell'unità di tempo è uguale al numero di molecole di complesso che si dissocia.

La costante di dissociazione  $K_d$  è comunemente utilizzata per definire l'affinità di un farmaco per il suo recettore ed ha le dimensioni di una concentrazione.

$K_d$ , reciproco della costante di affinità  $K_a$ , è numericamente identica alla concentrazione del farmaco [X] necessaria per saturare il 50% di tutti i siti presenti, cioè  $K_d$  è pari alla concentrazione di farmaco libero [X] quando le quantità di recettore legato [RX] e non legato [R] sono, all'equilibrio, uguali.

#### *I recettori possono essere eterogenei*

Numerosi esempi di sottotipi recettoriali verranno discussi nella Sezione 5; qui ricordiamo, a titolo di esempio, i recettori per l'adrenalina  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , quelli per la dopamina  $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_3$ , i muscarinici per l'acetilcolina  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ , i recettori per l'istamina  $H_1$  e  $H_2$ , la serotonina 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, e gli oppioidi  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\sigma$ ,  $\epsilon$ ,  $\kappa$ , soltanto per citare quelli studiati da più tempo.

#### *Farmaci diversi possono competere per il legame ad uno stesso recettore*

Il concetto di affinità è estremamente utile soprattutto quando si voglia paragonare la "capacità" di due farmaci diversi nel legare lo stesso recettore. Un farmaco A con  $K_d$  pari a 1 mM ( $10^{-3}$  M), ha un'affinità inferiore per il recettore rispetto ad un farmaco B con  $K_d$  per lo stesso recettore di 1 nM ( $10^{-9}$  M): i valori di  $K_d$  indicano infatti che per legare il 50% dei recettori con il farmaco A occorre una concentrazione 1 milione di volte superiore rispetto al farmaco B. In termini molecolari, questo significa che la probabilità che un complesso farmaco-recettore si formi in sostituzione di uno che si scinde sono, a parità di concentrazione, molto più elevate per il farmaco B. Poiché le differenze di  $K_d$  possono essere dovute a  $k_{\text{on}}$  e/o  $k_{\text{off}}$  differenti (vedi Eq. 3.5), esse sono dovute, in ultima analisi, a differenze nella struttura chimico-fisica dei farmaci.

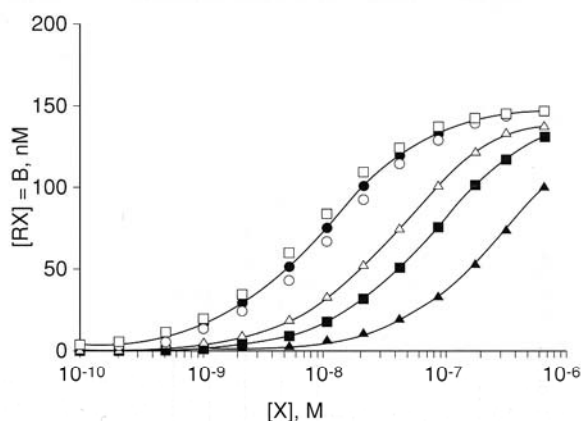
Quando due molecole di farmaci diversi si presentano ad un'unica molecola recettoriale, solo uno dei due farmaci può legarsi. Se il legame è reversibile, una gara si instaurerà tra i due farmaci per occupare il recettore. Nel tempo, il farmaco che ha occupato più a lungo il recettore sarà quello che si lega più rapidamente e/o si distacca più lentamente: quindi il farmaco con maggiore affinità. Se a contrastare il legame del farmaco affine mettiamo una grossa quantità del farmaco poco affine, otterremo il risultato di aumentare le probabilità dell'incontro tra il recettore e il farmaco poco affine e, di conseguenza, di ridurre la proporzione di tempo in cui il farmaco più affine è legato. Ovviamente possiamo riportare questo valore a quello misurato all'inizio, aumentando anche il numero di molecole di farmaco più affine. Questo scenario viene detto *competizione*.

