

Nanoparticelle e direzionamento sito-specifico di farmaci

di Maurizio Ricci

In questi ultimi anni sono stati sviluppati dei sistemi "carrier" in grado di direzionare in modo più specifico un farmaco verso il suo sito bersaglio, in modo da ottenere una riduzione degli effetti collaterali accompagnata dalla massima efficacia terapeutica. Tra i vari "carriers" attualmente disponibili, quelli colloidali di natura polimerica (nanoparticelle), offrono numerosi vantaggi. Questo lavoro si propone di esaminare i più comuni metodi di preparazione delle nanoparticelle, nonché le loro applicazioni generali in campo farmaceutico.

I sistemi per il direzionamento dei farmaci rappresentano un importante aspetto delle forme farmaceutiche a "rilascio modificato" con i quali si desidera controllare la cessione di un principio attivo e la sua distribuzione in un determinato sito nell'organismo, che può essere un organo, un tessuto, un particolare tipo di cellula o un organello sub-cellulare. L'obiettivo di tali sistemi è pertanto quello di dirigere il farmaco esclusivamente (o principalmente) verso il sito bersaglio desiderato (*drug targeting*), ottenendo in tal modo la massima efficacia terapeutica e, al tempo stesso, la riduzione degli effetti collaterali conseguenti ad una inappropriata distribuzione tissutale, il che si traduce, alla fine, in un miglioramento dell'indice terapeutico [1]. Tra i più promettenti sistemi in grado di raggiungere tali obiettivi si annoverano le nanoparticelle polimeriche che possono essere definite particelle solide, di dimensioni colloidali, con diametri generalmente compresi tra 15 nm ed 1 µm, di forma sferica, costituite da polimeri, naturali e sintetici e classificabili da un punto di vista morfologico in nanocapsule e nanosfere (Figura 1):

- le nanocapsule sono sistemi di tipo vescicolare ("reservoir") costituiti da una membrana di natura polimerica, che racchiude un nucleo oleoso in cui è disciolto o sospeso il principio attivo. Quest'ultimo può anche essere adsorbito alla superficie esterna della membrana stessa;

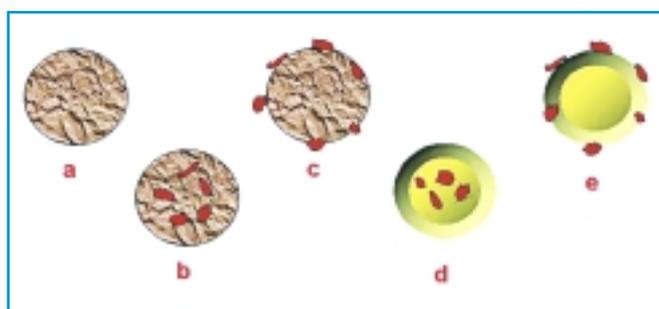


Figura 1 - a) Farmaco disciolto nella matrice polimerica; b) farmaco intrappolato nella matrice; c) farmaco adsorbito sulla superficie della nanosfera; d) farmaco incapsulato nella nanocapsula; e) farmaco adsorbito sulla superficie della membrana della nanocapsula

- le nanosfere consistono di una matrice solida polimerica contenente il principio attivo che può essere disciolto nel polimero, intrappolato tra le maglie della matrice e/o semplicemente adsorbito sulla superficie esterna della particella.

Tuttavia è importante sottolineare che a causa delle ridotte dimensioni, spesso è difficile poter dimostrare se tali particelle presentano una matrice continua o una parete ben definita, per cui il termine più generale di nanoparticelle viene spesso impiegato per indicare entrambe.

Metodi di preparazione

Numerosi approcci per la preparazione delle nanoparticelle sono stati descritti in letteratura [2], ma essenzialmente questi possono essere classificati in due grandi categorie:

- metodi che richiedono una reazione di polimerizzazione;
- metodi che utilizzano polimeri preformati.

Metodi che richiedono una reazione di polimerizzazione di monomeri

Questi metodi si basano su reazioni di polimerizzazione di monomeri lipofili o idrofili, che possono essere sia disciolti sia emulsionati nella fase continua. In entrambi i casi, i polimeri

M. Ricci, Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco - Università di Perugia - Via del Liceo, 1 - 06123 Perugia. riky@unipg.it

Articolo presentato all'incontro "Le micro/nanotecnologie nei settori biomedicale, farmaceutico, biotecnologico: la rivoluzione industriale appena iniziata?" (Federchimica - Cnr), Milano, maggio 2001.

