

2. BISFOSFONATI A CONFRONTO: FARMACOLOGIA *Up-to-date 2006*

Carmelo Erio Fiore, Pietra Pennisi
Clinica Medica OVE, Università di Catania

Introduzione

I bisfosfonati (BF) geminali sono composti chimici sintetizzati a metà del XIX secolo, il cui ruolo come modulatori del metabolismo calcico e del turnover scheletrico è stato riconosciuto e definito solo nel 1968 da Herbert Fleisch e coll. Dal punto di vista strutturale, i BF sono analoghi del pirofosfato inorganico e ne differiscono per sostituzione nella *core structure* di un atomo di ossigeno con uno di carbonio. Tale sostituzione, comune per tutti i BF, rende il composto resistente alle pirofosfatasi e al calore. L'aggettivo "geminale" indica la presenza di due legami carbonio-fosforo P-C-P sullo stesso atomo di carbonio. Nonostante la semplicità della struttura di base, i BF differiscono tra di loro perché le rimanenti valenze del carbonio possono venire saturate con altri due radicali (R_1 e R_2) che ne condizionano sia l'affinità per l'idrossiapatite (R_1) che la potenza anti-riassorbitiva (R_2). In particolare, la presenza di un gruppo idrossilico -OH in posizione R_1 serve da *bone hook* e, incrementando l'affinità per l'idrossiapatite (HAP), favorisce una rapida localizzazione del BF sulla superficie di riassorbimento, specialmente nei siti trabecolari ad alto turnover. Una volta che il BF si è "uncinato" all'osso, è la conformazione tridimensionale della catena R_2 che ne determina la potenza dell'inibizione dell'attività osteoclastica e, quindi, del riassorbimento. Una conoscenza approfondita delle caratteristiche farmacocinetiche di ciascun BF è di fondamentale importanza per stabilire l'intervallo posologico nelle somministrazioni a lungo termine, che si rendono necessarie per patologie croniche, quali l'osteoporosi e la malattia di Paget.

Qualunque sia la struttura definitiva di ogni singolo composto, i BF come classe si caratterizzano per un basso assorbimento intestinale. Essi vengono allontanati rapidamente dalla circolazione generale; tuttavia sia l'*uptake* che la ritenzione *long-term* nello scheletro dipendono dalla funzionalità renale e, soprattutto, dall'entità del turnover del singolo soggetto. Pertanto gli studi di farmacocinetica *long-term* condotti su volontari sani non sono interamente applicabili ai pazienti, specie in presenza di elevato turnover scheletrico generalizzato o focale. Per questi motivi i dati di farmacocinetica relativi a differenti BF non sono sempre tra loro paragonabili, anche per la bassa sensibilità delle metodiche analitiche di dosaggio.

Gli studi di farmacodinamica hanno permesso di evidenziare notevoli differenze tra i vari BF per quanto riguarda la potenza anti-riassorbitiva. In generale, i composti che includono almeno un atomo di azoto nella catena laterale R_2 (i cosiddetti amino-bisfosfonati) sono più potenti di quelli che non ne contengono; così, considerata uguale a 1 la potenza

di etidronato (che non ha gruppi aminici in R₂) e uguale a 10 la potenza di clodronato e tiludronato (ambedue includono -Cl in R₂), gli amino-bisfosfonati di seconda, terza e quarta generazione dimostrano una potenza relativa variabile da 100 (pamidronato), sino a 1.000 (alendronato), 10.000 (risedronato) e oltre 10.000 volte (acido zoledronico). Anche in questo caso, tuttavia, la misura della diversa potenza deriva da studi condotti in condizioni sperimentali differenti e non è sempre corretto inferire dati nell'uomo da quelli ottenuti *in vitro*. Ad oggi, nonostante le numerose proposte, non è disponibile un modello prospettico validato che comprenda tutte le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche dei BF, principalmente perché sarebbe molto complicato, in un contesto di distribuzione e di redistribuzione mediata dallo stesso target della sostanza, calcolare tutte le relazioni tra affinità, potenza relativa, concentrazioni di marker biochimici del turnover scheletrico, effetti sulla massa ossea e, finalmente, rischio di frattura. Gli studi che vengono riferiti in seguito contribuiscono comunque in misura rilevante a un'ulteriore comprensione delle differenze esistenti tra i vari bisfosfonati oggi disponibili per l'impiego nell'uomo.