Perché tra due farmaci esista competizione, occorre che il loro legame con il recettore sia reversibile; nel caso contrario, una volta occupato da un farmaco il recettore non è più disponibile per una nuova gara tra due ligandi. **Il legame non-reversibile è quindi non-competitivo.**

La competizione determina uno spostamento delle curve di legame e quindi una riduzione apparente dell'affinità. Questo è mostrato nella fig. che segue, che rappresenta la curva di legame di un ligando radioattivo in presenza ed in assenza di ligandi non marcati che si legano allo stesso recettore o ad altri recettori. Ad esempio, una situazione simile a quella illustrata può verificarsi eseguendo un esperimento di



*binding* con  $^3\text{H-SCH23390}$ , ligando dei recettori dopaminergici  $\text{D}_1$  e  $\text{D}_5$ , da solo (pallino pieno) o in presenza di dosi crescenti di dopamina (triangoli vuoti e quadratini pieni). Per ciascuna curva si può ottenere un valore apparente di  $K_d$  (concentrazione che satura il 50% dei siti presenti) diverso, che aumenta all'aumentare della concentrazione di dopamina, come è da aspettarsi in base al concetto di competizione descritto nel paragrafo precedente.



**Fig. 4.5.** Isoterme di legame di un farmaco radioattivo (es.:  $^3\text{H-SCH23390}$ , ligando dei recettori dopaminergici  $\text{D}_1$  e  $\text{D}_5$ ) da solo (pallino pieno) o in presenza di dosi crescenti di un altro farmaco che si leghi agli stessi recettori (es.: dopamina a due diverse dosi, triangoli pieni e vuoti). Per ciascuna curva si può ottenere un valore apparente di  $K_d$  (concentrazione che satura il 50% dei siti presenti) diverso, che aumenta all'aumentare della concentrazione del farmaco competitivo. Analogo spostamento della curva di legame verso destra si ottiene anche in presenza di farmaci diversi (es.: butaclamol, quadrati pieni, un antagonista che si lega a molte sottoclassi del recettore della dopamina). Al contrario, spiperone (pallini vuoti), un ligando del recettore dopaminergico  $\text{D}_2$ , e propranololo (quadrati vuoti) un ligando dei recettori  $\beta$ , non modificano significativamente la curva di legame di  $^3\text{H-SCH23390}$ .

Le curve di competizione sono anche utili per definire farmacologicamente il recettore che viene legato dal farmaco in esame. Nell'esempio riportato in fig., si può notare come si ottenga uno spostamento della curva di legame verso destra anche in presenza di butaclamol (triangoli pieni), un antagonista che si lega a molte sottoclassi del recettore della dopamina. Al contrario, spiperone, un ligando del recettore dopaminergico  $\text{D}_2$ , e propranololo, un ligando dei recettori beta, non modificano significativamente la curva di legame di  $\text{SCH23390}$ . Pertanto, le curve presentate in fig. 3.5 suggeriscono che il recettore presente nel sistema è un recettore dopaminergico di sottotipo diverso da  $\text{D}_2$ .

#### ASPETTI QUANTITATIVI DELLE RISPOSTE AI FARMACI: ANALISI DELLE CURVE DOSE-RISPOSTA

La relazione fra concentrazione (espressa in molarità o in peso del farmaco per volume di soluzione, es. mM o mg/l) di un farmaco e il grado di risposta ottenuto prende il nome di curva concentrazione-risposta. Quando la sperimentazione venga condotta *in vivo*, l'effetto viene messo in relazione con la dose di farmaco somministrata, espressa in peso del farmaco per peso corporeo (es. mg/Kg), e la relativa curva viene chiamata curva dose-risposta. In realtà, la denominazione "curva dose-risposta" viene talvolta usata, seppure in modo non strettamente corretto, anche nel caso di esperimenti *in vitro*, per amor di brevità.

Come già accennato, l'analisi delle curve concentrazione-risposta o dose-risposta in base alla teoria dell'interazione farmaco-recettore è uno dei modi per ottenere informazioni su tale interazione iniziale. Inoltre, l'analisi delle suddette curve evidenzia alcuni fenomeni fondamentali della farmacologia, quali l'esistenza di farmaci dotati di attività qualitativamente uguali ma quantitativamente diverse (in potenza o efficacia, vedi dopo), o l'esistenza di agonisti, antagonisti e agonisti parziali (vedi più sotto per le definizioni).