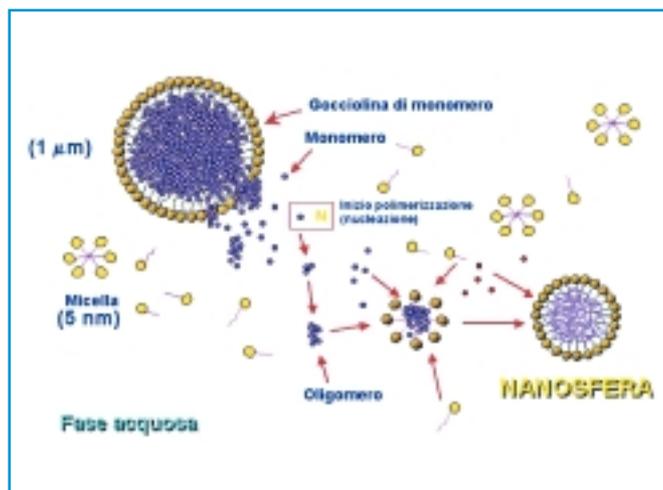


Figura 2 - Meccanismo di preparazione di nanosfere per polimerizzazione

che si originano sono insolubili in acqua. La scelta di un particolare metodo di preparazione e dell'adatto polimero dipende dalle proprietà chimico-fisiche del principio attivo, dalle caratteristiche del rilascio, dagli obiettivi terapeutici, dalla via di somministrazione, dalla biodegradabilità/ biocompatibilità del materiale polimerico ed infine da considerazioni di ordine regolatorio.

Nanosfere di poli(alchilmetacrilato) [3]

Dopo aver disciolto il monomero nella fase acquosa, il processo di polimerizzazione viene iniziato, o chimicamente per aggiunta di un iniziatore ad elevate temperature (65 °C), o per irradiazione (⁶⁰Co). Il principio attivo può essere aggiunto alla fase acquosa prima, durante o dopo la reazione di polimerizzazione.

Nanosfere di poli(alchilcianoacrilato)

Questi polimeri sono particolarmente interessanti per la loro elevata biodegradabilità e semplicità dei processi di polimerizzazione. La tecnica di preparazione è quella della polimerizzazione in emulsione che prevede la dispersione del monomero (liquido) sotto forma di goccioline di circa 1 µm di diametro, nella fase acquosa esterna (Figura 2).

Molecole di monomero diffondono dalle goccioline emulsionate nella fase acquosa esterna dove inizia il processo di nucleazione per opera degli OH⁻ dell'acqua, con formazione di piccoli aggregati polimerici. Il processo di polimerizzazione della catena è assicurato da ulteriori molecole di monomero che diffondono verso il polimero in accrescimento.

Poiché la polimerizzazione indotta dagli OH⁻ è molto rapida, il pH di reazione deve essere tenuto al di sotto di 3,5 e con alcuni farmaci anche <1 per permettere la formazione delle particelle nanometriche. Terminata la polimerizzazione il pH viene riportato ai valori fisiologici.

Nanocapsule di poli(alchilcianoacrilato)

Il procedimento prevede una prima fase in cui il monomero di alchilcianoacrilato e il farmaco sono disciolti in una miscela di olio (Miglyol o benzilbenzoato) e solvente organico miscibile con acqua (acetone o etanolo). Questa soluzione viene quindi aggiunta lentamente e sotto agitazione, ad una soluzione acquosa di un idoneo emulsionante. Il solvente organico diffon-

de rapidamente nella fase acquosa trascinando con sé il monomero che polimerizza all'interfaccia, dando origine alla formazione di una membrana intorno alla fase oleosa (Figura 3).

Metodi che utilizzano polimeri già preformati [4]

L'utilizzo di polimeri preformati presenta molti vantaggi rispetto all'uso di quelli ottenuti per polimerizzazione di monomeri. Tra i vantaggi ricordiamo il fatto che i polimeri preformati presentano proprietà chimico-fisiche ben caratterizzate, standard di sicurezza e accettabilità, assenza di possibili residui di monomeri o reagenti di polimerizzazione (iniziatori o catalizzatori) e assenza di possibili reazioni tra farmaco e monomeri.

I polimeri maggiormente utilizzati in i poliesteri quali l'acido poli(lattico) (PLA) e l'acido poli(lattico-co-glicolico) (PLGA) il poli-ε-caprolattone, i derivati della cellulosa quali l'etil-cellulosa e la cellulosa acetato e polimeri naturali come la gelatina ed il sodio alginato.

In ogni caso, nanocapsule e nanosfere si preparano partendo da sistemi bifasici ottenuti per dispersione di un liquido o di un materiale solido in una fase disperdente liquida.

