



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN:
SCIENZE MEDICHE, CLINICHE E SPERIMENTALI
INDIRIZZO: SCIENZE REUMATOLOGICHE
CICLO: XXII

**SVILUPPO DI SISTEMI MICROPARTICELLARI PER IL RILASCIO
INTRAARTICOLARE PROLUNGATO DI CITOCHINE ANTIINFIAMMATORIE
PER LA TERAPIA DELLE PATOLOGIE REUMATICHE**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Antonio Tiengo

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Supervisore: Ch.mo Prof. Leonardo Punzi

Dottorando : Dott. Gerardo Amabile

INDICE

RIASSUNTO.....	I
ABSTRACT	III
INTRODUZIONE	1
1.1 IL-1.....	1
1.1.1 IL-1 α	2
1.1.2 IL-1 β	3
1.1.3 RECETTORI PER IL-1.....	3
1.1.4 EFFETTI BIOLOGICI DI IL-1.....	4
1.2 ANTAGONISTA DEL RECETTORE PER IL-1	6
1.2.1 ATTIVITÀ BIOLOGICA DI IL-1Ra.....	8
1.3 MALATTIE REUMATICHE CRONICHE	9
1.3.1 RUOLO DELL'IL-1 NELLE PATOLOGIE REUMATICHE.....	10
1.4 ARTRITE REUMATOIDE.....	11
1.4.1 TERAPIA FARMACOLOGICA DELL'ARTRITE REUMATOIDE.....	12
1.4.1.1 FANS.....	12
1.4.1.2 CORTICOSTEROIDI	13
1.4.1.3 IDROSSICLOROCHINA.....	13
1.4.1.4 SULFASALAZINA	13
1.4.1.5 FARMACI CITOTOSSICI O IMMUNOSOPPRESSORI	14
1.4.1.6 SALI D'ORO	14
1.4.1.7 FARMACI BIOTECNOLOGICI	14
1.4.2 RUOLO DELL'IL-1RA NELLA TERAPIA DELL'ARTRITE REUMATOIDE	15
1.5 OSTEOARTROSI.....	16
1.5.1 TERAPIA DELL'OSTEOARTROSI.....	17
1.6 IL-1RA UMANO RICOMBINANTE: ANAKINRA	19
1.7 TERAPIA INTRAARTICOLARE IN REUMATOLOGIA	20
1.8 NUOVE TERAPIE ANTI IL-1	21
1.8.1 TERAPIA GENICA CON IL-1RA.....	21
1.8.2 ANTICORPI MONOCLONALI ANTI IL-1	21
1.8.3 IL-1 TRAP.....	21
1.9 FARMACI PROTEICI: LIMITI ED OPPORTUNITA'	22
1.9.1 STABILITÀ DELLE PROTEINE.....	23
1.10 SISTEMI DI DELIVERY PER FARMACI PROTEICI.....	26
1.10.1 SISTEMI SUPRAMOLECOLARI COLLOIDALI.....	26
1.10.2 BIOCONIUGAZIONE.....	28
1.10.3 MICRO E NANOPARTICELLE SOLIDE	30
1.11 IMPIEGO DEI POLIMERI NEL DRUG DELIVERY	32
1.11.1 MECCANISMI DI RILASCIO DA MATRICI POLIMERICHE	34
1.12 FORMULAZIONE DI MICROSFERE	37
1.12.1 TECNICA SPRAY DRYING	39
1.12.2 TECNICA DELLA EMULSIONE O/W E DOPPIA EMULSIONE W/O/W ED EVAPORAZIONE DEL SOLVENTE.....	40
1.12.3 ALTRE TECNICHE DI PRODUZIONE DI MICROSFERE.....	41
1.13 SCOPO DELLA TESI	43

MATERIALI E METODI	45
2.1 MATERIALI UTILIZZATI NELLA PRODUZIONE DELLE MICROSFERE	45
2.1.1 IL-1RA UMANO RICOMBINANTE (ANAKINRA).....	45
2.1.2 PLGA.....	45
2.1.3 PLA.....	45
2.1.4 HYALASTINE.....	46
2.1.5 HYALECTIN.....	46
2.1.6 HYAFF 11 P50-P75-P100.....	46
2.1.7 PEG 5 kDa.....	46
2.1.8 EPIKURON 200SH.....	47
2.1.9 ALCOL POLIVINILICO.....	47
2.2 METODI ANALITICI	47
2.2.1 PURIFICAZIONE DI IL-1Ra (ESEMPIO).....	47
2.2.2 PROTOCOLLI DI ANALISI MEDIANTE HPLC DI IL-1Ra.....	48
2.2.3 ANALISI DIMENSIONALE DEI SISTEMI PARTICELLARI.....	48
2.3 METODICHE UTILIZZATE NELLA PRODUZIONE DI MICROSFERE	49
2.3.1 EMULSIONE ED ESTRAZIONE DELLA FASE INTERNA (PRIMO METODO) (ESEMPIO).....	49
2.3.2 EMULSIONE ED ESTRAZIONE DELLA FASE INTERNA (SECONDO METODO) (ESEMPIO).....	49
2.3.3 DOPPIA EMULSIONE ED EVAPORAZIONE DEL SOLVENTE (ESEMPIO).....	50
2.3.4 EMULSIONE E SPRAY DRYING (ESEMPIO).....	51
2.3.5 SOSPENSIONE E SPRAY DRYING (ESEMPIO).....	51
2.3.6 PREPARAZIONE DI SOSPENSIONI DI MICROSFERE IN SOLUZIONE DI HYALECTIN (ESEMPIO).....	53
2.4 STUDI IN VITRO	53
2.4.1 CINETICA DI RILASCIO IN TAMPONE CITRATO DI FORMULAZIONI DI MICROSFERE CARICATE CON IL-1RA.....	53
2.4.2 CINETICA DI RILASCIO IN LIQUIDO SINOVIALE DI FORMULAZIONI DI MICROSFERE CARICATE CON IL-1RA.....	53
2.5 STUDI IN VIVO	54
2.5.1 STUDIO DI FARMACOCINETICA DI FORMULAZIONI MICROPARTICELLARI CARICATE CON IL-1RA.....	54
2.5.2 STUDIO DI EFFICACIA IN VIVO DI FORMULAZIONI MICROPARTICELLARI CARICATE CON IL-1Ra.....	54
RISULTATI E DISCUSSIONE	57
3.1 PROVE DI SOLUBILITA' DI HYAFF11	57
3.2 PREPARAZIONE DI SISTEMI MICROPARTICELLARI MEDIANTE UTILIZZO DI DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO	57
3.2.1 SPRAY DRYING	57
3.2.1.1 Preparazione delle formulazioni denominate "HSD 2-3-4-10-11".....	57
3.2.1.2 Preparazione delle formulazioni denominate "HSD 9-15".....	58
3.2.1.3 Preparazione delle formulazioni denominate "HSD 12-13-14-16-17".....	58
3.2.2 NANOPRECIPITAZIONE	59
3.2.2.1 Preparazione delle formulazioni denominate LBH 3-4.....	59
3.2.2.2 Preparazione delle formulazioni denominate LBH 13-14-15.....	60
3.2.3 EMULSIONE, ESTRAZIONE DELLA FASE INTERNA E PRECIPITAZIONE	60
3.2.3.1 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 5".....	60

