

# Le formulazioni

## Applicazioni farmaceutiche

di Giuseppe Bottoni

La formulazione farmaceutica è quella fase dello sviluppo del farmaco che si occupa della trasformazione del principio attivo in una forma idonea alla somministrazione, permettendo così lo svolgimento dell'azione terapeutica. Lo studio formulativo è risultato in grado di migliorare le caratteristiche del farmaco, modulandone il rilascio nel tempo, permettendogli di raggiungere in modo specifico il sito bersaglio, limitando così gli effetti collaterali sistemici. Gli sviluppi più recenti, ancora in fase sperimentale, permetterebbero di dosare il farmaco sulla base delle necessità dell'organismo.



**N**ell'ambito del processo multidisciplinare di sviluppo di un farmaco, la tecnologia farmaceutica occupa una posizione di rilievo, interessandosi alla trasformazione dal principio attivo, inteso come entità molecolare pura, in una forma idonea in termini di dosaggio e modalità di uso alla somministrazione nell'uomo o nell'animale. Per molti anni, e in parte ancora oggi, tale disciplina ha avuto un'impronta prevalentemente "tecnologica" con minori caratteristiche inventive rispetto alle fasi di sintesi e di farmacologia che la precedono nel suddetto sviluppo. La realizzazione di una nuova forma farmaceutica comprende principalmente la scelta delle sostanze eccipienti che verranno a costituire, insieme al principio attivo, la composizione finale del prodotto. Gli eccipienti svolgono molteplici ruoli all'interno della formulazione. Sono infatti:

- stabilizzanti, permettendo così la protezione del principio attivo dall'ossidazione o dall'interazione negativa con alcuni ioni di metalli pesanti mediante chelazione di questi ultimi;
- diluenti, consentendo di disporre di una massa di volume e caratteristiche tali da permetterne la lavorabilità in macchine compresse e in capsulatrici industriali e garantendo omogeneità di distribuzione del principio attivo nelle singole dosi;
- leganti, favorendo un'adeguata adesione delle polveri quando è necessario un processo di granulazione;
- lubrificanti, permettendo una buona scorrevolezza all'interno degli organi meccanici di apparecchiature industriali in grado di processare decine di migliaia di unità di dosi/ora;
- disgreganti, assicurando la dispersione del prodotto all'interno del tratto gastrointestinale come indispensabile presupposto alla successiva fase di assorbimento.

Eccipienti edulcoranti, aromatizzanti e coloranti migliorano e favoriscono l'accettabilità del prodotto da parte del paziente, presupposto indispensabile per una corretta terapia. In anni più recenti la tecnologia farmaceutica non ha certamente ab-

bandonato il compito "storico" descritto ma ha acquisito, in modo sempre più ampio, altre finalità che non si limitano al "confezionamento" del principio attivo ma ne modulano, migliorano o potenziano le caratteristiche. I prodotti originati da tale applicazione più sofisticata e creativa della tecnologia farmaceutica sono i sistemi a rilascio controllato del farmaco (Controlled Release Drug Delivery Systems, DDS).

### DDS

Lo scopo di ogni sistema a rilascio controllato è quello di fornire la quantità terapeutica di farmaco nel sito appropriato dell'organismo in modo da raggiungere quanto prima la concentrazione terapeutica e di mantenerla per il desiderato periodo di trattamento. Il sistema ideale ha quindi un duplice obiettivo: la modulazione del rilascio del principio attivo e la localizzazione del medesimo ("targeting") quanto più specificamente in prossimità del sito d'azione. Le tecnologie disponibili attualmente permettono il raggiungimento solo parziale di questi obiettivi. Infatti mentre sono state sviluppate diverse metodiche in grado di modulare, in maniera sempre più raffinata e prevedibile, il rilascio del farmaco, un reale "targeting" al sito d'azione è ancora in fase sperimentale a causa delle numerose barriere che si frappongono fra il sito di somministrazione ed il recettore.

La consapevolezza però che il valore aggiunto conferibile al farmaco con il raggiungimento contemporaneo di entrambi gli obiettivi può essere più vantaggioso, e meno oneroso in termini di investimenti, dell'identificazione di una nuova entità molecolare ha giustificato il notevolissimo sviluppo recente dei DDS. Inoltre negli anni più recenti l'avvento dell'ingegneria genetica ha originato il proliferare di nuovi principi attivi, essenzialmente polipeptidi, proteine e polinucleotidi, aventi caratteristiche chimico fisiche peculiari rispetto alle entità molecolari più tradizionali (Tabella 1). La formulazione di tali sostanze com-

G. Bottoni, Italfarmaco - Milano. G.BOTTONI@italfarmaco.com

porta un approccio sostanzialmente innovativo a causa di numerose limitazioni alla loro somministrazione. Risultano infatti inattive se somministrate oralmente e sono instabili nei fluidi biologici a causa della degradazione idrolitica. Molte proteine in soluzioni concentrate e a contatto con matrici idrofobiche si deteriorano facilmente. Per tali sostanze la formulazione DDS rappresenta spesso non un'opzione ma una tecnologia indispensabile per un utilizzo terapeutico.