Le risposte farmacologiche possono essere classificate come:

a) risposte graduali: sono risposte misurabili in continuo, ovvero la risposta può assumere qualsiasi valore, aumentando progressivamente all'aumentare della dose e tendendo asintoticamente ad un valore massimo. Esempi di risposte graduali sono la forza di contrazione di un muscolo, l'attivazione di un enzima, l'aumento di pressione sanguigna.

b) risposte non misurabili in continuo, ma che si possono classificare e ordinare con un voto (*score*) od uno stadio (*stage*); la formazione di ulcere, o alcuni effetti comportamentali, o i risultati di molti studi clinici (es., la valutazione del grado di dolore) appartengono a questa classe. In questo caso, la distanza fra i diversi stadi è priva di significato: un paziente con vasculopatia periferica al IV stadio secondo Fontaine non ha il doppio di dolore di un paziente al II stadio.

c) risposte tutto-o-nulla (quantali): rappresentano un caso estremo del precedente, dove gli stadi possibili sono soltanto due; esempi di questi tipi di risposte sono la morte, la remissione completa di una malattia, il raggiungimento di un livello predefinito di risposta altrimenti continua.

Questa suddivisione non implica differenze nei meccanismi di accoppiamento fra il recettore e la risposta, ma in generale dipende da quale parametro si sceglie di valutare come risposta farmacologica, o dalla sensibilità degli strumenti di misura.

Soprattutto nel caso di risposte tutto-o-nulla, poiché esistono soltanto due stadi possibili di risposta, generalmente si esprime la relazione fra dose (o concentrazione) e risposta indicando il numero di individui in una popolazione (frequenza) per cui si verifica quel determinato effetto. In questo caso, la curva dose-risposta può prendere la forma di un istogramma delle frequenze, oppure di una curva cumulativa.

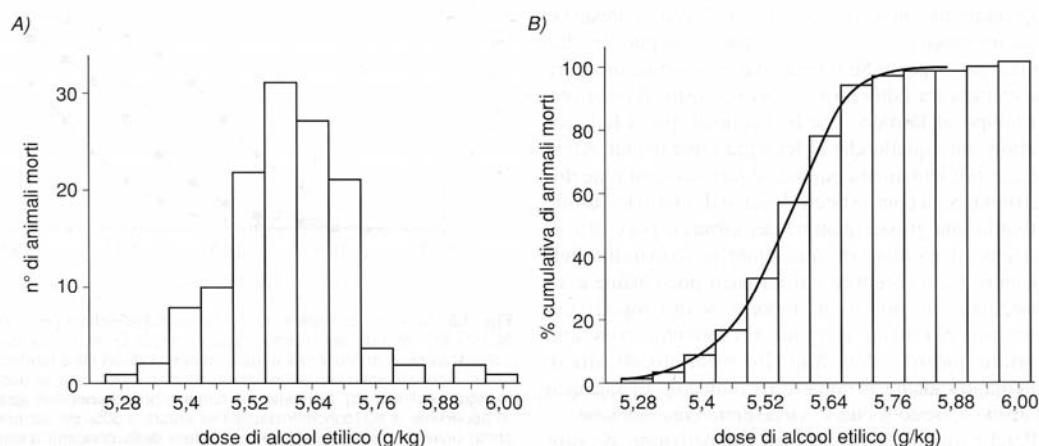


Fig. 4.6. Curve dose-risposta in una popolazione: effetto letale di dosi crescenti di alcool etilico. Dosi crescenti di alcool etilico venivano somministrate a ciascun animale, e si registrava il numero di animali che morivano a ciascuna dose (A): istogramma delle frequenze; solo pochi animali sopravvivevano fino a dosi di 5,7 g/kg. B) Curva cumulativa ottenuta dalla precedente calcolando per ciascuna dose la percentuale di animali che morivano rispetto al numero totale, e sommando tale percentuale alla percentuale relativa a tutte le dosi inferiori a quella considerata. La curva cumulativa mostra quindi la percentuale di soggetti in cui compare, al variare della dose, l'effetto misurato.