3.2.3.2	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 6-7"</i>	61
3.2.3.3	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 11"</i>	62
3.2.3.4	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 16"</i>	62
3.2.3.5	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 17"</i>	63
3.2.3.6	<i>Preparazione della formulazione denominata "LBH 19-20"</i>	64
3.2.3.7	<i>Preparazione della formulazione denominata "LBH 21-23"</i>	64
3.2.3.8	<i>Preparazione della formulazione denominata "LBH 22-24"</i>	64
3.3	PREPARAZIONE DI SISTEMI MICROPARTICELLARI MEDIANTE	
	UTILIZZO DI POLIESTERI BIODEGRADABILI	66
3.3.1	TECNICA DI EMULSIONE E SPRAY DRYING	66
3.3.1.1	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 25-26-27-28-29"</i>	66
3.3.2	DOPPIA EMULSIONE ED EVAPORAZIONE DEL SOLVENTE	67
3.3.2.1	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 37-43-44"</i>	67
3.3.2.2	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 47-48-49-50-51-52-53-54-61"</i>	68
3.3.3	SOSPENSIONE E SPRAY DRYING	69
3.3.3.1	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 55-56-57"</i>	69
3.3.3.2	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 59-62"</i>	71
3.3.3.3	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 76-78-79"</i>	72
3.3.3.4	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 82-83"</i>	73
3.3.3.5	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 85-86"</i>	73
3.3.3.6	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 91-92-93-94"</i>	74
3.3.3.7	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 95-96"</i>	76
3.3.3.8	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 97-98-99"</i>	76
3.3.3.9	<i>Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 101-102"</i>	77
3.3.4	STUDI DI FARMACOCINETICA DI IL-1Ra CARICATA NELLA	
	FORMULAZIONE LBH 102	79
3.3.5	STUDI DI EFFICACIA TERAPEUTICA DELLA FORMULAZIONE LBH	
	102 MEDIANTE MODELLO DI ARTRITE SPERIMENTALE	81
3.3.6	STUDIO DI MIGLIORAMENTO DELLA RISOSPENSIBILITÀ DELLA	
	FORMULAZIONE MICROPARTICELLE LBH 102	84
3.3.7	STUDIO DI FORMULAZIONE DEL VEICOLO IN CUI RIDISPERDERE	
	LE MICROSFERE LBH 102	85
	CONCLUSIONI	87
	BIBLIOGRAFIA	89

RIASSUNTO

Scopo: Lo scopo di questo studio è stato quello di sviluppare un sistema a rilascio prolungato per il delivery di farmaci biotecnologici per il trattamento intraarticolare (IA) delle patologie infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide e l'osteoartrosi. Lo studio è stato focalizzato sulla preparazione di microparticelle costituite da polimeri biodegradabili e biocompatibili (PLGA, PLA e derivati dell'acido ialuronico). IL-1Ra umano ricombinante (anakinra) è stato utilizzato come modello di farmaco biotecnologico ad azione antiinfiammatoria per il suo ruolo fondamentale di antagonista del recettore per l'IL-1, citochina della quale è noto il ruolo chiave proinfiammatorio nelle patologie reumatiche croniche.

Introduzione: Le microparticelle polimeriche sono state ampiamente studiate come sistemi di drug delivery per i farmaci biotecnologici. Questo tipo di formulazioni può garantire la stabilità nel tempo del farmaco e un lento rilascio che consente di ottimizzare il protocollo terapeutico.

Tuttavia, la formulazione di proteine è solitamente complicata dalla scarsa stabilità di queste fragili molecole che vanno incontro a denaturazione ed inattivazione se sottoposte a condizioni operative drastiche. La messa a punto di opportune procedure che conservino l'attività delle proteine è essenziale per ottenere prodotti efficaci.

Materiali e Metodi: La preparazione di microparticelle a base di polimeri biodegradabili è stata studiata utilizzando diverse tecniche: nanoprecipitazione, emulsione ed estrazione della fase interna, emulsione ed evaporazione, doppia emulsione ed evaporazione, spray drying. Varie combinazioni di eccipienti (PLA, PLGA, PLGA-H, PEG, tristearina, acido ialuronico e derivati, Polossamero, fosfatidilcolina) e diverse condizioni operative (concentrazione del polimero e della proteina, settaggio della strumentazione ecc) sono state valutate al fine di evidenziare i principali parametri critici che determinano le proprietà chimico-fisiche della preparazione.

I prodotti sono stati caratterizzati per le loro proprietà morfologiche e dimensionali, e sono stati valutati il caricamento e il rilascio del farmaco.