L'approccio formulativo che prevede la realizzazione di DDS si è posto, con l'individuazione di tecnologie sempre più sofisticate, obiettivi sempre più ambiziosi. Nel cosiddetto "delayed release" il rilascio della molecola è rallentato rispetto alla formulazione tradizionale ma senza un controllo della velocità di rilascio. Il vantaggio risiede principalmente nel miglioramento dell'accettabilità da parte del paziente, grazie alla diminuzione del numero di somministrazioni giornaliere. Nel rilascio sostenuto a velocità programmata si mantengono costanti i livelli plasmatici minimizzando gli effetti collaterali causati dalle flut-

se non esiste un vero e proprio controllo; il rilascio del principio attivo è semplicemente rallentato dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'intorno. I sistemi "depot", che consentono un rilascio controllato per il periodo desiderato, si basano essenzialmente sull'impiego di materiali polimerici bioerodibili. Alcuni farmaci con queste caratteristiche sono da anni di ampio ed assodato uso clinico. La modulazione del rilascio può essere anche ottenuta con dispositivi ("devices") costituiti da materiali polimerici non biodegradabili che vengono impiantati nell'organismo e che sono in grado di rilasciare il farmaco per periodi molto lunghi, fino ad alcuni anni. I sistemi "targeting" rappresentano il futuro dei sistemi parenterali a rilascio controllato. Le problematiche relative a questo tipo di DDS non ha ancora consentito il loro pieno sviluppo commerciale, mentre numerosissima è la sperimentazione in corso. Un parziale obiettivo per quanto riguarda il targeting è stato raggiunto mediante le formulazioni liposomiali. I liposomi, una volta iniettati hanno particolare affinità, come si vedrà di seguito, per il sistema reticoloendoteliale.

**Tabella 1 - Farmaci di derivazione proteica già presenti sul mercato (M) o in fase di sviluppo\***

Prodotto	Classe biologica	Società	Uso	Stato
Nutropin Depot	Ormone	Alkermes/Genentech	Deficienza pediatrica dell'ormone della crescita	M
Roferon-A	Interferone	Roche	Leucemia, Epatite C	M
Proleukin	Citochina	Chiron	Carcinoma renale, melanoma metastatico	M
PEG-Intron	Interferone PEG	Schering-Plough	Leucemia, melanoma, tumori solidi, epatite C	M
Pegasys	Interferone PEG	Roche	Epatite B e C	M
HumulinrhInsulin	Citochina/ormone	Eli Lilly Inhale		M
Insulin		Pfizer	Diabete	Fase III
Tenovil	Interleuchina	Schering-Plough	Artrite reumatoide, morbo di Crohn, psoriasi	Fase I
Axokine	Citochina	Regeron Pharmaceuticals	Obesità	Fase III
Bone Morphogenic Protein-2 (BMP-2)	Citochina	Wyeth-Ayerst	Riparazione del tessuto e dell'osso	Fase III

\* da Business Briefing Pharmatec 2002, edito da World Market Research Center

tuazioni originate dalle forme di somministrazione tradizionale (Figura 1). Nell'azione localizzata il sistema a rilascio controllato viene localizzato in prossimità dell'organo o del tessuto ammalato. Nel cosiddetto "DDS targeted" il principio attivo, veicolato mediante trasportatori ("carrier"), è in grado di agire su un particolare tipo di cellule. Nei DDS autoregolati ("triggered systems") la quantità di farmaco rilasciata al sito d'azione è determinata dalle necessità fisiologiche dell'organismo.

L'universo dei DDS è diventato perciò così ampio che una loro trattazione in forma completa richiederebbe una pubblicazione di ampia dimensione. Ho deciso perciò di limitarmi a dare una visione più approfondita dei sistemi utilizzati per il rilascio controllato di formulazioni parenterali; esse rappresentano, a mio parere, la parte più difficile della tecnologia farmaceutica in quanto gli stretti requisiti microbiologici e tossicologici legati a questa particolare via di somministrazione comportano una limitazione notevole per quanto riguarda la scelta dei materiali e dei processi utilizzabili. Tecnicamente tali sistemi possono essere raggruppati in tre grandi gruppi, ognuno dei quali comprende una varietà di situazioni. Nei sistemi a rilascio controllato "tradizionali", ottenuti mediante sospensioni o soluzioni oleo-

### Sistemi "tradizionali"

I sistemi tradizionali per controllare il rilascio da formulazioni parenterali intramuscolari sono costituiti essenzialmente dall'utilizzo di sospensioni o di veicoli oleosi.