### *Definizione dei termini potenza, efficacia, EC<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub> e Indice Terapeutico di un farmaco*

Quando l'entità degli effetti di un farmaco è messa in relazione grafica con la dose (o la concentrazione), si ottengono curve la cui forma e posizione sono funzione di molte variabili (vedi più oltre). Tuttavia alcuni termini sono comuni e devono essere perciò chiariti.

La posizione di una curva sull'asse delle ascisse rispecchia la *potenza* di un farmaco: più una curva concentrazione- (o dose-) risposta è situata a sinistra sull'asse delle ascisse, più potente è il farmaco a cui la curva si riferisce (fig. 3.7.A). La potenza di un farmaco ha, di per sé, un interesse relativo nella pratica clinica: essa influenza esclusivamente la dose necessaria per ottenere un determinato effetto. In genere si assume come valore di paragone della potenza quella concentrazione di farmaco che genera un effetto pari al 50% dell'effetto massimo: tale concentrazione viene definita EC<sub>50</sub> (*Effective Concentration 50%*). Nel caso di somministrazioni *in vivo*, come già accennato, si utilizzerà l'equivalente di EC<sub>50</sub>, cioè ED<sub>50</sub> (o  $D_{max/2}$ ) = *Effective Dose 50%*, dose che produce il 50% dell'effetto massimo.

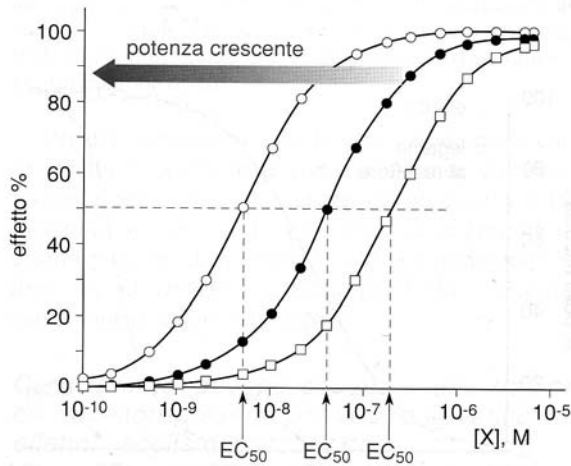


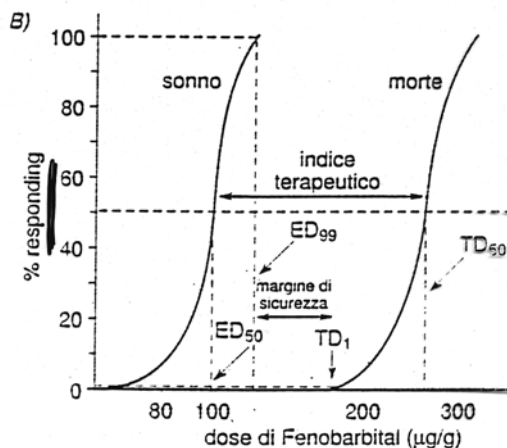
Fig. 4.7. Curve dose-risposta in scala semilogaritmica. Curve di farmaci con potenza diversa; un esempio di questo tipo potrebbe essere costituito dal rilassamento della muscolatura bronchiale da parte di farmaci  $\beta$ -adrenergici.  $EC_{50} = 5$  nM (tondini vuoti), 40 nM (tondini pieni) e 200 nM (quadrati vuoti).

Poiché é spesso scomodo esprimere  $ED_{50}$  o  $EC_{50}$  in moli/l, si é convenuto di esprimere la potenza dei farmaci con il parametro  $pD_2$ , dove:

$$(3.11) \quad pD_2 = -\log ED_{50}$$

In clinica assume invece un interesse maggiore l'*efficacia* di un farmaco, cioè l'entità massima dell'effetto che esso può indurre. Nell'esempio mostrato in figura 3.7.A, i tre farmaci differiscono per potenza ma hanno pari efficacia. Potenza ed efficacia sono quindi due termini che non devono essere assolutamente confusi tra loro. Un esempio classico ed illuminante in tal senso è rappresentato dalle diverse classi di diuretici: mentre i diuretici tiazidici sono molto potenti (attivi a basse concentrazioni plasmatiche), i farmaci dotati dell'effetto diuretico massimo (perciò più efficaci) sono i diuretici dell'ansa, come la furosemide.