Il rilascio *in vitro* di IL-1RA dalle microparticelle in tampone fisiologico o liquido sinoviale è stato valutato utilizzando tecniche come RP-HPLC ed ELISA.

La cinetica di rilascio *in vivo* di IL-1Ra dalle microsfele è stata valutata mediante metodi ELISA. Sono stati effettuati degli studi di efficacia terapeutica della formulazione utilizzando

un modello animale di artrite da collagene (C.I.A.); i diversi gruppi di animali sono stati trattati con diverse dosi di microsfere o di Kineret, e con frequenze diverse di somministrazione. Sono stati valutati il paw score, il peso, diametro dell'articolazione della caviglia e la tumefazione del femore.

Risultati: Sono stati ottenute tipologie differenti di formulazioni utilizzando diversi tipi di polimeri biocompatibili, diversi rapporti tra i componenti, diverse concentrazioni di polimero e differenti procedure di preparazione. La tecnica di spray drying è risultata la più efficace in termini di resa, di caricamento del farmaco e di polidispersività dimensionale.

La preparazione mediante spray drying di microsfere a partire da sospensioni di liofilizzati di IL-1Ra/PEG in soluzioni organiche di PLA o PLGA ha permesso l'ottenimento di microparticelle con dimensioni comprese tra 1 e 30 μ m, compatibili con l'uso iniettabile.

Si è verificato che i principali parametri critici che possono influenzare le proprietà biofarmaceutiche delle formulazioni sono: peso molecolare del PEG utilizzato e rapporto PEG/IL-1Ra nel liofilizzato, concentrazione di PLA o PLGA nel solvente organico, tipo di PLGA e velocità di alimentazione dell'ugello dello strumento.

L'ottimizzazione di questi parametri ha permesso di ottenere microsfere di dimensioni adatte all'iniezione intraarticolare (2-15 μ m) e con un'elevata efficienza di caricamento del farmaco (50-70%); queste microparticelle sono costituite da 75% p/p di PLGA (in soluzione organica al 4%), 5% p/p di Epikuron 200SH (fosfatidilcolina), 10% p/p di PEG 5kDa e 10% p/p di IL-1Ra.

Gli studi di farmacocinetica in topi Balb/c hanno evidenziato che, negli animali trattati con microsfere caricate con citochina, la concentrazione plasmatica di IL-1Ra decresce molto più lentamente che negli animali trattati con il prodotto commerciale Kineret[®] (anakinra); dopo 24h dalla somministrazione di Kineret, infatti, non vi è più traccia rilevabile di IL-1Ra nel plasma, mentre, dopo somministrazione di microsfere caricate con IL-1Ra, si rileva presenza di citochina per tempi superiori alle 48h.

L'utilizzo del modello animale di artrite sperimentale ha permesso di valutare l'efficacia terapeutica delle microsfere: la somministrazione di microsfere caricate con IL-1Ra consente di ridurre la frequenza di trattamento ottenendo risultati confrontabili ad una iniezione giornaliera di Kineret.

Conclusioni: Il metodo di sospensione e spray drying sviluppato è adatto all'ottenimento di sistemi per il rilascio prolungato di prodotti biotecnologici come citochine, anticorpi monoclonali e proteine di fusione. Le caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti possono essere modificate e adattate allo scopo desiderato variando le condizioni di processo e la composizione della formulazione.

ABSTRACT

Purpose: The aim of our study is to develop a long lasting biotech drug delivery system for intraarticular (IA) treatment of rheumatic diseases as rheumatoid arthritis and osteoarthritis. The study was focused on preparation of microparticles formulated with biocompatible/biodegradable polymers (PLGA and PLA). Recombinant Human IL-1Ra was used as biotechnological drug model.

Introduction: Polymeric microparticles have been widely studied as drug delivery systems for biotech drugs. These formulation can guarantee long term stability of the drug and sustained release allowing for therapeutic protocol optimisation. Nevertheless, protein formulation is usually complicated by the low stability of these fragile molecules which easily undergo denaturation and inactivation under harsh manipulation conditions. The set up of proper procedures which preserve the protein activity is essential to achieve effective products.

Experimental: In the present research work, the preparation of biodegradable polymeric microparticles was investigated by using several techniques: emulsion/evaporation, double emulsion/evaporation, suspension/evaporation, nanoprecipitation, spray-drying.

In a systematic study, various excipient combinations (PLA, PLGA, PLGAH, PEG, Tristearin, Hyaluronic Acid, Poloxamers etc.) and operative conditions (polymer and protein concentration, instrument set up etc.) were evaluated in order to point out the main critical parameters which dictate the physicochemical properties of the preparations.

The products were characterised for their morphological and dimensional properties, drug loading and release were assessed.

In vitro release of IL-1Ra from microparticles was evaluated by suspension in buffer and synovial fluid using RP-HPLC and ELISA methods. Pharmacokinetic of IL-1Ra was studied in mice using ELISA methods. Therapeutic efficacy of IL-1Ra loaded microspheres was tested using an animal model of collagen induced arthritis.

Results: Many kind of formulations were obtained using different kind of biocompatible polymers, different ratios between components, different polymers concentrations and procedures of preparation. Spray-drying techniques were the most efficient as they achieved for product yield, drug loading and narrow dimensional polydispersivity. The preparation of protein suspensions in organic solvent solution of PLA or PLGA and PEG yielded microparticles with size ranging from 1 to 30 μm which were suitable for IA administration.

The main critical parameters affecting the biopharmaceutical properties of the formulations were: PEG molecular weight and content in the organic solution, PLA or PLGA concentration in the organic solution, type of PLGA and spray feed rate.

Under optimized conditions, spherical and homogeneous microparticles in a size range between 2 and 15 μ m were obtained with about 70% drug loading; the microspheres were formed by PLGA (75%), Epikuron 200SH (5%), PEG 5kDa (10%) and IL-Ra (10%).