Nelle sospensioni acquose la fase limitante la velocità di cessione del farmaco è la sua velocità di dissoluzione. I parametri che controllano ciò sono quindi l'area superficiale, il coefficiente di diffusione e la solubilità, fino alla saturazione, del farmaco. Nelle formulazioni si ha una possibilità limitata di variare tali parametri: operando sulle dimensioni delle particelle di principio attivo disperse (par-

ticle size), operando cioè sull'area superficiale, o alterando la viscosità del mezzo, variando quindi il coefficiente di diffusione. È possibile anche alterare la solubilità del farmaco attraverso la realizzazione di sali o sfruttando l'esistenza di polimorfi. Il rilascio della penicillina, ad esempio, viene rallentato attraverso salificazione con la N,N dibenziletildiammina. Utilizzando tale sale, dopo una somministrazione intramuscolare (i.m.), il tasso ematico sale nelle prime 12 ore, si mantiene costante per altre 24 ore e scende al di sotto del valore minimo efficace solo dopo 10 giorni. L'insulina normale esplica la sua durata d'azione entro al massimo di 1 ora dopo somministrazione i.m. e scompare totalmente dopo 10 ore, costringendo così a ripetute iniezioni giornaliere. In presenza di cloruro di zinco, in funzione del pH, l'insulina precipita come forma cristallina od amorfa. La forma cristallina è denominata "insulina ultralenta" in quanto viene assorbita ed esplica attività terapeutica nell'arco di 36 ore; la forma amorfa viene assorbita più rapidamente e manifesta attività per ca. 12 ore. Nei sistemi "tradizionali" basati su iniezione i. m di soluzioni o sospensioni oleose la durata d'azione di un farmaco è superiore a quella del medesimo principio attivo iniettato mediante una soluzione acquosa.

Dal momento che la quantità di farmaco ceduta dalla soluzione oleosa alla biofase acquosa è determinata dal coefficiente apparente di partizione O/A, solo la frazione sciolta nell'acqua (f) può essere assorbita, secondo l'equazione

$$f = (1+\alpha)/(1+k\alpha)$$

dove  $\alpha$  è il rapporto tra il volume della fase oleosa e quello della fase acquosa e k è il coefficiente apparente di partizione O/A. La velocità di assorbimento del farmaco è descritta dall'equazione

$$d(C)/dt = kf(Ft)$$

dove Ft è la concentrazione totale del farmaco nelle 2 fasi. La viscosità dell'olio è un ulteriore parametro in quanto essa modula la diffusione del principio attivo. Nelle sospensioni oleose la situazione risulta ancor più complessa in quanto il farmaco deve prima sciogliersi e poi essere ripartito tra l'olio e la biofase acquosa.

### Sistemi "depot"

Questi DDS vengono impiantati od iniettati nel tessuto muscolare o sottocutaneo e rilasciano il farmaco incorporato in maniera controllata, permettendone la diffusione per periodi che possono variare da alcuni giorni a mesi. Un rilascio continuato ha lo scopo di ottenere livelli plasmatici costanti in modo da simulare l'effetto di un'infusione continua senza la necessità di ospedalizzazione. L'utilizzo più tipico a questo riguardo è la terapia ormonale sostitutiva.

Oltre ad un rilascio sistemico l'impianto può essere anche in grado di fornire una somministrazione localizzata, se situato in prossimità del tessuto che necessita dell'intervento terapeutico. Esempi di questo approccio, ancora sperimentale, sono impianti intracranici costituiti da desametazone in un copolimero di etilene-vinil acetato, che garantiscono alti livelli locali del farmaco senza un corrispondente sovradosaggio sistemico del corticosteroide. Impianti oftalmici a livello sclerale di ganciclovir in un copolimero di acido lattico-glicolico sono riusciti a garantire livelli terapeutici dell'attivo nell'umor vitreo per il trattamento dell'infezione da citomegalovirus [1].

I sistemi "depot", nel loro aspetto maggiormente sviluppato al livello commerciale, possono essere distinti in impianti o microparticelle sulla base della loro geometria. Gli impianti sono generalmente dei piccoli cilindri che vengono inseriti nel sottocute con l'ausilio di un grosso ago. Le microparticelle hanno forma sferica e una dimensione inferiore ai 100  $\mu\text{m}$  per consentire l'iniezione con una siringa convenzionale. Le microparticelle possono essere suddivise in microcapsule o microsfeere a seconda che il farmaco sia contenuto in un serbatoio ("reservoir") circondato da materiale polimerico o sia molecolarmente disperso in una matrice. In entrambi i casi è il materiale polimerico che ne controlla il rilascio [2]. Il polimero più frequentemente studiato ed utilizzato è un poliestere di acido lattico ed acido glicolico. Il rapporto tra i due monomeri e il peso molecolare influenza la velocità di degradazione. Anche il processo di preparazione e la granulometria del prodotto influenzano il profilo di rilascio ottenibile. La degradazione del polimero avviene per rottura idrolitica non-enzimatica del legame estereo. Bisogna considerare che tale degradazione ha come effetto la diminuzione del peso molecolare del polimero con esposizione dei gruppi idrossilici e abbassamento del valore del pH; ciò può avere numerose influenze, quali ad esempio una diminuita

compatibilità tissutale, un'alterata cinetica di rilascio ed una minore stabilità del principio attivo. La cinetica di rilascio dai polimeri bioerodibili non è facilmente prevedibile sulla base di una trattazione matematica generale, anche se esiste numerosa letteratura a riguardo, a causa delle numerose variabili dovute ai materiali, alla geometria del dispositivo, alle dimensioni delle particelle, alle caratteristiche chimico-fisiche del principio attivo ed alle interazioni tra polimero e farmaco disperso. In generale il rilascio è influenzato da due fenomeni. In una fase iniziale l'acqua penetra attraverso le porosità del polimero sciogliendo il farmaco che attraverso gli stessi canali raggiunge la superficie. Questo fenomeno provoca un rilascio non controllato, detto "burst", del principio attivo.