In generale, per ciascun farmaco é possibile identificare più di un effetto ed è quindi possibile disegnare più curve dose-risposta, che possono essere diversamente posizionate sull'asse della ascisse. La fig. mostra un caso particolare di tale molteplicità di risposte, in cui la curva più a sinistra si riferisce ad un effetto desiderato del farmaco (induzione del sonno), mentre la curva più a destra riguarda un effetto tossico (morte). In questo caso, la distanza fra le due curve é un indice della sicurezza del farmaco stesso e viene espressa come *Indice Terapeutico*, definito come  $TD_{50}/ED_{50}$  (o  $TC_{50}/EC_{50}$ ), cioè rapporto fra le dosi che inducono rispettivamente il 50% dell'effetto tossico massimo e il 50% dell'effetto desiderato massimo (o che producono l'effetto tossico e l'effetto desiderato nel 50% dei casi).



Si utilizza anche un altro parametro, chiamato *Margine di Sicurezza*, definito come  $TD_1/ED_{99}$  (o  $TC_1/EC_{99}$ ), cioè rapporto fra le dosi che inducono rispettivamente 1% dell'effetto tossico massimo e 99% dell'effetto desiderato massimo. Questi indici possono variare a seconda del tipo di tossicità considerata e del tipo di patologia in atto. Infatti anche

un alto margine di sicurezza ( $TC_1/EC_{99}$ ) può non essere accettabile nella pratica clinica quando l'effetto desiderato sia la riduzione dello stato febbrile nel corso di una banale influenza e quello tossico un'aplasia midollare. D'altro canto, può essere accettabile un valore di  $TC_{50}/EC_{50}$  relativamente basso quando l'effetto desiderato è la remissione di una malattia ad esito fatale (es. AIDS, neoplasia), anche se l'effetto tossico è una grave sofferenza del paziente.

È anche importante ricordare che l'entità della risposta ad una data concentrazione plasmatica di un farmaco può variare enormemente fra individui diversi e che il raggiungimento di un certo valore percentuale dell'effetto massimo può venire all'interno di uno spettro di concentrazione plasmatica anche molto ampio. La **variabilità biologica** è quindi un concetto da tenere sempre in mente nel corso di una terapia medica, sia in termini di entità di risposta che farmacocinetici. I casi estremi di questa variabilità vengono definiti con termini ad hoc: *iperreattività* si riferisce alla comparsa di risposte anche a concentrazioni estremamente basse, usualmente inefficaci nella gran maggioranza dei pazienti, mentre *iporeattivo* è il paziente che non risponde (o risponde poco) neanche a dosi elevate di farmaco. Le variazioni della reattività ad un dato farmaco in ciascun paziente possono dipendere da cause sconosciute, ma molte volte esse sono dovute a variazioni di natura patologica o iatrogena del numero di recettori per il farmaco (vedi capitolo 10), o a fenomeni di adattamento cellulare più generali, come nel caso della chemioresistenza di diversi tumori (vedi capitolo 12). Il termine *ipersensibilità* è invece riservato agli aspetti allergici che possono insorgere a seguito della somministrazione del farmaco. Il termine *idiosincrasia* definisce la presenza di effetti inusitati (e per lo più indesiderati) che generalmente compaiono in un numero molto limitato di pazienti con modalità indipendenti dalla dose.