Rassegna bibliografica

■ Differenze nell'affinità di legame con l'idrossiapatite

La potente azione d'inibizione del riassorbimento osseo osservata con i bisfosfonati non può essere spiegata solo da un effetto di tipo fisico-chimico dei BF stessi, bensì attraverso un preciso meccanismo molecolare d'azione di tipo intracellulare.

L'affinità dei BF per l'osso rimane tuttavia proprietà indispensabile in grado di giustificare diverse importanti proprietà biologiche di questi composti, quali l'*uptake* e la ritenzione nello scheletro, la diffusione nell'osso, il *re-uptake*, gli effetti sulla matrice mineralizzata e sulle funzioni cellulari. Nello studio di Nancollas [1] vengono analizzate alcune caratteristiche farmacocinetiche (affinità, legame) di sei diversi BF (clodrona-

Tabella 1. Concentrazione di BF in grado di inibire la crescita dei cristalli di HAP

	Percentuale d'inibizione della crescita dei cristalli di HAP			
	20%	50%	80%	100%
Clodronato	3,3	13,4	>25	a
Etidronato	2,0	6,5	13,2	a
Risedronato	1,3	3,8	9,8	a
Ibandronato	1,1	3,4	7,4	a
Alendronato	0,8	2,4	5,2	7,6
Zoledronato	0,7	2,2	4,8	6,5

HAP= idrossiapatite; a = reazione non del tutto soppressa

Tabella 2. Costanti di dissociazione del gruppo fosforico, gruppo funzionale dei BF

	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}	pK_{a4}
Clodronato	1,70	2,13	5,66	8,30
Etidronato	1,87	2,76	6,78	10,20
Risedronato		2,77	6,79	10,45
Ibandronato		2,84	6,08	10,43
Alendronato		2,35	6,55	10,09
Zoledronato		2,89	6,63	10,99

to, etidronato, risedronato, ibandronato, alendronato, zoledronato) alle concentrazioni utilizzate *in vivo*.

Nel modello sperimentale *in vitro* utilizzato dagli Autori, tutti e sei i BF utilizzati erano in grado di inibire la crescita dei cristalli di HAP (Tabella 1). Il BF più potente si è rivelato zoledronato seguito da alendronato, ibandronato, risedronato, etidronato e, infine, clodronato (meno potente degli altri). Per quest'ultimo, infatti, occorreva una concentrazione di $13,4 \times 10^{-6}$ mol/l per inibire la crescita dei cristalli di HAP del 50%. Inoltre, solo zoledronato e alendronato erano in grado di inibire al 100% la crescita di HAP a concentrazioni relativamente alte. Si è osservato ancora che clodronato mostrava una costante di affinità cinetica (k_L) inferiore del 50% rispetto a quella di etidronato, effetto dovuto probabilmente all'assenza del gruppo OH nella catena laterale R_1 di clodronato. Per gli altri BF, la diversità del gruppo presente nella catena laterale R_2 era in grado di influenzarne ulteriormente l'affinità di legame all'HAP. Ad esempio, la k_L di risedronato, alla concentrazione di $2,19 \times 10^{-6}$ mol/l, differiva in modo statisticamente significativo dalla k_L degli altri BF.