Nanosfere preparate da polimeri insolubili in acqua

Metodo dell'evaporazione del solvente [5]

Con questo metodo il farmaco (insolubile in acqua) ed il polimero vengono disciolti in un solvente organico immiscibile in acqua (cloruro di metilene) e la soluzione risultante è quindi omogeneizzata con una fase esterna acquosa mediante un omogeneizzatore ad alta pressione (Figura 4).

La diffusione del solvente nella fase esterna acquosa, seguita da evaporazione, determina la precipitazione del polimero insolubile in acqua sotto forma di nanoparticelle. Durante la precipitazione il polimero ingloba tra le sue maglie il farmaco.

Metodo della diffusione-evaporazione

Il metodo impiega, come fase organica, una miscela di cloruro di metilene ed acetone che viene aggiunta ad una soluzione acquosa [6-8]. La rapida e spontanea diffusione dell'acetone nella fase acquosa, causa un notevole abbassamento della tensione interfacciale tra la fase organica (cloruro di metilene) e fase acquosa con formazione di una nanoemulsione



Figura 3 - Meccanismo di formazione di nanocapsule mediante polimerizzazione interfacciale

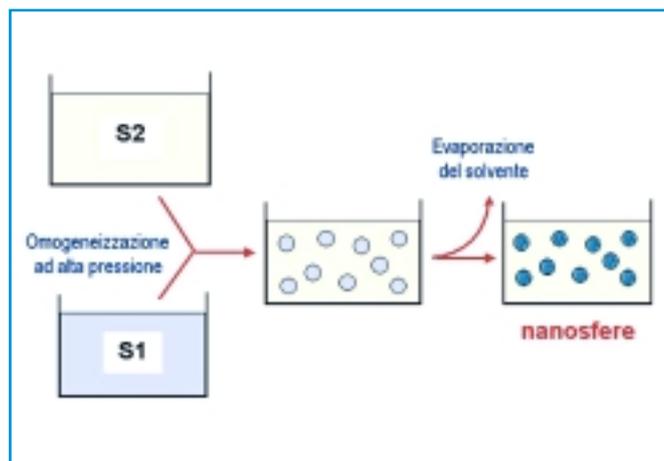


Figura 4 - Preparazione di nanosfere con il metodo della evaporazione di solvente. S1: soluzione organica di polimero e farmaco; S2 non-solvente per il polimero

senza dover ricorrere alla omogeneizzazione ad alta pressione. Il sistema così emulsionato viene tenuto sotto agitazione fino a completa evaporazione del cloruro di metilene. Il polimero venendo a contatto con la fase acquosa precipita dando origine a particelle sferiche, solide di dimensioni colloidali.

Nanocapsule preparate da polimeri insolubili in acqua [9]

Il polimero viene sciolto, insieme al farmaco, in una miscela di un solvente organico miscibile con l'acqua (acetone) e un olio che costituirà il nucleo centrale nelle nanocapsule. Questa fase organica viene emulsionata con la fase acquosa contenente un emulsionante: l'acetone, diffondendo spontaneamente nella fase acquosa, trasporta il polimero all'interfaccia dove, a contatto con l'acqua, precipita dando origine alla parete della capsula.

Nanosfere preparate da polimeri idrofili

In questo caso i polimeri utilizzati sono di origine naturale e le nanoparticelle sono preparate o mediante il metodo dell'emulsione A/O o con la tecnica della separazione di fase (coacervazione).

Metodo dell'emulsione A/O

Con tale metodo si possono preparare nanoparticelle di albumina (Figura 5). Una soluzione acquosa del polimero viene emulsionata con un olio e la risultante emulsione è sottoposta ad omogeneizzazione ad alta pressione o sonicazione per ridurre i globuli di fase dispersa a dimensioni nanometriche [2]. Per ottenere nanoparticelle insolubili l'emulsione viene aggiunta ad un olio ad una $T > 100^\circ\text{C}$ per denaturare il polimero (albumina), oppure si ricorre ad agenti reticolanti come le glutaraldeide. Questo metodo è ovviamente riservato a farmaci idrosolubili che possono essere aggiunti alla soluzione acquosa del polimero prima della formazione dell'emulsione, oppure possono essere adsorbiti sulla superficie delle nanosfere dopo loro separazione e purificazione.