In una seconda fase il fenomeno predominante è la degradazione del polimero la cui cinetica è il vero motore del rilascio del farmaco. L'applicazione più nota del concetto di polimero bioerodibile in forma di microsfeere è quello sviluppato dalla ditta giapponese Takeda con la realizzazione, a partire dal 1980 ed

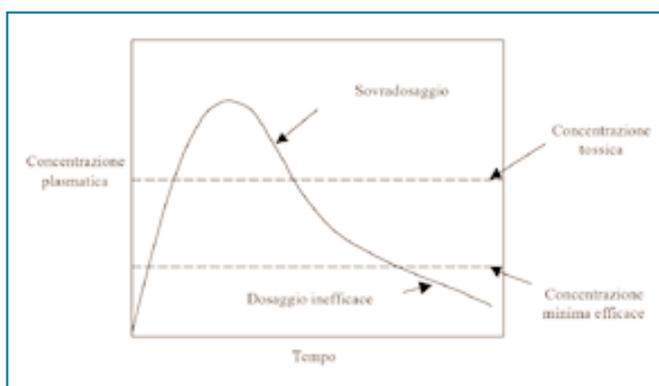


Figura 1 - Andamento dei livelli plasmatici dopo somministrazione convenzionale di un farmaco (da R.W. Baker, *Controlled Release of Biologically Active Agents*, Wiley, 1987)

il definitivo lancio nel 1989 negli Usa di una formulazione iniettabile ad 1 mese di leuprolide; tale farmaco è un agonista di LHRH ed ha effetto, per somministrazione ripetuta, di inibire il rilascio di testosterone: l'utilizzo principale è il controllo del tumore della prostata, ormono dipendente. Le microsfeere sono state realizzate, dopo un lungo studio formulativo, utilizzando un copolimero poli DL lattico glicolico (75-25) con un peso molecolare medio di 14.000 Da. Il processo proprietario di Takeda prevede schematicamente le seguenti fasi: a) dissoluzione del farmaco in soluzione acquosa; b) dissoluzione del polimero in diclorometano; c) aggiunta della fase oleosa alla fase acquosa mediante omogeneizzatore in modo da ottenere un'emulsione acqua/olio (w/o) microfine; d) aggiunta dell'emulsione w/o ad una soluzione acquosa di alcol polivinilico (PVA) in modo da formare un'emulsione w/o/w; e) evaporazione del diclorometano ottenendo una sospensione di microsfeere che vengono separate per liofilizzazione [3]. Takeda ha in seguito realizzato una formulazione a 3 mesi utilizzando un omopolimero di acido lattico (PLA) con un peso molecolare medio tra 15.000 e 16.000 Da come matrice polimerica [4].

Oltre al controllo dei livelli ormonali sopra descritto il settore antitumorale è quello che ha visto il maggior numero di applicazioni. Cito un paio di esempi. Microcapsule di aclarubicina, un'antraciclina solubile in cloruro di metilene, sono state preparate con il polilattato per evaporazione del solvente da una soluzione omogenea principio attivo/polimero. Uno studio su 62

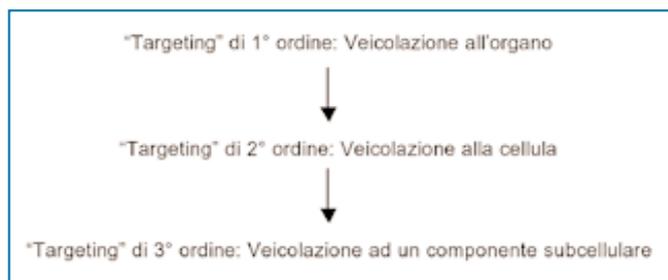


Figura 2 - Livelli crescenti di "targeting" (da [2], 2, 408)

pazienti affetti da carcinoma epatocellulare ha fatto osservare dopo un trattamento semestrale una sostanziale riduzione della dimensione del tumore. In un ulteriore studio microcapsule di polilattato-doxorubicina sono state somministrate intraperitonealmente a 6 pazienti affetti da effusione pleurica maligna ottenendo un rilascio controllato per un periodo di 2 settimane [2]. Controlli del rilascio più a lungo termine richiedono meccanismi e materiali diversi: per queste applicazioni sono stati progettati dispositivi costituiti da materiale polimerico non bioerodibile che vengono inseriti in cavità dell'organismo o impiantati con una procedura chirurgica minimamente invasiva. L'applicazione maggiore di questo tipo di impianti è quella contraccettiva a lungo termine: l'esempio maggiore a riguardo è Norplant [5]. Questo sistema è costituito da 6 capsule di Sylastic (copolimero di dimetilsilossano/metilvinilsilossano) ognuna delle quali contenenti 36 mg di Levonorgestrel.