I dati di questo studio dimostrano che l'affinità dei BF per l'HAP è circa 10 volte superiore a quella di altri inibitori dei cristalli di HAP [2-4] e questa elevata affinità spiega la permanenza dei BF nell'osso anche per lunghi periodi. Altro parametro studiato è stata la costante di dissociazione del gruppo fosforico dei BF, che in questo caso è risultata più bassa per clodronato (effetto dovuto alla presenza degli ioni cloro che facilitano la dissociazione dei protoni fosfonati) (Tabella 2). Questa caratteristica biochimica influenza l'assorbimento dei composti nei cristalli di HAP, ovviamente risultato più basso per clodronato e per quei composti in genere che presentano cariche negative. Anche il gruppo biochimico presente nella catena laterale R_2 è in grado d'influencare la dissociazione protonica del gruppo fosforico, strettamente correlata alle variazioni di pH del mezzo. L'assorbimento sulla superficie rimane comunque inferiore per quei composti (etidronato e clodronato) che non possiedono catene laterali sensibili alle variazioni del pH (Figura 1).

Commento

In questo studio gli Autori analizzano le differenti caratteristiche farmacocinetiche di alcuni bisfosfonati. Pur simili nella loro struttura principale, la diversità della catena

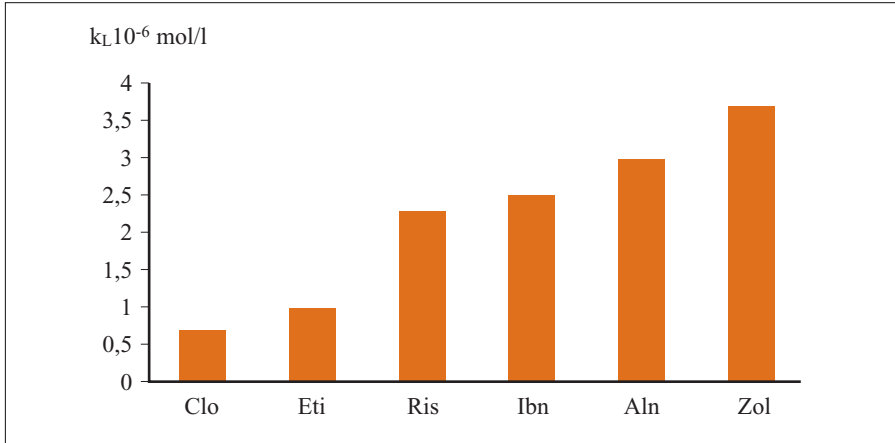


Figura 1. Costanti di affinità di assorbimento di diversi BF a pH 7,4

laterale R₁ conferisce loro caratteristiche diverse. Tuttavia, gli Autori dimostrano che anche la presenza di un gruppo diverso nella catena laterale R₂ conferisce ai BF differenti caratteristiche farmacocinetiche. In modo particolare il gruppo della catena laterale R₂ rende diversi questi composti nell'affinità di legame alla superficie mineralizzata, nel potenziale zeta (capacità della sostanza di diffondere ed essere assorbita dal sistema) e nella tensione superficie-composto, che riflette la stabilità e l'affinità di legame. La differenza di affinità di legame per la HAP si riflette nelle diverse proprietà farmacocinetiche dei BF, nonché sulla loro potenza e persistenza dell'effetto. La potenza biologica di ciascun BF dipende in prima istanza dall'affinità di legame del composto alla superficie mineralizzata. Questo ne determina, infatti, l'*uptake* e la ritenzione nell'osso, la diffusione e il rilascio della sostanza da parte dell'osso, il *re-uptake*, gli effetti sulla matrice mineralizzata e sulle funzioni cellulari.

Altra caratteristica farmacocinetica importante per la determinazione della potenza biologica dei BF è la capacità di essere ritenuti nell'osso, caratteristica in grado di spiegare la persistenza degli effetti dei BF anche dopo la sospensione della somministrazione del farmaco. L'osso agirebbe in definitiva come un sistema in grado di assorbire e rilasciare la sostanza localmente per riassorbirla nuovamente. I BF, quindi, con bassa affinità di legame diffonderebbero più facilmente; altri, come ad esempio alendronato, vengono maggiormente ritenuti nell'osso, dato consistente con una maggiore affinità di legame di quest'ultimo (Tabella 3). Il dato è stato ulteriormente confermato dall'escrezione urinaria di

