

Abstract

The U.S. Food and Drug Administration defines as Precision or Personalized Medicine (PM) an innovative therapeutic approach that tailors therapy and prevention on patients based on inter-individual variabilities in molecular or environmental features and in lifestyles. The major goals of PM are to maximize treatment efficacy and to reduce cost, toxicities and therapy failure rates by early identification of patients who might benefit or not of a specific treatment. In this scenario, therapeutic drug monitoring (TDM) is an important laboratory tool for PM because of the possibility to measure several drugs and bioactive molecules in human biological matrices. TDM is based on the hypothesis that in the majority of drugs, there is a relationship between administered dose and circulating concentration of unbound fraction - and between this concentration and observed pharmacological effects. TDM is recommended for drugs with significant inter-individual pharmacokinetic variability and an established relationship between blood concentrations and clinical efficacy and/or toxicity. Moreover, TDM is also advisable in special populations such as pregnant women and children. To date, liquid chromatography and immunometric assay are still considered the standard for molecule measurement in biological fluids; however, in recent years, LC tandem mass spectrometry (LC-MS) is gaining popularity because of the possibility of in-depth and multiplexed analysis with high selectivity and specificity.

During this Ph.D. program, we developed several high performance LC (HPLC)- and LC-MS/MS-based approaches for TDM of different drugs measured in various types of body fluids and validated according to EMA and FDA guidelines. In particular, we focused on:

- 1) TDM of hydroxychloroquine (HCQ) blood concentration, a drug with a wide therapeutic window. Our method was validated on a cohort of patients with Systemic Lupus Erythematosus treated with HCQ and blood concentrations were correlated to several clinical parameters, such quality of life. Moreover, TDM of HCQ was also used to monitor treatment adherence in those subjects.
- 2) TDM of a commonly used chemotherapeutic agent, the 5-fluorouracil (5-FU), which is known to have a narrow therapeutic window and a high toxicity
- 3) TDM of a new kinase inhibitor, Ruxolitinib, approved for the treatment of myeloproliferative hematologic disorders.
- 4) TDM of several drugs, such as caffeine and phenobarbital, in newborns who are at particular risk of uncorrected drug dosage. Due to the need to carry out analyses on very-small volume samples, we validated an analytical method using micro-sampling techniques such as the dried blood spot (DBS) sampling combined with LC-MS/MS analysis.

Riassunto

La U.S. Food and Drug Administration definisce con il termine Medicina di Precisione o Personalizzata (MP) un approccio terapeutico innovativo che identifica strategie terapeutiche e di prevenzione sul singolo paziente in base alla presenza di variazioni interindividuali in fattori biologici, ambientali e dello stile di vita. Gli obiettivi principali della MP sono quelli di aumentare l'efficacia terapeutica e di ridurre i costi, le tossicità e il tasso di fallimento terapeutico individuando precocemente i pazienti che possono beneficiare o meno di una specifica terapia. Il monitoraggio terapeutico dei farmaci (TDM) è quindi un importante strumento diagnostico per la MP perché permette di misurare farmaci e molecole bioattive in varie matrici biologiche. Il TDM si basa sull'ipotesi che per la maggior parte dei farmaci esiste un rapporto diretto tra dose somministrata e concentrazione circolante – e tra queste e l'effetto terapeutico. Per questo motivo, il TDM è raccomandato in tutti quei casi in cui sussiste una significativa variabilità farmacocinetica interindividuale ed una relazione nota tra concentrazioni plasmatiche ed effetto terapeutico o tossicità. Inoltre, il TDM è indicato anche in particolari popolazioni come le donne in gravidanza e i bambini. Ad oggi, la cromatografia liquida (LC) e le tecniche immunometriche sono ancora considerate lo standard per il dosaggio di molecole in fluidi biologici; tuttavia, negli ultimi anni, la LC accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS) sta rapidamente affiancando -e in alcuni casi soppiantando- le altre due tecniche grazie alla possibilità di effettuare analisi approfondite su numerose molecole in contemporanea, con alta selettività e specificità.

Nell'ambito del presente progetto di dottorato, sono stati sviluppati numerosi metodi analitici con analisi in high performance LC (HPLC)- o LC-MS/MS per il TDM di varie molecole in fluidi biologici e validati seguendo le linee guida della EMA e della FDA. In particolare, l'attenzione è stata focalizzata su:

- 1) TDM dell'idrossiclorochina (HCQ), un farmaco con un'ampia finestra terapeutica. Il metodo sviluppato è stato validato su una coorte di pazienti affetta da Lupus Eritematoso Sistemico in trattamento con HCQ e le concentrazioni plasmatiche sono state correlate con vari parametri clinici e con la qualità della vita. Inoltre, il TDM dell'HCQ è stato anche utilizzato per monitorare l'aderenza al trattamento di tali soggetti.
- 2) TDM di un chemioterapico largamente utilizzato quale il 5-fluorouracile, caratterizzato da una stretta finestra terapeutica e da grave tossicità.
- 3) TDM di un nuovo inibitore di chinasi, il Ruxolitinib, approvato per il trattamento di malattie ematologiche mieloproliferative.
- 4) TDM di varie molecole quali caffeina e fenobarbital in neonati che sono particolarmente a rischio di dosaggi terapeutici non corretti. In particolare, data la necessità di lavorare su

piccoli volumi, è stato messo a punto il TDM con metodica di micro-campionamento quale il dried blood spot accoppiato ad analisi in LC-MS/MS.