Le capsule sono sterili e vengono inserite chirurgicamente sotto la cute del braccio o forniscono un'azione contraccettiva per 5 anni al termine del quale il sistema deve essere rimosso. Recentemente è stato sviluppato un sistema di 2° generazione: Norplant II costituito da 2 cilindri di Sylastic all'interno dei quali il principio attivo è disperso omogeneamente. Per la realizzazione di sistemi contraccettivi a rilascio controllato mediante l'utilizzo di polimeri bioerodibili è stato sviluppato un prodotto denominato Capronor II. Esso è costituito da 2 cilindri di caprolattone ognuno contenente 18 mg di Levonorgestrel; un prodotto più recente è Capronor III, costituito da una sola capsula di un copolimero (caprolattone e trimetilcarbonato) riempita con 32 mg di Levonorgestrel [6]. Questi sistemi hanno il vantaggio di non necessitare della rimozione chirurgica ma di degradarsi spontaneamente nel corso del periodo di utilizzo.

#### Targeted Delivery Systems

Proseguendo gradualmente nella ricerca di meccanismi sempre più sofisticati con l'obiettivo di una maggiore efficacia terapeutica si è passati dal rilascio controllato ad un rilascio "indirizzato" specificamente nel sito d'azione. L'obiettivo del "targeting" è stato ricercato con numerosi approcci sperimentali fra i quali hanno particolare rilevanza i sistemi microparticolati ed i sistemi immunoconiugati. I sistemi microparticolati, riportati in letteratura, sono soprattutto liposomi e microcapsule.

Dei sistemi liposomiali si è già ampiamente trattato su *La Chimica e l'Industria* [7] e pertanto non verranno trattati in dettaglio qui. Sottolineo che il vantaggio principale dei sistemi liposomiali è costituito dal fatto che utilizzano materiali biocompatibili, che già fanno parte dell'organismo. In confronto ai sistemi lipidici la preparazione di microcapsule polimeriche può essere considerata relativamente più semplice sulla base dell'ampissimo bagaglio tecnologico relativo ad applicazioni non farmaceutiche.

La capacità di incorporazione del principio attivo è inoltre maggiore. Tuttavia una notevole limitazione al loro impiego è legata al fatto che i materiali usati per la realizzazione di tali prodotti devono essere non tossici, biocompatibili, biodegradabili e non immunogenici. Il "targeting", che di per sé rappresenta un ulteriore perfezionamento dei sistemi a rilascio controllato fino ad ora descritti, si pone obiettivi gradualmente più ambiziosi e di crescente difficoltà come riportato nella Figura 2.

#### Realizzazione del targeting

Il meccanismo mediante il quale può essere realizzato il "targeting" è generalmente definito come attivo o passivo; quest'ultimo sfrutta i meccanismi biologici di assorbimento dell'organismo mentre quello attivo è il risultato di una veicolazione della molecola verso l'obiettivo desiderato, mediante l'utilizzo di un agente biochimico o di un sistema esterno.

Più realisticamente i due meccanismi si sovrappongono e una classificazione più pratica del "targeting" può essere la seguente: quello controllato attraverso le dimensioni, quello fisico e quello guidato attraverso modifiche superficiali del sistema di trasporto ("carrier"). In certi casi la sola scelta delle dimensioni delle particelle di un DDS può indirizzare la veicolazione del medesimo verso un specifico tessuto od organo ("targeting" controllato dalle dimensioni). Ad esempio, è stato dimostrato che dopo somministrazione i.v. particelle maggiori di 5 µm sono completamente intrappolate nei polmoni per un semplice processo di filtrazione da parte dei capillari. Particelle inferiori a 3 µm vengono invece catturate principalmente nel fegato e nella milza per captazione da parte dei macrofagi del sistema reticolo-endoteliale (RES). Questo comportamento è indipendente dalla natura chimica della microparticella. Particelle molto più piccole, inferiori a 50 nm possono evitare il RES passando attraverso fessure della rete capillare di certi tessuti come fegato, rene, milza, intestino, pancreas. Un problema delle particelle di tali dimensioni è che, a meno di modifiche della superficie tendono a formare aggregati *in vivo* ricadendo nel comportamento descritto per le particelle più grosse.