Tabella 3. Affinità di legame dei BF

BF con bassa affinità di legame	BF ad alta affinità di legame
Ridotto <i>uptake</i>	Alto <i>uptake</i>
Maggiore dispersione	Minore dispersione
Basso <i>re-uptake</i>	Alto <i>re-uptake</i>
Maggiore diffusione nell'osso	Minore diffusione nell'osso

risedronato dopo 24 ore, che risultava del 65% rispetto a quella di alendronato (44%) e di zoledronato (38%) [5,6].

La differente potenza dei BF ha implicazioni cliniche rilevanti e può essere sfruttata a seconda della patologia da trattare. Ad esempio, la somministrazione di 4 mg di zoledronato è in grado di inibire il riassorbimento osseo per un anno, e questo può rivelarsi utile nell'osteoporosi post-menopausale. Così com'è stato dimostrato che gli effetti della somministrazione di alendronato 10 mg per 5 anni nell'osteoporosi post-menopausale permangono per diversi anni dopo la sospensione del trattamento.

Tuttavia, in altri casi (trattamento di patologie in età infantile, o in donne puerpere, o in caso di terapie combinate) la maggiore potenza del BF utilizzato e quindi la maggiore ritenzione del composto nell'osso potrebbe rappresentare un problema. La reversibilità degli effetti dei BF dipende comunque anche dalla dose somministrata e dal tempo cumulativo di somministrazione. La differente capacità d'inibizione del turnover osseo da parte dei diversi BF riportata nei trial clinici è comunque per buona parte relativa alla diversa affinità di legame del composto alla matrice mineralizzata.

■ Ipercalcemia maligna: comportamento di tre diversi BF

I BF sono utilizzati nella pratica clinica anche nel trattamento dell'ipercalcemia maligna. I meccanismi che sostengono l'ipercalcemia come manifestazione della cosiddetta "sindrome paraneoplastica" [7] sono essenzialmente due: l'osteolisi indotta dai fattori prodotti dal tumore stesso (TNF, IFN ecc.) e l'aumento del riassorbimento osseo indotto dalla produzione di sostanze PTH-simili (PTHrP), fenomeno riscontrato in circa il 90% di pazienti con neoplasie solide [8]. Quest'ultimo meccanismo sembra avere un ruolo fondamentale nello sviluppo della sindrome paraneoplastica. Infatti, i fattori PTH-simili agirebbero simulando a tutti gli effetti le azioni del PTH stesso.

In questo studio [9] gli Autori si propongono di studiare gli effetti di diversi BF sul metabolismo calcio-fosforo, e in particolare sull'ipercalcemia (sperimentalmente indotta mediante sostanze PTH-simili) in un modello animale. Lo studio è stato condotto su ratti adulti sottoposti a tiroparatiroidectomia e successivamente trattati con PTH (frammento amino-terminale) (Human, 1-34 Amide; Peptide Institute, Osaka, Japan) mediante infusione a pompa. I dosaggi utilizzati sono stati di 10, 20, 30, 40 pmol/h. Gli Autori hanno osservato un incremento della calcificazione renale e della dilatazione tubulare alla dose di 40 pmol/h. Per tale motivo è stato preferito un dosaggio standard di 20 pmol/h. I bisfosfonati (clodronato, etidronato, pamidronato) sono stati somministrati per via endovena e i campioni di sangue raccolti due e sei giorni dopo l'infusione. Tutti e tre i BF inducevano una riduzione della concentrazione plasmatica di calcio in modo dose-dipendente (dati rilevati a 2 gg dall'infusione) (Tabella 4). Gli effetti di clodronato e di etidronato erano sostanzialmente sovrapponibili, mentre l'efficacia di pamidronato risultava 18 volte superiore a quella di clodronato. Inoltre, sia clodronato (25 mg/kg) che pamidronato (1,39 mg/kg), ma non etidronato, erano in grado di ridurre il prodotto $\text{Ca} \times \text{P}$ e l'azotemia, dimostrando anche un possibile effetto protettivo sul rene. In modo particolare, l'utilizzo di clodronato alla dose di 50 mg/kg era in