Pharmacokinetic studies demonstrated that microsphere formulation permitted a prolonged in vivo release of IL-1Ra.

The use of animal model of collagen induced arthritis underlined that the injection of IL-1Ra loaded microspheres permits the reduction of Anakinra treatment rate.

Conclusion: Spray Drying is a suitable method to obtain drug delivery systems for the prolonged release of biotechnological products such as cytokines and monoclonal antibodies. The physicochemical properties of the products can be tailored by changing different process conditions and formulation composition.

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

Le citochine sono proteine prodotte e secrete da vari tipi di cellule in risposta ad uno stimolo fisiopatologico allo scopo di modificare il comportamento di altre cellule inducendone nuove funzioni, la crescita, il differenziamento o la morte. La loro azione può essere locale (effetto autocrino o paracrino) oppure possono agire in modo endocrino, modificando, cioè, il comportamento di cellule molto distanti dalla sede della loro produzione. La loro emivita è solitamente molto breve. Queste proteine possono essere distinte in varie famiglie:

- ematopoietine, famiglia che include diversi fattori di crescita (es. eritropoietina);
- TNF (es. TNF- α);
- chemochine;
- interferoni (es IFN- γ);
- linfocine o interleuchine, citochine prodotte prevalentemente dalle cellule del sistema immunitario.

Le citochine svolgono la loro funzione legandosi a specifici recettori di membrana presenti sulle cellule bersaglio. Il legame a questi recettori spesso porta ad una modifica del recettore ed al reclutamento di proteine accessorie e chinasi che, a loro volta, portano alla trasduzione del segnale e quindi alla modifica cellulare¹.

1.1 IL-1

L'interleuchina 1 (IL-1) è una citochina pro-infiammatoria il cui ruolo nella risposta infiammatoria è stato a lungo studiato ed è tuttora oggetto di molte pubblicazioni scientifiche. È stato dimostrato che IL-1 è coinvolta nella patogenesi di diverse malattie croniche, tra cui l'artrite reumatoide (AR), l'osteoartrite (OA) e altre patologie reumatiche e autoinfiammatorie.

IL-1 è una citochina secreta da vari tipi di cellule del sistema immunitario tra cui macrofagi, monociti e cellule dendritiche, ma anche da fibroblasti e cellule endoteliali. La liberazione di IL-1 avviene in risposta ad infezioni batteriche (la produzione di citochina

viene stimolata soprattutto dall'LPS, un'endotossina dei batteri Gram negativi), in risposta alla produzione di TNF da parte di altre cellule e dall'interazione delle cellule produttrici di IL-1 con linfociti T - CD4 positivi attivati². Esistono due forme biologiche di IL-1 (α e β). Sebbene siano prodotte a partire da geni distinti e l'omologia di sequenza sia inferiore al 26%, le forme α e β mantengono una regione minima di omologia³ che viene riconosciuta dal recettore per l'IL-1. Entrambe le isoforme, infatti, possono svolgere gli stessi ruoli biologici e sono sintetizzate a partire da precursori (31 kDa) che in seguito a processamento originano le forme attive (circa 17 kDa).

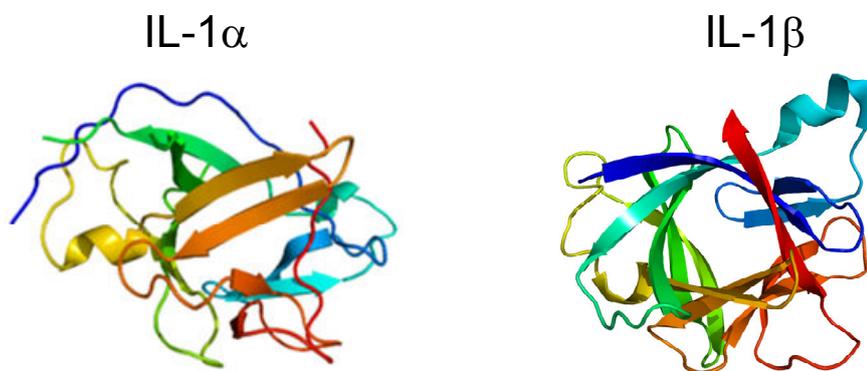


Figura 1 Struttura di IL-1 α e IL-1 β .

1.1.1 IL-1 α

La maggior parte delle molecole di IL-1 α resta nella forma di precursore a livello intracellulare a mediare gli effetti autocrini della citochina; una parte tuttavia viene trasportata sulla membrana cellulare e può fungere da messaggero paracrino verso le cellule adiacenti⁴.

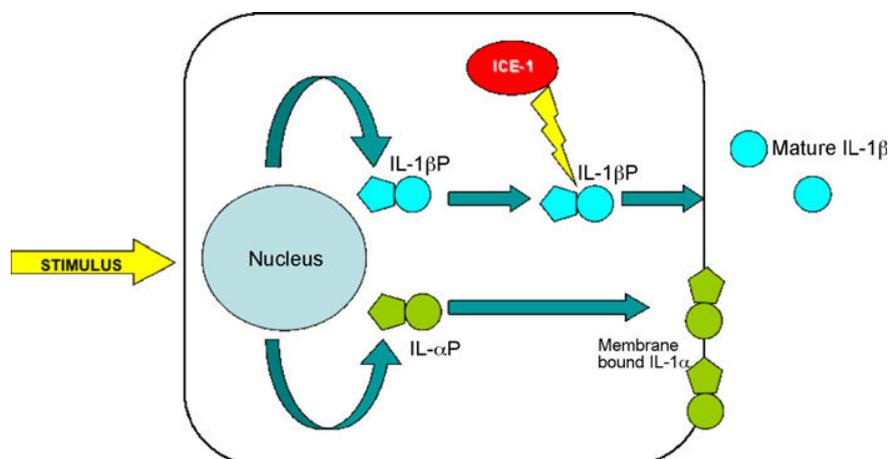


Figura 2 Meccanismo di rilascio di IL-1 α e β . Figura adattata da: Moltó A, Olivé A. Anti-IL-1 molecules: New comers and new indications. Joint Bone Spine (2009).