### RELAZIONI FRA INTERAZIONE FARMACO-RECETTORE E RISPOSTA

1) spesso la curva dose-risposta e la curva di interazione farmaco-recettore non coincidono;

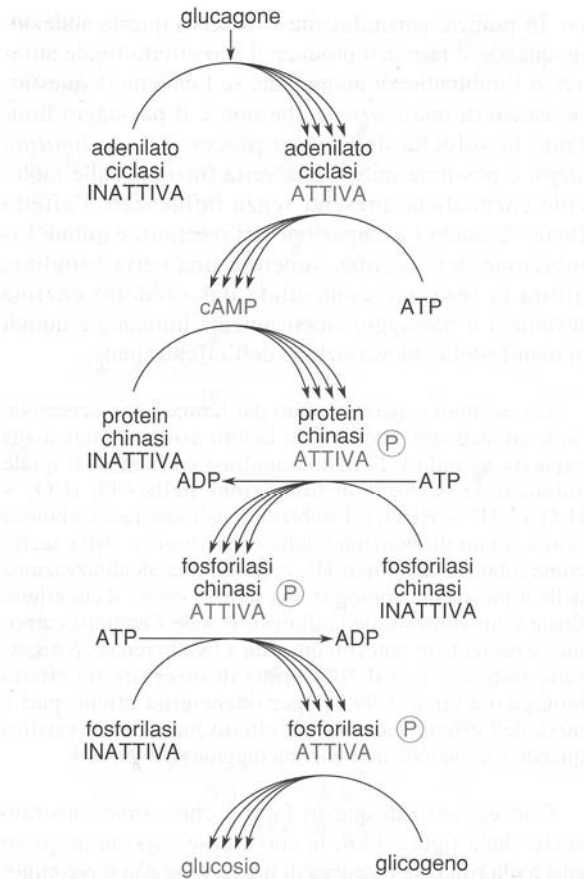
2) esistono farmaci che, pur occupando un determinato recettore, producono una risposta inferiore ad altri che occupano lo stesso recettore, oppure non producono nessuna risposta.

*Si può ottenere la risposta massima occupando soltanto una frazione di recettori:*

*Un sistema a cascata amplifica il segnale*

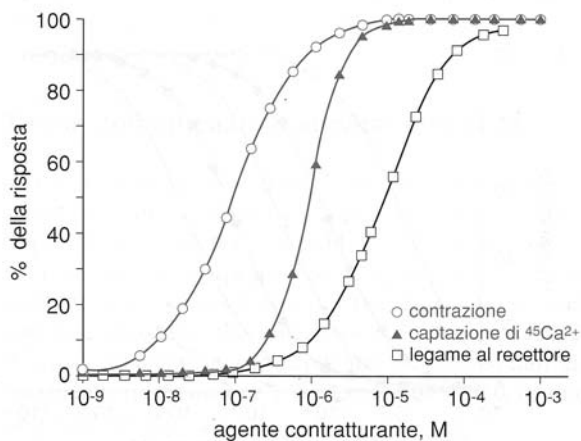
Le curve rappresentanti la risposta e il legame al recettore possono essere separate fra di loro anche di molti ordini di grandezza, se la risposta misurata non è generata immediatamente dall'attivazione del recettore, ma fra i due fenomeni si frappono una cascata di reazioni, che generalmente comprende anche la formazione di secondi messaggeri.

Un esempio particolarmente ben studiato, fra i moltissimi esistenti, è costituito dalla stimolazione ormonale della glicogenolisi, illustrato in fig.: le curve di interazione glucagone-recettore e di produzione di glucosio sono separate di 8 ordini di grandezza, corrispondenti ad un fattore di amplificazione di  $10^8$ .



**Fig. 4.9.** Meccanismo di amplificazione a cascata del segnale. L'esempio riguarda l'attivazione della glicogenolisi da parte del glucagone. Il fattore di amplificazione della risposta ad ogni passaggio varia fra  $10^2$  e  $10^6$ .

Per uno stesso recettore, la separazione fra la curva di legame e quella dose-risposta dipende dalla tipo di risposta preso in considerazione: in fig. è mostrato un esempio di come le curve di binding e di effetto possono differire non solo per posizione (*binding* e contrazione) ma anche per forma (*binding* e captazione di calcio radioattivo).



**Fig. 4.10.** La curva dose-risposta può essere spostata sull'asse delle X e/o avere pendenza o forma diverse rispetto alla curva dose-legame (curva nera). Per uno stesso farmaco, posizione, pendenza e forma della curva dose-effetto può variare se vengono presi in considerazione effetti diversi, in questo caso aumento della captazione di  $\text{Ca}^{2+}$  radioattivo e contrazione.