Tabella 5. Effetti di clodronato sulla funzionalità renale nell'ipercalemia indotta da PTH

Clodronato (mg/kg)	Calcificazione				Dilatazione tubulare			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Controlli (paratiroidectomizzati)								
0			3/3				3/3	
Ipercalemia indotta da PTH, 40 pmol/h								
0		2/5	2/5	1/5		2/5	1/5	2/5
30	1/4	2/4	1/4		1/4	3/4		
50	2/4	2/4		a	2/4	2/4		a
70	3/5	2/5		a	3/5	2/5		a
90	4/4			b	4/4			b

Gli effetti sono rappresentati per gradi

I dati rappresentano gli eventi incidenti sul numero totale
a = p<0,05; b = p<0,01 vs. controlli

anche dagli effetti istologici provocati sul rene da parte di clodronato e di pamidronato, con riduzione della calcificazione e della dilatazione tubulare, suggerendo quindi un possibile utilizzo dei BF anche nell'ipercalemia associata a disfunzione renale (Tabella 5).

Etidronato, invece, differisce dagli altre due BF in quanto riduce certamente i livelli di calcemia, ma interferisce con il metabolismo del fosforo (probabilmente aumentandone l'assorbimento tubulare) e comportando, quindi, un incremento della fosforemia e anche dell'azotemia. Altri studi condotti con etidronato invece riportano un effetto di inibizione delle calcificazioni indotte dalla vitamina D3 [10].

In conclusione, lo studio di Komatsu dimostra che etidronato, clodronato e pamidronato riducono efficacemente la calcemia nel modello sperimentale utilizzato. Tuttavia, etidronato, pur riducendo la calcemia, incrementa la concentrazione del fosfato con possibile deterioramento della funzione renale. Per tali motivi l'impiego di etidronato nel trattamento dell'ipercalemia indotta da PTHrP dovrebbe essere evitato. Nonostante la marcata differenza nell'efficacia ipocalcemizzante osservata tra pamidronato e clodronato, quest'ultimo, secondo Komatsu, andrebbe preferito per il trattamento dell'ipercalemia neoplastica a causa dell'assenza di effetti collaterali.

■ Inibizione della prenilazione delle proteine: conseguenze intracellulari

Solo recentemente è stato chiarito il meccanismo molecolare d'azione dei BF contenenti gruppi amminici. Studi effettuati *in vitro* hanno dimostrato, infatti, che i BF inibiscono la prenilazione di proteine GTPasi-dipendenti (RAS, Rac, Rho ecc.) nei macrofagi. La modificazione post-traduzionale di proteine con gruppi farnesilici (farnesil pirofosfato) o geranil-

Tabella 4. Effetti dei BF su alcuni indici biochimici nell'ipercalcemia indotta da PTH

Molecola	Dose (mg/kg)	Ca ²⁺ (mg/dl)	P (mg/dl)	Ca ²⁺ ×P (mg ² /dl ²)	Azotemia (mg/dl)
Controllo (paratiroideomizzato)		16,6±0,3	5,3±0,2	88,1±4,3	30,0±4,2
Clodronato	6,25	15,9±0,8	4,0±0,2 ^a	62,9±3,3 ^a	17,0±1,5 ^a
	25,0	13,4±0,8 ^b	4,0±0,1 ^a	52,7±2,9 ^a	15,2±1,7 ^a
	50,0	10,8±0,6 ^a	4,8±0,4	50,6±3,8 ^a	13,2±0,8 ^a
Etidronato	6,25	15,4±0,9	5,4±0,3	83,2±7,4	17,2±2,4
	12,5	14,5±0,7	5,7±0,5	80,7±5,3	26,7±5,2
	25,0	13,3±0,6 ^a	7,0±0,5 ^a	91,8±5,6	49,0±8,5 ^b
Pamidronato	3,13	9,7±0,3 ^a	4,9±0,3	47,5±3,5 ^a	15,4±1,1 ^a
	6,25	10,9±0,5 ^a	4,1±0,2	44,6±2,4 ^a	17,0±1,8 ^a
	12,5	10,0±0,7 ^a	5,8±0,6	59,2±9,1 ^a	17,6±1,8 ^a