1.1.2 IL-1 β

Si ritiene che IL-1 β sia secreta nello spazio extracellulare, e che, potendo entrare in circolo, sia la causa degli effetti sistemici della citochina.

Il precursore di IL-1 β deve essere tagliato da enzimi per raggiungere la forma biologicamente attiva. L'IL-1 converting enzyme (ICE), una proteasi intracellulare, conosciuta anche come caspasi-1 sembra essere altamente specifica per il clivaggio di IL-1.

1.1.3 RECETTORI PER IL-1

I recettori per l'IL-1 (IL-1R) appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline e contengono tre domini *Ig-like* nella loro porzione extracellulare⁵.

Esistono due tipi di recettore:

- IL-1R_I, capace di reclutare una chinasi e quindi di avviare la cascata di segnali all'interno della cellula bersaglio;
- il *decoy receptor* IL-1R_{II}, che non genera risposte intracellulari e che sembra avere la funzione di tampone per compensare l'eccessiva concentrazione di IL-1.

In un secondo tempo è stata scoperta la proteina accessoria del recettore dell'IL-1 (IL-1R AcP). Anch'essa appartiene alla superfamiglia delle Ig e rappresenta la seconda subunità del complesso recettoriale⁶. Quando IL-1 lega la subunità principale del recettore di tipo I, provoca un cambiamento conformazionale che permette l'interazione con la proteina accessoria; per la trasduzione intracellulare del segnale è indispensabile l'interazione di IL-1 con entrambe le subunità del recettore e l'attivazione dei suoi domini citoplasmatici, come dimostrato dall'assenza di risposta all'IL-1 in cellule che non esprimono IL-1R AcP⁷.

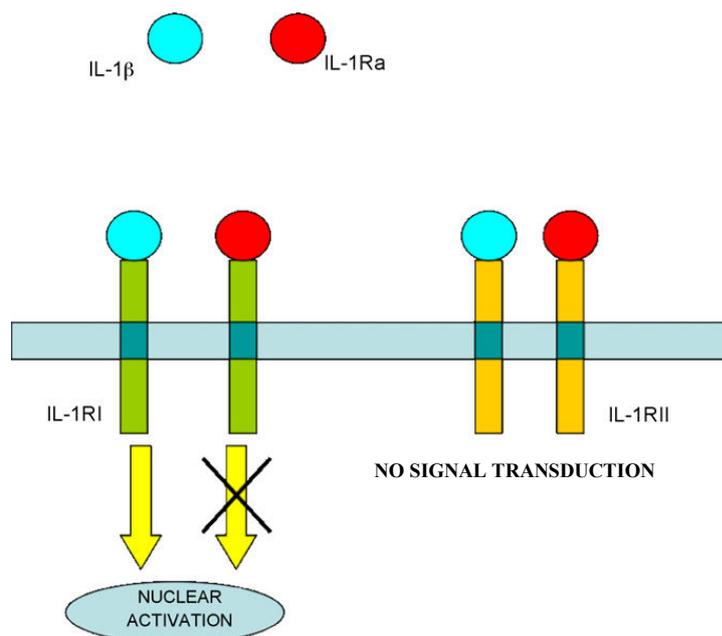


Figura 3 Interazione di IL-1e IL-1Ra con i recettori per l'IL-1 di tipo I e II. Figura adattata da: Moltó A, Olivé A. Anti-IL-1 molecules: New comers and new indications. Joint Bone Spine (2009).

Il legame di IL-1 con il recettore di membrana di tipo I attiva una cascata di chinasi che porta alla fosforilazione e conseguente inattivazione di $\text{I}\kappa\text{B}$; avviene quindi la traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione (TF) $\text{NF}\kappa\text{-B}$. Questo è un tipico TF per geni della risposta immunitaria⁷.

IL-1R_I ha un'affinità lievemente maggiore per $\text{IL-1}\beta$ rispetto a $\text{IL-1}\alpha$ ed è espresso da linfociti T, fibroblasti, epatociti e cellule endoteliali e rappresenta il principale recettore per le risposte mediate da IL-1. IL-1R_II , che ha un'affinità lievemente maggiore per $\text{IL-1}\alpha$, è presente sulla membrana di linfociti B, monociti, macrofagi e neutrofilii.

La porzione extracellulare del recettore può essere processata proteoliticamente e liberata nell'ambiente extracellulare (sIL-1R_I e sIL-1R_II). Le due forme solubili del recettore si possono trovare anche a livello sistemico. $\text{IL-1}\beta$ viene legato con alta affinità dalla forma solubile del recettore di tipo II⁸; grazie a questa affinità sIL-1R_II sequestra l'IL-1 presente nel plasma e negli interstizi e può essere, quindi, considerato un inibitore *in vivo* dell'attività infiammatoria di IL-1.

1.1.4 EFFETTI BIOLOGICI DI IL-1

Il legame di IL-1 alle cellule bersaglio che esprimono il recettore è in grado di indurre la sintesi di altre citochine come IL-6 e IL-2, gli interferoni o le chemochine (sostanze in grado di attirare macrofagi e granulociti verso il sito di infiammazione). Gli effetti possono essere

diversi a seconda del tipo di cellula bersaglio ma il risultato che si ottiene è quello di attivare ed alimentare il processo infiammatorio.

L'IL-1 ha molteplici effetti sia locali che sistemici, tra cui quello di attivare processi infiammatori come febbre, vasodilatazione e crampi in risposta ad esempio ad infezioni batteriche. Stimola, inoltre, la produzione di prostaglandine da parte di vari tipi di cellule (muscolari, epiteliali, ecc) ⁹.