La situazione descritta, mentre rappresenta un mezzo relativamente semplice per veicolare farmaci verso il RES, è una seria limitazione quando l'obiettivo è un organo diverso. Tentativi sono stati fatti saturando il RES, ed in particolare le cellule di Kupfer, con un eccesso di microparticelle. Il risultato è stato però variabile in funzione del materiale utilizzato. La saturazione di tali cellule

Tabella 2 - Distribuzione corporea (% della dose) dell'attività di <sup>125</sup>I, sotto differenti campi magnetici (Oersted, Oe)\*

Organo	Controllo	4.000 Oe	6.000 Oe	8.000 Oe
Fegato	80	78	63	39
Milza	6	5	5	4
Polmoni	12,5	11,5	12	11,5
Cuore	<1	<1	<1	<1
Rene	<1	<1	<1	<1
Coda (segmento 1)	0	0	0	0
Coda (segmento 2)	0	0	2	1,5
Coda (segmento 3)	0	1,5	17,5	51
Coda (segmento 4)	0	0	0	1
Totale (ca.)	100,5	98	101,5	110

\* 30 min. dopo somministrazione i.v. di nanoparticelle magnetiche di <sup>125</sup>I-albumina (0,2-2,0 µm) in ratti (n=2), Da [2], 2, 418)

da parte di liposomi carichi dura 24 ore, mentre particelle di polistirene usate per la saturazione prima della successiva somministrazione di farmaci in forma liposomiale non sono risultate efficaci. La veicolazione esterna del "targeting" implica l'utilizzo di impianti che guidano le microparticelle verso l'obiettivo desiderato attraverso un campo elettrico, magnetico o termico esterno ("targeting fisico"). In Tabella 2 è riportato il comportamento di microsfele di albumina contenenti doxorubicina e magnetite [8]. Aumentando l'intensità del campo magnetico è possibile indirizzare le microparticelle in modo diverso rispetto all'obiettivo fisiologico rappresentato dal fegato. La limitazione di questi sistemi è rappresentata dalla possibilità di bersagliare solo gli organi che possono essere sottoposti in modo specifico ad un campo elettrico, magnetico o termico esterno. Inoltre bisogna tenere conto anche della possibile tossicità di tali sistemi di radiazione.

#### I carrier

La modificazione della superficie delle microparticelle con molecole in grado di riconoscere specificamente determinati tessuti o cellule è certamente la strada più promettente per realizzare un "targeting" efficace ("targeting" guidato attraverso modifiche superficiali del sistema di trasporto).

Le molecole "carrier" di prima scelta sono gli anticorpi monoclonali; inoltre è noto che lecitina, glicoproteine, zuccheri ed oligosaccaridi hanno affinità selettiva per la superficie cellulare. I primi tentativi di modifica della superficie di micro e nanoparticelle con anticorpi monoclonali, mentre hanno fornito risultati promettenti *in vitro*, si sono dimostrati deludenti *in vivo*; questo perché le particelle, una volta introdotte nel flusso sanguigno vengono catturate dal RES prima che possano interagire con l'obiettivo cellulare. Ciò ha portato ad una complicazione del problema ponendo la necessità di un preventivo ed ulteriore trattamento della superficie delle microsfele per impedirne il preassorbimento ("uptake") da parte dei macrofagi. Un modello semplificato di struttura ideale, ipotizzato per pervenire allo scopo descritto, è riportato nella Figura 3. Tale struttura, definita MHD ("macromolecular homing device") comprende tre distinti elementi:

- uno scheletro polimerico di carattere idrofobico, che consente l'adesione alle microparticelle ("link site");
- catene laterali di polietilenglicole (PEG) che, come è stato visto negli studi effettuati sui liposomi, limitano l'assorbimento da parte del RES e prolungano il tempo di circolazione nel sangue del prodotto ("hosting pad");

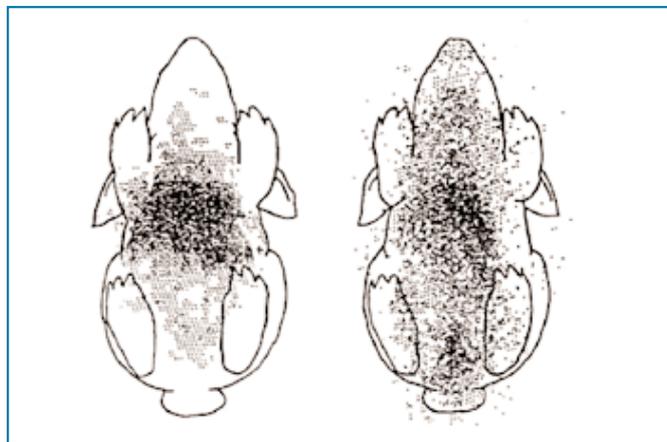


Figura 4 - Il coniglio sulla sinistra è stato trattato con particelle non rivestite mentre il coniglio sulla destra è stato trattato con particelle rivestite con il sistema MHD (da [2], 2, 427)

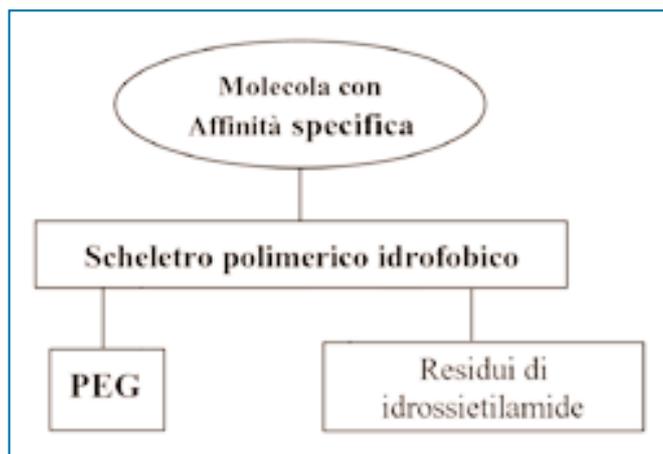


Figura 3 - Modello semplificato di struttura ideale (da [2], 2, 427)

- gruppi di idrossietilamide che servono a bilanciare complessivamente il rapporto tra idrofilia e lipofilia della molecola ("structural tune");
- molecola con affinità specifica verso l'organo bersaglio, in grado di indirizzare la microparticella nel tessuto o nella cellula desiderati ("affinity ligand").