^a *p*<0,01 vs. controlli; ^b *p*<0,05 vs. controlli

grado di inibire la calcificazione renale e la dilatazione tubulare osservate nei ratti trattati con PTH (40 pmol/h).

Commento

In questo modello sperimentale di ipercalcemia vengono prese in considerazione le azioni di tre differenti BF. In modo particolare, per quanto riguarda l'effetto ipocalcemico indotto dai BF, esso sembra essere dovuto a un'inibizione della concentrazione dei livelli plasmatici di calcio, che si riflette infatti in una riduzione del prodotto Ca×P, senza comunque alcuna interferenza sul metabolismo del fosforo. Infatti, si potrebbe ipotizzare in prima istanza che l'effetto ipocalcemico dei BF sia dovuto a un incremento della fosforemia che segue alla disfunzione renale. In realtà in questo modello viene ampiamente dimostrato che l'utilizzo del PTH alla dose di 20 pmol/h non provoca effetti nocivi sul rene, e infatti la concentrazione di urea dei ratti trattati si manteneva sempre al di sotto di 50 mg/dl suggerendo, quindi, che la riduzione della concentrazione plasmatica di calcio non è dovuta a disfunzione renale.

Lo studio di Komatsu è stato condotto su ratti paratiroideomizzati, per cui viene esclusa una possibile azione della calcitonina nella riduzione della calcemia. Il modello proposto dagli Autori appare dunque ideale per lo studio degli effetti dei BF sul metabolismo calcio-fosforo. Nell'uomo, il prodotto calcio-fosforo deve essere mantenuto costante; un incremento di tale prodotto, infatti, costituisce un fattore di rischio per calcificazioni ectopiche; viceversa una riduzione comporta un rischio aumentato di osteomalacia. In questo studio l'effetto ipotizzato da parte dei BF è quello di una protezione renale mediante inibizione delle calcificazioni renali indotte dall'ipercalcemia. Ciò è dimostrato

geranilici (geranyl-geranyl pirofosfato) è tappa indispensabile per la funzione biologica e la sopravvivenza degli osteoclasti. L'inibizione della prenilazione comporta un accumulo di proteine GTPasi non prenilate, che produce un'alterazione del citoscheletro degli osteoclasti provocandone infine la morte cellulare per apoptosi. L'inibizione dell'enzima FPP sintetasi, con conseguente alterazione della via del mevalonato, interessa non solo gli osteoclasti, ma una varietà di altri tipi cellulari (*in vitro*), visto che la FPP sintetasi è un enzima ubiquitario. In questo studio [11], gli Autori analizzano gli effetti di alcuni amino-BF sull'attività di proteine GTPasi della famiglia Rho su colture cellulari di macrofagi e osteoclasti.

Terreni di colture cellulari delle linea macrofagica J774 sono stati incubati per 12-72 ore in presenza di inibitori della prenilazione. Le cellule incubate per 30 ore con 100 μM di risedronato o zoledronato mostravano un notevole incremento di Rac-GTP;

