

CAPITOLO 1 Introduzione

Negli ultimi anni nano e microparticelle costituite da materiale polimerico o lipidico hanno trovato diversi impieghi nel campo farmaceutico, quali ad esempio la veicolazione di farmaci con problemi di biodisponibilità, solubilità, tossicità, veloce metabolizzazione oppure la realizzazione di sistemi terapeutici e diagnostici in grado di raggiungere target specifici e/o realizzare un rilascio controllato nel tempo.

I sistemi a rilascio controllato, in particolare, sono stati sviluppati per ovviare a difficoltà associate alle forme farmaceutiche tradizionali; utilizzando sistemi come liposomi, idrogeli, nano e microparticelle, è possibile ottenere vettori che, una volta incapsulato il principio attivo, sono in grado di realizzare un rilascio secondo cinetiche predeterminate che possono durare anche mesi (1). Inoltre, il rilascio dell'agente terapeutico può essere adattato alla specifica azione terapeutica che si vuole ottenere. Ad esempio, esistono alcune patologie per cui è necessario mantenere una concentrazione costante del farmaco, per cui sarà necessario realizzare un tipo di rilascio prolungato e costante nel tempo e con una velocità di rilascio adeguata oppure vi sono casi, come per gli antibiotici o per i vaccini, in cui è necessario piuttosto avere un rilascio ad intervalli regolari.

Durante le ricerche sulle nanotecnologie farmaceutiche, sono stati messi a punto una grande varietà di vettori, ciascuno dei quali presenta vantaggi e svantaggi. Ad esempio le microsfele polimeriche sono tra i sistemi maggiormente utilizzati; possono incapsulare piccole molecole, proteine, acidi nucleici, sono generalmente prodotte con materiali biocompatibili, e possono sostenere dei rilasci per lunghi periodi di tempo(1). Gli svantaggi che presentano sono la difficoltà di fabbricazione su larga scala, il mantenimento della stabilità dell'agente terapeutico e uno scarso controllo della velocità di rilascio.

Un esempio tipico di vettori colloidali sono i liposomi (FIG.1), vettori costituiti prevalentemente da fosfolipidi, le stesse molecole che compongono la matrice della membrana cellulare;

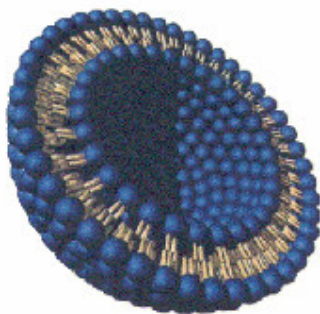


FIG. 1 Rappresentazione di un liposoma

questa loro caratteristica determina innanzitutto una elevata biocompatibilità. Il problema maggiore nel caso dei liposomi è il rapido riconoscimento da parte del sistema immunitario e la loro stabilità. Nel caso di alcune patologie, come ad esempio per certe infezioni riguardanti i macrofagi (*Leishmania*) o gli organi di smaltimento (filtrazione e purificazione del sangue) (fegato e milza), è possibile sfruttare il rapido riconoscimento dei liposomi da parte del sistema immunitario per ottenere un targeting passivo. Infatti, un primo sviluppo terapeutico dei liposomi, sfruttando il principio del cavallo di Troia, ha riguardato la terapia antimicrobica e in particolare l'attività antifungina. Si sa infatti che i liposomi, dopo iniezione per via endovenosa, vengono opsonizzati e successivamente direzionati verso i macrofagi epatici (targeting passivo) che li ingeriscono per endocitosi convogliandoli nei lisosomi o in altre regioni del citoplasma: qui sono presenti gli agenti patogeni che vengono direttamente distrutti dal principio attivo) (2).

Nei casi in cui invece gli obiettivi terapeutici siano altri, sono state sviluppate nuove tipologie di liposomi detti "stealth" (FIG. 2), che consistono in sistemi vescicolari composti da fosfolipidi e funzionalizzati sulla superficie da polimeri idrofilici, come, ad esempio il polietilene glicole (PEG) (3). Grazie alla presenza del polimero sulla superficie dei liposomi si ha un notevole aumento del tempo di emivita plasmatica dei liposomi e, contemporaneamente, se ne aumenta anche la stabilità.

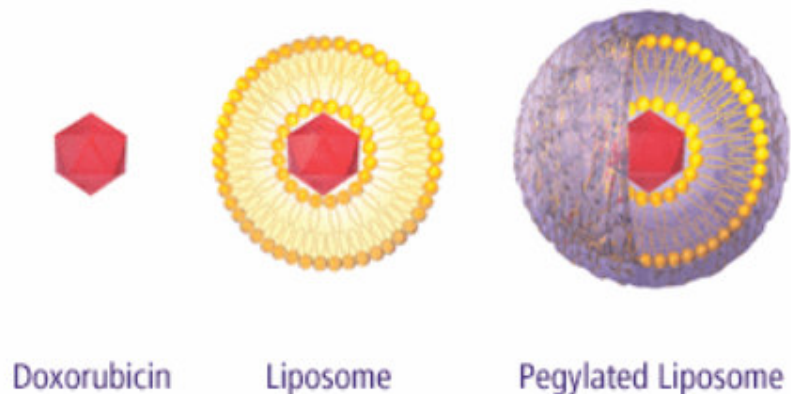


FIG. 2 Schema di incapsulazione di principio attivo in liposoma stealth

Un altro esempio di utilizzo di targeting passivo è basato sull'osservazione che, anche se normalmente il rivestimento endoteliale dei vasi sanguigni non permette la fuoriuscita di liposomi dal circolo sanguigno somministrati per via endovenosa, in vari tipi di tumori solidi e in zone infiammate l'endotelio vascolare è più permeabile e consente la fuoriuscita di liposomi con