Gli effetti di IL-1 hanno un ruolo fondamentale nella fase di attivazione della risposta infiammatoria acuta: infatti, stimolando la vasodilatazione dei vasi sanguigni (per mezzo delle prostaglandine), IL-1 favorisce la migrazione di cellule immunitarie quali macrofagi e linfociti verso il sito di infezione. Inoltre, aumentando l'espressione di molecole di adesione nelle cellule dell'endotelio dei vasi sanguigni, favorisce l'ancoraggio dei leucociti alle pareti dei vasi stessi e la loro migrazione verso i tessuti. Un altro effetto di questa citochina è quello di contribuire all'attivazione dei linfociti T-helper e alla maturazione ed espansione clonale dei linfociti B (moltiplicazione di linfociti B in grado di riconoscere lo stesso antigene).

In caso di infezione sistemica IL-1, similmente al TNF-alfa, stimola la produzione epatica delle cosiddette proteine di fase acuta (PCR, IL-6, fibrinogeno, fattori della coagulazione e proteine del complemento). Iniezioni sistemiche di IL-1 ricombinante provocano febbre, anoressia, ipotensione, leucopenia e trombocitopenia. IL-1 stimola anche l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene portando alla produzione di ormone della crescita, ormone adenocorticotropo (ACTH), vasopressina e somatostatina¹⁰. A livello sistemico IL-1 aumenta la produzione di fattori stimolanti le colonie e le cellule staminali ed agisce sinergicamente con questi fattori per aumentare la produzione di granulociti e piastrine¹¹.

È stato dimostrato che IL-1 agisce sinergicamente con la bradichinina, con altre citochine e fattori di crescita soprattutto nello stimolare la sintesi di prostanoidi. In letteratura è ampiamente riportato anche un sinergismo molto forte tra IL-1 e TNF- α .

IL-1 è in grado direttamente e autonomamente di stimolare la febbre anche in assenza di altri stimoli (antigeni batterici), ed è per questo conosciuta come un pirogeno endogeno.

La citochina si lega ai recettori presenti nelle cellule endoteliali dell'ipotalamo e sembra essere in grado di attivare il suo centro termoregolatore facendo aumentare la temperatura del corpo. In queste condizioni la replicazione batterica e virale diminuisce mentre la risposta immune diviene più efficiente.

Nell'articolazione, IL-1 stimola i condrociti a rilasciare collagenasi e altri enzimi proteolitici coinvolti nella degradazione della cartilagine. IL-1 favorisce anche la

differenziazione degli osteoclasti immaturi e contribuisce all'attivazione degli osteoclasti maturi la quale porta al riassorbimento osseo caratteristico delle patologie reumatiche.

La sensibilità delle cellule alla stimolazione da parte di IL-1 è molto alta: nonostante la presenza di molti recettori sulla superficie della membrana cellulare, è sufficiente l'occupazione da parte dell'agonista di pochi recettori per ottenere una risposta biologica completa³.

Quindi la modulazione dell'attività biologica di IL-1 è molto importante per regolare gli effetti infiammatori e di riparazione tissutale. Esistono vari meccanismi per modulare l'attività dell'IL-1 quali la down-regolazione del recettore da parte della stessa IL-1, l'esistenza di un decoy receptor (IL-1RII), l'esistenza di forme solubili di entrambi i tipi di recettore per l'IL-1 e soprattutto la sintesi endogena di un antagonista recettoriale dell'IL-1.

Quando questa stretta regolazione viene a mancare si ha un'iperproduzione di IL-1, che si traduce infine nelle manifestazioni tipiche delle malattie infiammatorie croniche¹².

1.2 ANTAGONISTA DEL RECETTORE PER IL-1

L'antagonista del recettore per l'IL-1 (IL-1Ra) è il terzo membro della famiglia dell'IL-1; viene prodotto e secreto da quasi tutte le cellule che esprimono IL-1.

Sono state identificate tre isoforme di IL-1Ra. Un'isoforma della citochina (sIL-1Ra) di circa 17 kDa, viene prodotta con diversi gradi di glicosilazione (22-25 kDa) per lo più da monociti, macrofagi, neutrofili, epatociti, cellule della microglia¹³, mentre due isoforme sono intracellulari (icIL-1Ra_I e icIL-1Ra_{II}) di circa 18 e 16 kDa.

Il gene che codifica per il IL-1Ra viene prima trascritto in una singola catena di mRNA che, successivamente, può essere clivata e riarrangiata in più forme.

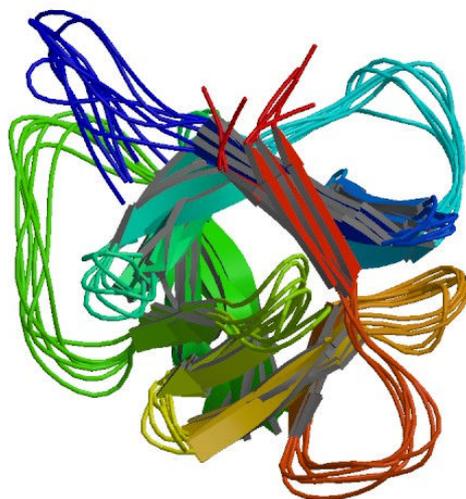


Figura 4 Struttura tridimensionale di IL-1Ra.

La forma intracellulare manca della sequenza di indirizzamento al reticolo endoplasmatico, quindi non viene glicosilata e rimane nel citoplasma delle cellule¹⁴.

Le isoforme intracellulari sono state individuate prevalentemente in cheratinociti e altre cellule epiteliali e, in misura minore, in monociti e macrofagi. Esiste un'ulteriore isoforma intracellulare (icIL-1Ra_{III}), ed è una variante di splicing della seconda isoforma intracellulare che è stata trovata prevalentemente in epatociti e neutrofili.

È stata studiata anche l'affinità per il recettore delle varie isoforme di IL-1Ra; è stato dimostrato che la forma solubile (extracellulare) e le prime due isoforme intracellulari hanno pari affinità mentre la terza isoforma intracellulare mostra un'affinità molto inferiore per il recettore⁸.