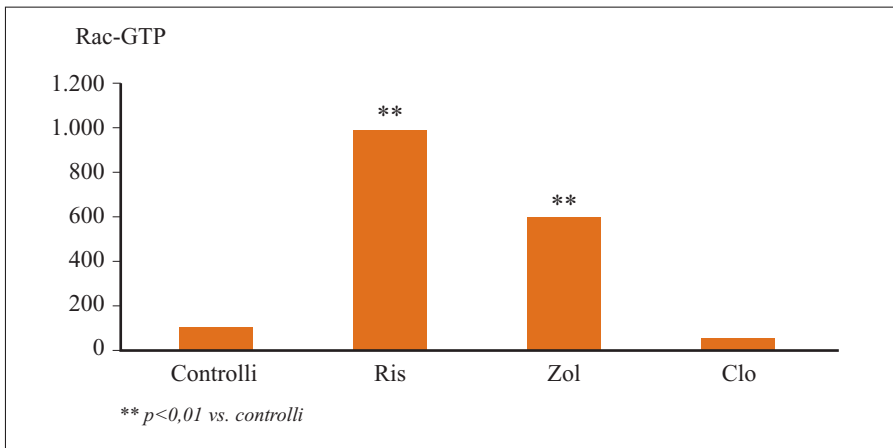


Figura 2. I BF con gruppo amminico, a differenza di clodronato, provocano un accumulo di GTPasi della Rho family

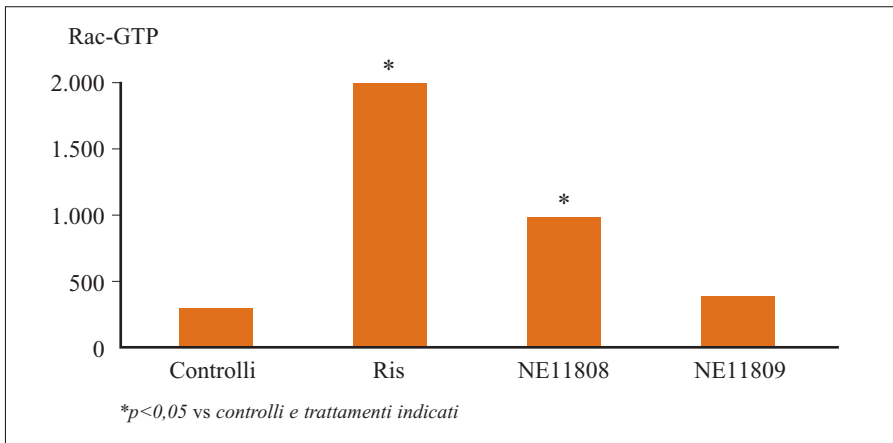


Figura 3. L'accumulo della GTP binding protein della famiglia Rho GTPasi è direttamente correlato alla potenza di inibizione dei BF sulla FPP sintetasi

questo effetto non si riscontrava invece nelle cellule trattate con clodronato (1 mM) (Figura 2). Inoltre, anche i livelli di Cdc42-GTP e di Rho-GTP si incrementavano sotto l'azione di risedronato e zoledronato. L'accumulo delle GTP binding protein della famiglia delle Rho risultava correlato alla potenza di inibizione esercitata dai BF sulla FPP sintetasi (Figura 3). Infatti sotto l'effetto di 100 μ M di risedronato, i livelli intracellulari di GTP-Rac si incrementavano notevolmente, mentre rimanevano del tutto invariati con la somministrazione di 100 μ M di NE11808 e di NE11809 (due composti strutturalmente simili a risedronato, ma inibitori meno potenti della FPP sintetasi). Gli Autori inoltre analizzano gli effetti dell'inibizione della prenilazione sul p38 (effettore del Rac attivato, nonché fattore cruciale di regolazione della differenziazione degli osteoclasti). Anche in questo caso, il trattamento con 100 μ M di risedronato o zoledronato provocava un significativo aumento del p38 fosforilato (Figura 4). Tale effetto non si verificava invece sotto l'azione di 500 μ M di clodronato.