dimensioni ridotte; questo risulta in un accumulo di liposomi nelle località infiammate (ad esempio lo si osserva nel caso di artriti o infezioni batteriche) e in alcuni tipi di tumori (4).

Per ottenere un targeting attivo è necessario funzionalizzare in superficie con opportune molecole di riconoscimento (anticorpi, vitamine, peptidi) i liposomi innanzitutto per poterli “direzionare” verso determinati siti, quindi per ottenere la tipologia di rilascio desiderata solo al sito di azione (5). La duttilità del sistema liposomiale rende possibile la progettazione di vescicole particolarmente selettive nei confronti di determinati tessuti permettendo quindi una distribuzione del farmaco incorporato più mirata e, di conseguenza, pervenire ad una diminuzione degli effetti collaterali sistemici del principio attivo. Per esempio, farmaci utilizzati nel trattamento di malattie quali i tumori presentano, in genere, un ristretto indice terapeutico e possono essere altamente tossici per i tessuti sani, e pertanto si presentano come candidati ideali per una formulazione liposomiale.

Tra i farmaci antitumorali occorre ricordare la Doxorubicina, per la quale, una formulazione liposomiale (FIG. 2) si è rilevata particolarmente vantaggiosa in quanto ha permesso sia di aumentare l'efficacia terapeutica del principio attivo sia di migliorare l'indice terapeutico grazie alla riduzione della cardiotossicità tipica del farmaco e a un maggiore accumulo nel tessuto tumorale. Questo tipo di formulazione è stato il primo prodotto a formulazione liposomiale approvato e risulta attualmente in commercio sia in Europa che in America con il nome di DOXIL[®], una formulazione di doxorubicina inglobata in liposomi (vedi FIG. 2) ricoperti da uno strato di PEG (polietilenglicole), con una emivita circolatoria otto volte superiore a quella mostrata dal farmaco libero e una minore incidenza degli effetti collaterali tossici (6).

In generale si può dire che i liposomi come nuovi sistemi di rilascio vengono sviluppati quando le formulazioni convenzionali già esistenti non risultano soddisfacenti. La riformulazione del farmaco in liposomi offre, spesso, in questi casi, una maggiore sicurezza, una migliore efficacia terapeutica e la possibilità di superare alcune problematiche di tipo formulativo. Ad esempio, la formulazione di farmaci lipofili, come il paclitaxel, risulta essere particolarmente adatta all'applicazione della tecnologia liposomiale. Tali farmaci, infatti, data la loro bassissima solubilità in acqua sono comunemente formulati con surfattanti e cosolventi organici i quali presentano tuttavia problemi di tossicità. Ad esempio, la formulazione attualmente utilizzata per il paclitaxel, TAXOL[®], include tra i propri componenti il Chremophor EL (castor oil polietossilato) e etanolo al fine di solubilizzare il farmaco; il prodotto mostra, tuttavia vari effetti collaterali come reazioni di ipersensibilità, nefrotossicità e neurotossicità dovuti al Chremophor EL (6). Per questo tipo di farmaci, i liposomi costituiscono veicoli non tossici, biocompatibili e biodegradabili e, pertanto, particolarmente utili nel trasportare nel circolo tali molecole.

Il rilascio, nel caso dei liposomi, può essere controllato modificando, a seconda delle esigenze, la dimensione e/o la composizione dei vettori; ad esempio è possibile realizzare sistemi sia neutri che con cariche superficiali, questo permette di indirizzare i liposomi verso un sito piuttosto che un altro; oppure si possono ottenere membrane di diversa fluidità e quindi di diversa stabilità, piuttosto che sensibili a variazioni del pH (3). Un altro vantaggio fornito dai liposomi è la possibilità di inserire sia molecole idrofobe nello strato lipidico, sia molecole idrofile nel core acquoso che può essere creato al loro interno.

Se adattare il rilascio ad un bisogno specifico clinico o terapeutico è l'aspetto fondamentale dei sistemi a rilascio controllato, risulta quindi di grande importanza conoscere in modo approfondito e controllare i meccanismi e le variabili chimico-fisiche che regolano il processo di liberazione dell'agente terapeutico dalle forme di rilascio.