IL-1Ra funziona come un antagonista competitivo del recettore, poiché lega entrambi i tipi di recettore per l'IL-1 (IL-1RI e IL-1RII), ma non attiva in alcun caso la cascata di segnali; infatti, mentre in presenza di IL-1 le porzioni intracellulari del recettore (IL-1RI) e della proteina accessoria (IL-1RAcP) formano un etero dimero che attiva la chinasi IRAK e la successiva cascata di segnali, al contrario il legame di IL-1Ra con il recettore non permette la formazione dell'eterodimero con la proteina IL-1RAcP e quindi non vi è l'attivazione della cascata di segnali.

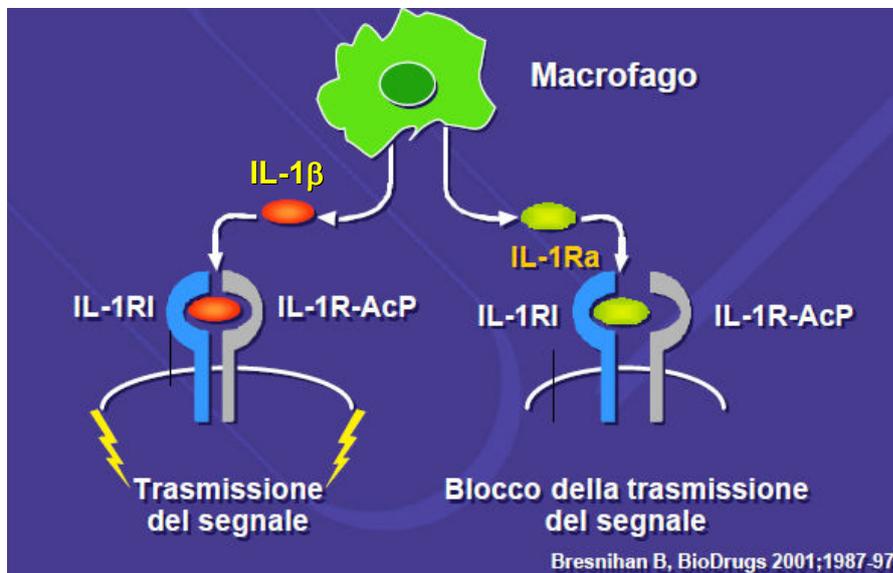


Figura 5 Raffigurazione del legame di IL-1 β e IL-1Ra con il recettore IL-1RI

Come evidenziato in figura 6, il legame di IL-1 β con il recettore avviene tramite due siti detti A e B; la diversa conformazione tridimensionale di IL-1Ra permette invece il legame al recettore solo tramite il sito A, garantendo così l'occupazione del recettore, ma non la modifica conformazionale necessaria per il reclutamento della proteina accessoria. Affinché,

però, si realizzi una inibizione effettiva della IL-1 β , l'IL-1Ra deve comunque occupare almeno il 70-80% dei recettori disponibili¹⁵.

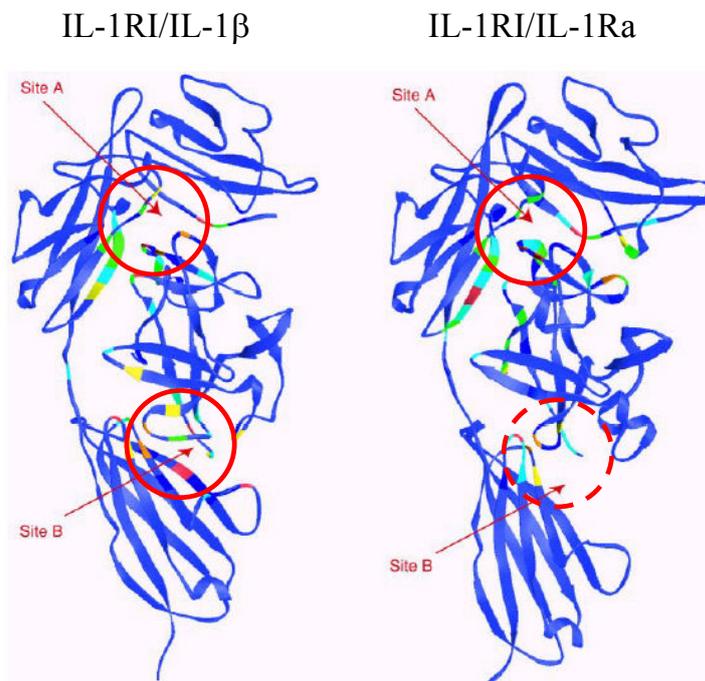


Figura 6 Raffigurazione dei siti di legame al recettore IL-1RI di IL-1 β (sinistra) e di IL-1Ra (destra).

Il gene che codifica per la forma extracellulare di IL-1Ra è inducibile nella maggior parte delle cellule dell'organismo mentre quello che codifica per la forma intracellulare è espresso costitutivamente in cheratinociti e cellule epiteliali intestinali.

La forma extracellulare nativa di IL-1Ra è una proteina glicosilata di 22 kDa, ma la forma ricombinante non glicosilata di IL-1Ra (anakinra) dal peso di 17 kDa conserva una capacità paragonabile di inibire il recettore IL-1RI in vitro.

1.2.1 ATTIVITÀ BIOLOGICA DI IL-1Ra

È stato dimostrato in vitro che la produzione di IL-1Ra può essere indotta stimolando le cellule con varie sostanze coinvolte nei processi infiammatori: IL-4, IL-10, IgG, componenti batterici (es. LPS) o virali. In vivo, quindi, IL-1Ra viene prodotta durante il decorso di patologie sia infiammatorie che infettive. Infatti, durante studi clinici, sono stati rilevati alti livelli plasmatici di IL-1Ra in pazienti con sepsi, patologie reumatiche o in convalescenza post-operatoria¹².