Tecniche di separazione di fase

La separazione di fase o "coacervazione" di macromolecole solubili in acqua come la gelatina o albumina può essere indotta attraverso cambiamenti di pH, addizione di agenti desolvatanti come sali o solventi organici miscibili con acqua (eta-

nolo, isopropanolo). Il sistema generalmente deve essere sottoposto ad omogeneizzazione per ridurre le dimensioni delle particelle in formazione. La solidificazione di queste ultime avviene per reticolazione con aldeidi.

Nanoparticelle di alginato sono state preparate per aggiunta di CaCl_2 ad una soluzione di alginato di sodio. Il gel che si forma è quindi sottoposto a reticolazione con poli-L-lisina per formare nanosfere [10].

Nanocapsule preparate da polimeri idrofili

Nanocapsule di gelatina sono state preparate emulsionando una soluzione organica di farmaco con una soluzione acquosa di gelatina mediante sonicazione. Una soluzione di solfato di sodio viene aggiunta per indurre la deidratazione della gelatina e coacervazione intorno alle goccioline di cloroformio. Le pareti della capsula vengono solidificate con glutaraldeide.

Vie di somministrazione e distribuzione corporea

Le nanoparticelle, per la loro natura polimerica e per le ridotte dimensioni, rappresentano sistemi di veicolazione adatti per la maggior parte delle vie di somministrazione. Tuttavia, analogamente ad altri carrier colloidali (liposomi, niosomi, microemulsioni e micelle), una volta nel circolo sanguigno, esse vengono immediatamente riconosciute come "non-self" [11] e rimosse per fagocitosi da parte delle cellule del sistema reticolo-endoteliale (RES). Pertanto le nanoparticelle tendono ad accumularsi principalmente in alcuni organi: fegato (60-90% della dose iniettata), milza (2-10%), polmoni (3-20%) e midollo osseo ($>1\%$).

Per ridurre la rapida rimozione dal circolo sanguigno, sono stati legati chimicamente o adsorbiti sulla superficie delle particelle, particolari polimeri come i "Poloxameri" (copolimeri del polioossietilene e del polioossipropilene) in grado di ridurre notevolmente l'interazione con i componenti del siero e quindi il processo di opsonizzazione che favorisce l'*uptake* da parte delle cellule del sistema reticolo endoteliale [12].

Poiché il diametro dei capillari sanguigni più piccoli è di $4\ \mu\text{m}$ ne consegue che le particelle devono avere dimensioni minori di tale valore per poter essere iniettate nel circolo ematico senza problemi di ostruzione vasale. Inoltre, dimensioni colloidali sono desiderabili anche nella somministrazione sotto-



Figura 5 - Preparazione di nanosfere polimeriche mediante denaturazione termica

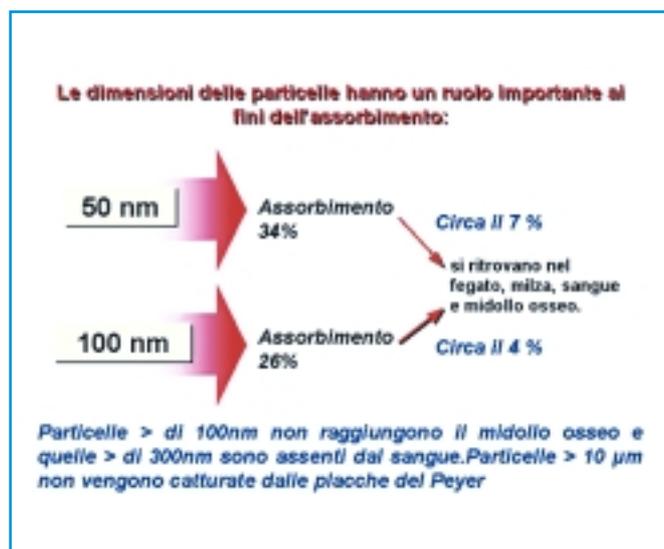


Figura 6 - Ruolo delle dimensioni particellari nella distribuzione tissutale dopo somministrazione orale delle nanoparticelle

cutanea e intramuscolare al fine di minimizzare possibili effetti irritanti nel punto d'inoculo.

Oltre che per via parenterale, le nanoparticelle possono essere somministrate anche topicamente, per esplicare effetti locali a livello cutaneo ed oculare, nonché per via orale [13]. In quest'ultimo caso, è ormai accertato che le nanoparticelle vengono assorbite dal tratto gastro-intestinale soprattutto attraverso le M cellule dei *noduli linfatici aggregati* o placche di Peyer, per esplicare la loro azione anche in altri distretti dell'organismo (Figura 6).

Caratterizzazione delle nanoparticelle

Come già detto precedentemente, la biodistribuzione delle nanoparticelle (e quindi la loro efficacia come carrier di farmaci) dipende da vari fattori quali le dimensioni e le caratteristiche superficiali.