*Certi farmaci devono occupare una frazione dei recettori presenti prima che si verifichi un effetto: "soglia di occupazione"*

La condizione si verifica in genere quando la concentrazione del recettore sia elevata, e quindi non sia trascurabile rispetto alla concentrazione del farmaco. In pratica, generalmente si osserva questa situazione quando il farmaco produce il suo effetto finale attraverso l'inibizione di un enzima; se l'enzima in questione catalizza una reazione che non è il passaggio limitante la velocità dell'intero processo (*rate limiting step*), è possibile inibire una certa frazione delle molecole enzimatiche presenti senza influenzare l'effetto finale. Quando l'occupazione dei recettori, e quindi l'inibizione dell'enzima, supererà una certa "soglia", allora la reazione controllata dal suddetto enzima diventerà il passaggio cinematicamente limitante e quindi si manifesterà una variazione dell'effetto finale. Un esempio concreto è dato dai farmaci tipo acetazolamide ed analoghi, che devono la loro azione diuretica alla capacità di inibire l'enzima anidrasi carbonica, il quale catalizza la reazione di idratazione della CO<sub>2</sub> ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ); l'inibizione dell'anidrasi carbonica provoca una diminuzione della formazione e della secrezione tubulare degli ioni H<sup>+</sup>, e quindi una alcalinizzazione delle urine, da cui consegue una serie di eventi il cui effetto finale è un aumento della diuresi. Poiché l'anidrasi carbonica è presente in notevoli quantità a livello renale, è necessario inibirne circa il 50% prima di osservare un effetto biologico e circa il 99.7% per ottenere un effetto pari a metà dell'effetto massimo. L'effetto massimo si verifica quando l'inibizione dell'enzima raggiunge il 99.98%. Conseguenza di questo fatto è che, come mostrato anche dalla Fig. 3.8.B, la curva dose-risposta in questi casi è più ripida della curva di interazione con il recettore.

### *Agonisti ed antagonisti*

Prima di prendere in considerazione le ulteriori modificazioni apportate all'ipotesi dell'occupazione, nonché le ipotesi alternative, è opportuno dare alcune definizioni.

Si definisce *agonista* un farmaco che si lega ad un recettore in modo tale da generare una risposta biologica di per sé; generalmente, un agonista mima gli effetti di composti endogeni: per esempio il carbacolo è un agonista dei recettori per l'acetilcolina, in quanto mima gli effetti del normale neurotrasmettitore.

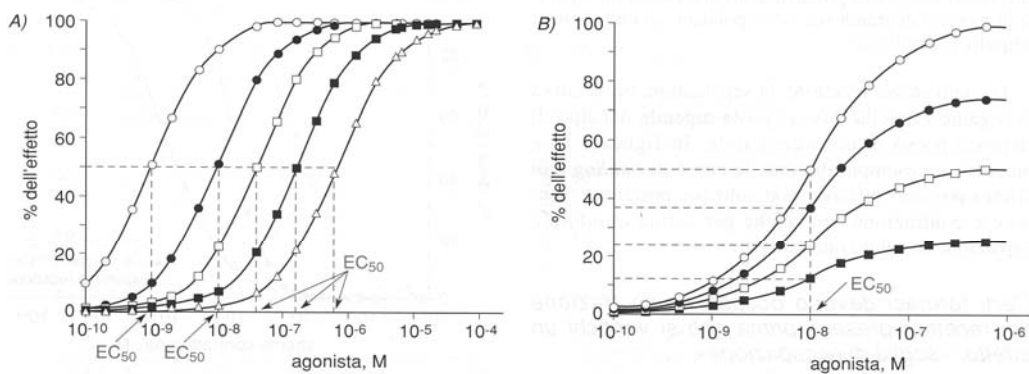
Per *antagonista* in senso stretto si intende un antagonista recettoriale, cioè un farmaco che, pur legandosi ad un recettore, è incapace di produrre un effetto di per sé, ma inibisce (parzialmente o completamente, a seconda della concentrazione) l'effetto di un agonista che agisca attraverso lo stesso recettore.