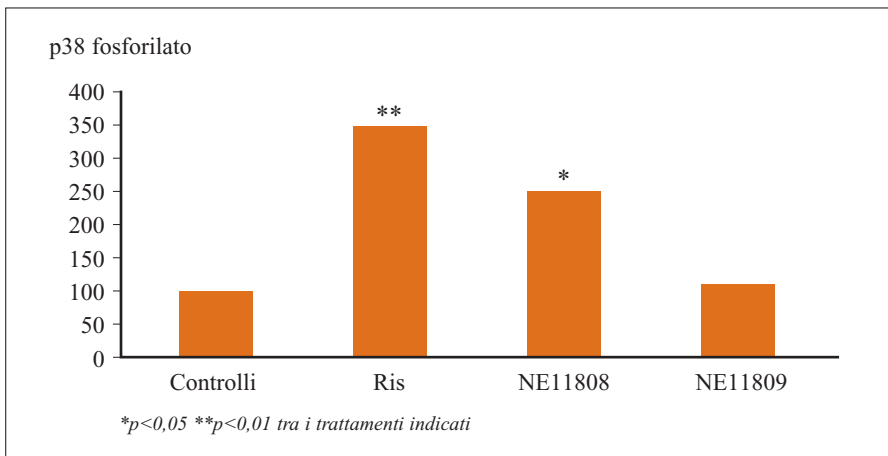


Figura 4. Gli amino-BF (risedronato, zoledronato) provocano un aumento del p38 fosforilato

Commento

Il lavoro analizza le ripercussioni sui segnali di attivazione intracellulari provocate dall'inibizione dell'enzima FPP sintetasi e dal conseguente accumulo di forme non prenilate di proteine GTPasi. Viene ancora una volta sottolineata la differente modalità di azione dei BF contenenti un gruppo amminico (risedronato, zoledronato) da quelli di prima generazione (clodronato). Sotto l'azione degli amino-BF infatti si ha un notevole accumulo intracellulare di proteine GTPasi (Rho, Rac) non prenilate, che provocherebbero profonde alterazioni di segnali intracellulari, spiegando un'altra modalità di azione dei BF. Tale effetto si osservava inoltre in differenti tipi cellulari (cellule macrofagiche J774, osteoclasti umani e colture cellulari della linea tumorale PC3). Emergono, infine, differenze all'interno della stessa classe dei BF, in termini di accumulo di GTPasi non prenilate e delle conseguenze correlate, sulla base della minore o maggiore inibizione esercitata dai diversi amino-BF sulla FPP sintetasi.

Bibliografia

1. Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ et al (2006) Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone* 38:617-627
2. Wikiel K, Burke EM, Perich JW et al (1994) Hydroxyapatite mineralization and demineralization in the presence of synthetic phosphorylated pentapeptides. *Arch Oral Biol* 39:715-721
3. Gilman H, Hukins DW (1994) Seeded growth of hydroxyapatite in the presence of dissolved albumin. *J Inorg Biochem* 55:21-30
4. Koutsopoulos S, Dalas E (2000) Crystallization of Hydroxyapatite in the Presence of Lysine. *J Colloid Interface Sci* 15:207-212
5. Christiansen C, Phipps R, Bugio D et al (2003) Comparison of risedronate and alendronate pharmacokinetics at clinical doses. *Osteoporosis Int* 14 (suppl 7):S38
6. Chen T, Berenson J, Vescio R et al (2002) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol* 42:1228-1236
7. Mundy GR (1988) Hypercalcemia of malignancy revisited. *J Clin Invest* 1:1-6
8. Kramer S, Reynolds FH Jr, Castillo M et al (1991) Immunological identification and distribution of parathyroid hormone-like protein polypeptides in normal and malignant tissues. *Endocrinology* 4:1927-1937
9. Komatsu Y, Imai Y, Itoh FMK et al (2005) Rat model of the hypercalcaemia induced by parathyroid hormone-related protein: characteristics of three bisphosphonates. *Eur J Pharmacol* 507: 317-324
10. Fleisch HA, Russell RG, Bisaz S et al (1970) The inhibitory effect of phosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on aortic and kidney calcification in vivo. *Eur J Clin Invest* 1:12-18
11. Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH et al (2006) Inhibition of protein prenylation by bisphosphonates causes sustained activation of RAC, Cdc42 and Rho-GTPases. *J Bone Miner Res* 21:684-694