Nel caso di nano e microsfele polimeriche, il tipo di polimero utilizzato per la loro fabbricazione, il suo peso molecolare e la sua eventuale velocità di degradazione. Solitamente il farmaco viene rilasciato per diffusione attraverso la matrice polimerica e la velocità di diffusione del farmaco è inversamente proporzionale rispetto al peso molecolare del polimero costituente il vettore. Un altro aspetto determinante per la cinetica di rilascio è, ovviamente, la dimensione del vettore.

Anche nel caso delle nanoparticelle polimeriche si ha molta versatilità riguardo alla loro funzionalizzazione superficiale sia per quanto riguarda la presenza di polimeri idrofili per aumentarne il tempo di circolazione ematico, sia per quanto riguarda il direzionamento. L'aspetto decisivo sarà, quindi, individuare l'effetto dei vari componenti utilizzati sulle proprietà fisico-chimiche dei vettori e sulle caratteristiche del rilascio.

Nonostante alcuni indubbi vantaggi, visti precedentemente, l'utilizzo di nano e microparticelle presenta delle difficoltà, soprattutto dovute alle loro ridotte dimensioni che comportano problemi di fabbricazione su larga scala e/o di impiego, spesso consentendo come unica via di somministrazione quella iniettabile che presenta una maggiore difficoltà di realizzazione.

Un'interessante soluzione a questo problema è quella di preparare dei sistemi di dimensioni maggiori e più facilmente maneggiabili che possano, sotto opportune condizioni, ritornare alle dimensioni originarie delle nano o microparticelle senza compromettere le caratteristiche dei vettori originali. Nonostante esistano già diversi studi riguardo l'utilizzo di liposomi incapsulati in microsfele(7,8), non è ancora stata sperimentata la possibilità di ottenere dei prodotti di dimensioni macroscopiche che, una volta assunti, possano liberare i nanovettori in loro contenuti.

1.1 scopo della tesi

Lo scopo di questa ricerca riguarda lo studio e la determinazione dei parametri chimico-fisici ottimali per la realizzazione di diverse tipologie di nanoparticelle adatte per il trattamento di differenti patologie. Saranno prese in particolar modo in considerazione una nuova tipologia di particelle che sono state ideate in precedenza (9) e che consistono in un prodotto d'interazione tra la lecitina ed il chitosano. In particolare è stato osservato che iniettando una soluzione alcoolica di lecitina di soia in una soluzione acquosa di chitosano si forma un precipitato lattescente costituito da particelle stabili di dimensioni nanometriche. Queste nanostrutture si prestano ad un impiego come vettori di farmaci capaci di alterare il profilo cinetico di una sostanza attiva senza modificare la sua struttura chimica.

Sono state studiate le proprietà che influenzano le modalità e le specificità del rilascio, in particolare:

- dimensioni, carica superficiale e struttura interna dei vettori in relazione alla loro composizione;
- interazioni tra principio attivo caricato e proprietà fisico-chimiche del carrier;

Le dimensioni di un carrier sono di fondamentale importanza sia per il tempo di emivita plasmatico, sia per le specificità dell'incapsulazione e del rilascio(2). Si è, quindi, deciso di analizzare approfonditamente la distribuzione delle dimensioni di vettori ottenuti con diverse composizioni, utilizzando la tecnica del light scattering (statico e dinamico) e la microscopia elettronica a trasmissione su campioni rapidamente congelati (cryo-Tem); le misure di microscopia danno informazioni più immediate rispetto a misure di light scattering, sono però ristrette ad una ridotta porzione di campione; le misure di light scattering, invece, riguardano la globalità del campione.

Un' altro aspetto fondamentale per le specificità del rilascio e dell'incapsulazione di un principio attivo, indagato nel corso del lavoro di tesi, è la struttura ovvero l'organizzazione interna dei vettori, specialmente delle porzioni idrofile e lipofile. Utilizzando una lunghezza d'onda opportuna, è possibile ottenere informazioni sulla struttura dei vettori; la radiazione di sincrotrone utilizzata possiede una lunghezza d'onda pari a 0.1 nm; da misure di spettroscopia X è quindi possibile ottenere informazioni sull'organizzazione delle molecole costituenti le nanoparticelle (bibliografia tecniche di analisi 5,6). Le misure di spettroscopia X, sono state effettuate al sincrotrone di Grenoble (aprile 2007) su preparazioni ottenute con diverse proporzioni tra lecitina e chitosano e anche utilizzando chitosano di diversi pesi molecolari.

Infine, per comprendere i meccanismi di interazione tra i vari componenti delle nanoparticelle, vengono ideati dei sistemi modello con una composizione controllata analoga, per proprietà chimico-fisiche, a quelle delle nanoparticelle in esame. Data la natura lipofila dei principi attivi che verranno incapsulati nelle nanoparticelle, è importante comprendere la loro interazione con la

componente lipidica di queste. La lecitina di soia utilizzata nella preparazione delle nanoparticelle (componente lipidica), presenta una composizione molto varia, rendendo complesso uno studio strutturale. L'utilizzo di vettori modello sicuramente può fornire importanti informazioni sull'interazione tra i principi attivi e una struttura nanoparticellare semplificata per poi arrivare alla complessità del caso reale.