È stato effettuato un esperimento somministrando *in vivo* nel ratto particelle polimeriche di polistirene rivestite e non con il sistema descritto. Sono state somministrate nanoparticelle di polistirene rivestite con 4 copolimeri nei quali era stato variato il rapporto tra le catene di polietilenglicole ed i gruppi idrossietilamidici. Le microparticelle erano marcate con  $^{131}\text{I}$  per osservarne la distribuzione mediante  $\gamma$  scintigrafia. Nella Figura 4 è osservabile la distribuzione della radioattività in conigli a cui sono state somministrate i.v. particelle rivestite o meno con il polimero descritto. Si può notare come la distribuzione della radioattività, concentrata nel fegato per quanto riguarda le particelle non-rivestite, è distribuita in modo molto più omogeneo nell'animale a cui sono state somministrate le particelle rivestite.

Tuttavia, dopo 8 giorni dalla somministrazione, la concentrazione delle particelle nel fegato tende a diventare identica nei due gruppi di animali. La ragione di ciò può essere imputata probabilmente ad una progressiva perdita del rivestimento da parte delle particelle circolanti e dal loro successivo assorbimento da parte del RES. Risultati simili sono stati ottenuti anche utilizzando particelle rivestite con copolimeri di polietilene e polipropilene (poloxamers). L'individuazione di un sistema microparticellare con un "targeting" efficace nel tempo richiederebbe l'approfondimento dei meccanismi coinvolti nell'interazione tra particelle ed i meccanismi di difesa biologici.

#### Gli anticorpi monoclonali

Una parte significativa degli studi nel settore del "targeting" è indirizzata alla possibilità di legare direttamente anticorpi monoclonali a sostanze farmacologicamente attive (sistemi coniugati farmaco-anticorpo) in modo da indirizzare il farmaco direttamente al sito di azione. I farmaci utilizzati in questi studi sono in primo luogo gli antitumorali, con l'intendimento di sfruttare l'interazione anticorpo-antigene specifica per alcuni ceppi cellulari tumorali [9]. I problemi connessi alla realizzazione ed efficacia di immunconiugati sono molteplici. È necessario in primo luogo garantire che la sostanza attiva raggiunga il sito d'azione, superando le numerose barriere che si sovrappongono. Almeno due componenti devono essere considerate fondamentali: la farmacocinetica

ca dell'immunoglobulina (alterata dal suo legame con il farmaco) e il rilascio della parte attiva a livello cellulare. La distribuzione, dopo somministrazione i.v., dell'anticorpo è molto lenta, raggiungendo il massimo in diversi giorni. L'accumulo a livello tumorale può essere favorito dalla notevole vascolarizzazione del tessuto ed in alcuni casi, della maggiore permeabilità di tali vasi con conseguente possibilità per la parte attiva di raggiungere il compartimento extracellulare. L'assorbimento da parte delle cellule avviene soprattutto per endocitosi. Il secondo problema da affrontare è quindi il distacco del farmaco dalla componente anticorpale. Questo dipende ovviamente dal tipo di legame esistente tra principio attivo ed anticorpo.

Distinguiamo i seguenti casi: a) il legame farmaco-anticorpo è scindibile con un processo aspecifico, tipo idrolisi o dissociazione; lo svantaggio di questo tipo di legame è la sua aspecificità e il fatto che in parte avviene non in prossimità del sito di azione perdendo così parzialmente l'obiettivo del "targeting"; b) il legame farmaco-anticorpo si rompe a livello extracellulare; si sfruttano a tale scopo legami labili in ambiente acido sulla base della

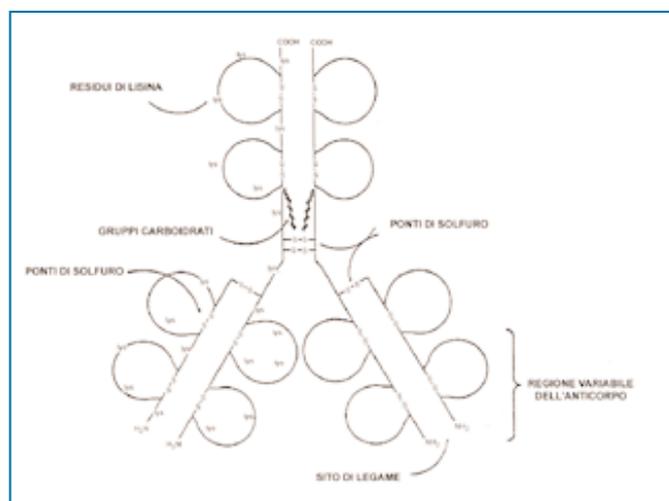


Figura 5 - Struttura dell'anticorpo (da [8], 178)

maggior acidità del tessuto tumorale; c) il legame farmaco anticorpo è scindibile a livello intracellulare; in tal caso il legame deve essere in grado di essere scisso dall'azione degli enzimi lisosomiali. Sulla struttura anticorpale (Figura 5) esistono diversi siti idonei a formare il legame con il farmaco: a) i gruppi ε amminici dei residui di lisina; b) i residui zuccherini; c) i legami disolfurici S-S- situati nella parte interna dell'anticorpo.