Il termine antagonista viene spesso usato, in senso lato, anche per indicare un antagonista funzionale; quest'ultimo è un farmaco, e più precisamente un agonista, che produce un effetto contrario a quello di un altro farmaco, e quindi ne inibisce l'azione pur non interagendo con lo stesso recettore. Per illustrare la differenza fra antagonisti recettoriali e funzionali, consideriamo, ad esempio, l'azione broncocontratturante dell'istamina: essa può essere antagonizzata somministrando sia un farmaco anti-istaminico (antagonista recettoriale), che un farmaco beta-agonista, che rilassa la muscolatura bronchiale attivando i recettori beta adrenergici (antagonista funzionale). Nel resto di questo capitolo ci occuperemo soltanto di antagonisti recettoriali e non di antagonisti funzionali.

#### *Gli antagonisti agiscono con meccanismi diversi*

Gli antagonisti recettoriali possono produrre un effetto "sormontabile" (fig. 3.11.A) o "insormontabile" (fig. 3.11.B), secondo la definizione data da Gaddum e coll. nel 1955.

Un antagonista "sormontabile" ha l'effetto di spostare la curva dose-risposta dell'agonista in un grafico semi-logaritmico parallelamente verso destra; aumentando la concentrazione di agonista a sufficienza, si può generare lo stesso effetto massimo ottenuto in assenza dell'antagonista. Pertanto, un antagonista di questo tipo aumenta la EC<sub>50</sub> apparente dell'agonista, senza modificarne l'effetto massimo. Come si può dedurre da quanto già detto a proposito della competizione tra farmaci su un medesimo sito di legame, il meccanismo molecolare di un antagonista "sormontabile" è generalmente competitivo, nel senso che esso si lega reversibilmente allo stesso sito a cui si lega l'agonista; le due molecole, perciò, competono per un sito comune, e l'antagonista "sormontabile" viene spesso chiamato anche antagonista competitivo.



**Fig. 4.11.** Modificazione della curva dose-risposta di un agonista (es., acetilcolina) in presenza di concentrazioni crescenti di un agonista sormontabile (es., atropina, in A) o insormontabile (es., gallamina, in B). I parametri utilizzati sono i seguenti: in A),  $K_d = 1$  nM costante di dissociazione dell'agonista;  $K_a = 0,1$  nM costante di dissociazione dell'antagonista; concentrazioni dell'antagonista: 0 (tondini vuoti), 1 (tondini pieni), 4 (quadrati vuoti), 16 (quadrati pieni) e 64 (triangoli) nM. In B),  $K_d = 10$  nM, concentrazioni dell'antagonista tali da inattivare rispettivamente 0 (tondini vuoti), 25 (tondini pieni), 50 (quadrati vuoti) e 75 (quadrati pieni) % dei recettori presenti.

Al contrario, un antagonista "insormontabile" sposta la curva dell'agonista verso destra in modo non parallelo, deprimendo l'effetto massimo ottenibile anche con concentrazioni elevate dell'agonista. Se esiste una relazione lineare fra occupazione del recettore e risposta, la EC<sub>50</sub> non viene modificata, in quanto essa si riferisce all'effetto massimo ottenibile in presenza di entrambi i farmaci. Dal punto di vista del meccanismo, un antagonista "insormontabile" é non competitivo (e infatti si usa anche la terminologia "antagonista non competitivo"), o perché interagisce in modo irreversibile con lo stesso sito dell'agonista, o perché si lega ad un sito del recettore diverso da quello occupato dall'agonista (meccanismo allosterico).

#### *Gli agonisti parziali*

La teoria dell'attività intrinseca predice che, quando tutti i recettori presenti sono occupati da un agonista parziale, si ottiene un effetto  $\Delta = \Delta_{\max} \cdot \alpha$ . Essa prevede inoltre che un agonista parziale abbia caratteristiche intermedie fra quelle di un agonista e quelle di un antagonista e sia quindi in grado di inibire parzialmente la risposta generata da un agonista completo.