Pertanto è estremamente importante effettuare un'attenta caratterizzazione delle particelle attraverso la valutazione delle dimensioni e della distribuzione di esse, la morfologia, la carica superficiale, il caricamento del farmaco e l'efficienza di inglobamento, il profilo di rilascio, lo stato chimico-fisico del farmaco e del polimero, il peso molecolare del polimero e la sua degradazione *in vitro*.

Applicazioni terapeutiche [14]

La maggior parte delle applicazioni terapeutiche delle nanoparticelle riguardano il direzionamento di farmaci nella chemioterapia antitumorale: l'elevata capacità endocitotica delle cellule tumorali è generalmente considerata la causa principale per spiegare il consistente *uptake* di nanoparticelle nonostante la barriera endoteliale dei vasi limiti la loro diffusione verso il tessuto malato.

Anche le infezioni intracellulari rappresentano un altro campo d'interesse per la veicolazione di farmaci mediante tali sistemi. Infatti, le infezioni intracellulari sono spesso difficili da trattare perché la maggior parte degli antibiotici non sono in grado di superare la membrana cellulare per diversi motivi: basso coefficiente di ripartizione olio/acqua, forte effetto di lega-

me delle proteine, gradiente di pH sfavorevole nei vari compartimenti cellulari e l'effetto del meccanismo di trasporto attivo che rimuove in continuazione il farmaco dalla sede di azione prevenendo il raggiungimento della concentrazione efficace di antibiotico all'interno della cellula infettata. Inoltre spesso, il pH acido lisosomiale riduce notevolmente l'attività dell'antibiotico.

L'uso di nanoparticelle rappresenta inoltre una promettente strategia per superare gli ostacoli relativi alla somministrazione orale di peptidi e proteine (tra cui i vaccini) i quali subiscono notoriamente una veloce degradazione idrolitica ed enzimatica nel tratto gastrointestinale e presentano inoltre notevoli difficoltà di assorbimento.

Recentemente le nanoparticelle polimeriche biodegradabili sono state proposte come alternativa ai liposomi nella veicolazione di oligonucleotidi nella terapia antisense e nella terapia genica come sistemi "carrier" in grado di determinare una localizzata espressione genica nel trattamento di patologie quali la restenosi.

Le nanoparticelle sono risultate particolarmente utili anche nella terapia oculare per superare i problemi legati alla ridotta penetrazione di farmaci negli strati più profondi della cornea e la loro rapida rimozione dalla superficie corneale.

Conclusioni

In conclusione, le nanoparticelle rappresentano dei sistemi con notevoli potenzialità applicative, essendo in grado di convertire sostanze attive poco solubili, poco assorbibili, biologicamente labili e poco selettive per l'area malata, in farmaci promettenti.

Per sviluppare dei sistemi ideali di rilascio, attraverso questo approccio, è tuttavia molto importante approfondire maggiormente le basi molecolari di interazione tra i sistemi biologici e tali vettori in modo da individuare i parametri che devono essere modulati per ottenere una veicolazione dei farmaci altamente sito-specifica.

Bibliografia

- [1] J. Kreuter, Nanoparticles, in Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter (Ed.), Marcel Dekker, New York, 1994, 219.
- [2] C. Vauthier-Holtzschler *et al.*, *Pharma Sci.*, 1991, **1**, 109.
- [3] P. Couvreur, C. Vauthier, *J. Control. Rel.*, 1991, **17**, 187.
- [4] R. Bodmeier, P. Maincent, Polymeric Dispersions as Drug Carriers, in Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, H.A. Lieberman *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, Inc. 87, 1998.
- [5] R. Bodmeier, H. Chen, *J. Controlled Rel.*, 1990, **12**, 223.
- [6] T. Niwa *et al.*, *J. Controlled Rel.*, 1993, **25**, 89.
- [7] T. Niwa *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1994, **83**, 727.
- [8] H. Murakami *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 1997, **149**, 43.
- [9] N. Ammoury *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1990, **79**, 763.
- [10] M. Rajanorivony *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1993, **82**, 912.
- [11] S.S. Davis *et al.*, *J. Controlled Rel.*, 1993, **24**, 157.
- [12] R. Gref *et al.*, Poly(Ethylene Glycol)-coated Biodegradable Nanospheres for Intravenous Drug Administration, in Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines, S. Cohen, H. Bernstein (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1996.
- [13] T. Jung *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2000, **50**, 147.
- [14] P. Couvreur *et al.*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1995, **41**, 2.