#### Spacer

Il farmaco può essere legato direttamente all'anticorpo o attraverso una terza molecola che fa da spaziatore ("spacer"). Il più delle volte si preferisce questa seconda opzione che sembra avere maggiori probabilità di mantenere inalterate le caratteristiche sia dell'anticorpo che del farmaco; infatti in esperimenti *in vivo* su immunoconiugati del farmaco antitumorale metotressato, ottenuti mediante legame estereo diretto, si è osservato il rilascio di una minima percentuale di principio attivo libero e di diversi derivati amminoacidici con scarsa attività farmacologica. Gli spaziatori più interessanti sono quelli studiati in maniera tale da subire degradazione lisosomiale portando quindi il farmaco sul bersaglio a livello intracellulare. Sono stati individuati, a questo scopo, sistemi oligopeptidici costituiti da 3 o 4 amminoacidi; un immunoconiugato costituito da daunomicina ed albumina at-

traverso uno spaziatore tetrapeptidico (Ala-Leu-Ala-Leu) è in grado di rilasciare il 75% del farmaco in 8 ore mentre è stabile nel siero in assenza di attività enzimatica specifica.

#### DDS "triggered" e sviluppi futuri

I DDS sono stati studiati per superare le limitazioni delle forme farmaceutiche tradizionali. Numerosi sviluppi sono stati già fatti ma l'attività di ricerca e miglioramento continua in questa direzione. Ulteriori studi sono poi necessari per migliorare il trattamento delle malattie per le quali è necessaria la somministrazione del farmaco in risposta a determinati bisogni metabolici dell'organismo o in presenza di specifiche biomolecole.

L'ideale è perciò un sistema che riesca a percepire un segnale causato dalla malattia, valutandolo anche in maniera quantitativa e fornendo quindi una risposta farmacologica adeguata. Gli idrogeli stanno rappresentando una classe di molecole estremamente promettente da questo punto di vista [10]. Essi infatti possono cambiare la loro struttura attraverso modifiche di volume o transizioni sol/gel in funzione di uno stimolo esterno. Questo tipo di sostanze vengono definiti "smart hydrogels".

Gli stimoli fisici a cui possono essere sensibili sono la temperatura, i campi elettrici, il pH, la luce e la pressione. Particolarmente interessanti sono gli idrogeli creati in modo da essere sensibili a determinate sostanze, per esempio il glucosio, al fine di ottenere nel diabetico un rilascio di insulina modulato dalle esigenze dell'organismo. L'applicazione pratica di tali sistemi è però ancora piuttosto lontana dallo sviluppo clinico per una serie di motivi. In primo luogo il tempo di risposta dei gel agli stimoli provenienti dall'organismo è ancora troppo lento.

E inoltre indispensabile la biocompatibilità mentre molti di essi, pur avendo delle ottime caratteristiche in termini di specificità di risposta allo stimolo non sono biodegradabili. Per questo motivo è importante la continua sintesi di nuovi materiali idonei allo scopo. Lo sviluppo dei DDS, nonostante la crescita esponenziale della ricerca in questi ultimi anni, è ben lontano dall'esprimere la massima potenzialità. Il controllo del rilascio in funzione delle esigenze dell'organismo ed il "targeting" intracellulare di proteine e di materiale genetico rappresentano certamente l'obiettivo più ambizioso per i prossimi anni. Il risultato sarà non solo il miglioramento della terapia con farmaci noti ma l'allargamento della medesima ad una gamma più vasta di sostanze la cui potenzialità è per ora limitata agli esperimenti *in vitro*.

#### Bibliografia

- [1] I.F. Uchegbu, *Pharmaceutical Journal*, 1999, **263**, 355.
- [2] *Microspheres, Microcapsules & Liposomes*, Reza Arshady Editor, 1999.
- [3] J. Ogawa *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, **36**, 1095.
- [4] H. Okada *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1996, **85**, 1044.
- [5] T. Wai-Yip Lee, J.R. Robinson, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> Ed., cap. 47, Alfonso R. Gennaro (Ed.), 2000.
- [6] S.J. Ory *et al.*, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1983, **145**, 600.
- [7] R. Cortesi, *Chimica e Industria*, 2002, **84**, 48.
- [8] J. Widder *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1982, **71**, 379.
- [9] M.C. Garnett, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **53**, 171.
- [10] Y. Qiu, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, **53**, 321.