Studi in vivo hanno dimostrato che iniezioni intraperitoneali di LPS in topi knock-out per gene codificante per IL-1Ra sono più letali che per i topi wild-type. È chiaro quindi il ruolo positivo dell'antagonista del recettore dell'IL-1 nel proteggere dagli effetti dello shock settico;

inoltre, modelli animali di malattie infiammatorie croniche sono stati trattati con anticorpi anti-IL-1Ra. Queste ricerche hanno dimostrato che la produzione endogena di IL-1Ra è importante nel controbilanciare l'infiammazione e il danno tissutale dovuti a un eccesso nella produzione di IL-1¹². Quindi, i numerosi studi effettuati sull'IL-1Ra hanno appurato che la sua principale funzione è contrastare gli effetti infiammatori dell'IL-1.

L'isoforma secreta di IL-1Ra può interagire anche con le forme solubili del recettore per l'IL-1, che svolgono un ruolo antiinfiammatorio. Le due isoforme solubili di recettore dell'IL-1 però non dimostrano la stessa affinità per IL-1 e IL-1Ra: sIL-1RII ha maggiore affinità per IL-1 β contribuendo a bilanciarne le azioni infiammatorie; al contrario, però, sIL-1RI ha maggiore affinità per IL-1Ra neutralizzandone così l'effetto antiinfiammatorio¹⁶.

1.3 MALATTIE REUMATICHE CRONICHE

Le malattie reumatiche infiammatorie croniche, caratterizzate da iperproliferazione cellulare e tissutale associata alle sinovie e distruzione articolare, si accompagnano inevitabilmente ad invalidità, ma anche a riduzione della qualità di vita. L'artrite reumatoide e quella psoriasica sono malattie autoimmuni caratterizzate da reazioni infiammatorie a carico del tessuto sinoviale e delle strutture annesse; è noto che le cellule infiammatorie e la loro intensa produzione di sostanze pro infiammatorie, come il TNF e l'IL-1, contribuiscono alla patogenesi di tali malattie.

L'osteoartrosi è la più comune forma di artrite, e la più estesa causa di disabilità nella popolazione anziana. Studi recenti hanno dimostrato che IL-1 e TNF- α sono le principali citochine proinfiammatorie coinvolte nella genesi e nella progressione della degradazione della cartilagine in soggetti affetti da osteoartrosi.

I meccanismi fisiopatologici alla base di tali malattie cominciano ad essere sempre più riconosciuti ed interpretati^{17,18}. Le citochine maggiormente coinvolte nella fisiopatogenesi dell'artrite reumatoide sembrano essere quelle (IL-1, IL-12, TNF α) prodotte dai macrofagi presenti a livello della membrana sinoviale¹⁹.

Nel tessuto e nel liquido sinoviale di soggetti affetti da AR, infatti, IL-1 e TNF α sono le citochine più abbondanti. Le citochine prodotte dai linfociti T-helper (IL-2, IFN γ) sono, invece, presenti a livello sinoviale in quantità modeste anche se coinvolte nelle manifestazioni infiammatorie della patologia.

Questo è stato confermato da studi su modelli animali e poi su pazienti affetti da artrite in quanto le terapie più efficaci si sono dimostrate quelle in grado di ridurre l'attività delle citochine di origine macrofagica (IL-1 e TNF).

A tal fine è possibile somministrare citochine antiinfiammatorie (es. IL-10) o agenti biologici in grado di bloccare l'attività di quelle proinfiammatorie.

I farmaci biotecnologici sono più spesso utilizzati in associazione con farmaci tradizionali quali ad esempio il metotrexato, la ciclosporina A e la leflunomide^{20,21}.

La loro marcata efficacia terapeutica comporta non solo la modulazione del processo reumatico, con conseguente riduzione della durata ed intensità delle riacutizzazioni, ma soprattutto l'arresto del danno strutturale per cui la degenerazione cartilaginea e l'erosione ossea vengono bloccate. Per tale motivo i farmaci biologici sono recentemente divenuti una componente essenziale delle terapie combinate nell'AR in associazione o meno ad altri farmaci già utilizzati prima dell'avvento dei biotecnologici^{22,23}.

1.3.1 RUOLO DELL'IL-1 NELLE PATOLOGIE REUMATICHE

L'IL-1 svolge un ruolo fondamentale nelle manifestazioni delle malattie reumatiche (es artrite reumatoide e osteoartrosi) sia a livello sistemico, sia a livello locale²⁴.

Come già accennato precedentemente, a livello sistemico IL-1 stimola l'insorgenza di sintomi quali febbre, astenia, depressione, disturbi del sonno e dolore muscolare; riduce la concentrazione plasmatica di cortisolo ed, a livello epatico, riduce la sintesi di albumina, apolipoproteine e transferrina. Localmente, favorisce artralgia, lassità tendinea, atrofia muscolare ma soprattutto accelera fenomeni di distruzione osteo-cartilaginea con conseguente deformazione articolare (fenomeni caratteristici delle patologie reumatiche)²⁵.

I meccanismi fisiopatologici responsabili di queste manifestazioni cliniche mediate dall'IL-1 sono stati ampiamente studiati e riportati in letteratura²⁶.

Tra le principali azioni proinfiammatorie di IL-1, occupa un ruolo da protagonista l'attivazione dei geni per la COX-2 e per la ossido nitrico sintetasi (iNOs), con conseguente stimolazione della produzione di prostaglandine infiammatorie e di ossido nitrico. Inoltre IL-1 induce l'espressione aumentata di molecole di adesione come ICAM-1 e VCAM-1, responsabili del reclutamento di cellule infiammatorie verso l'area di flogosi²⁷.

Un ulteriore effetto di IL-1 è quello di indurre la trascrizione di un fattore (RANKL) che stimola il riassorbimento osseo da parte degli osteoclasti, nonché di stimolare direttamente gli osteoclasti e di indurre l'apoptosi negli osteoblasti²⁸.

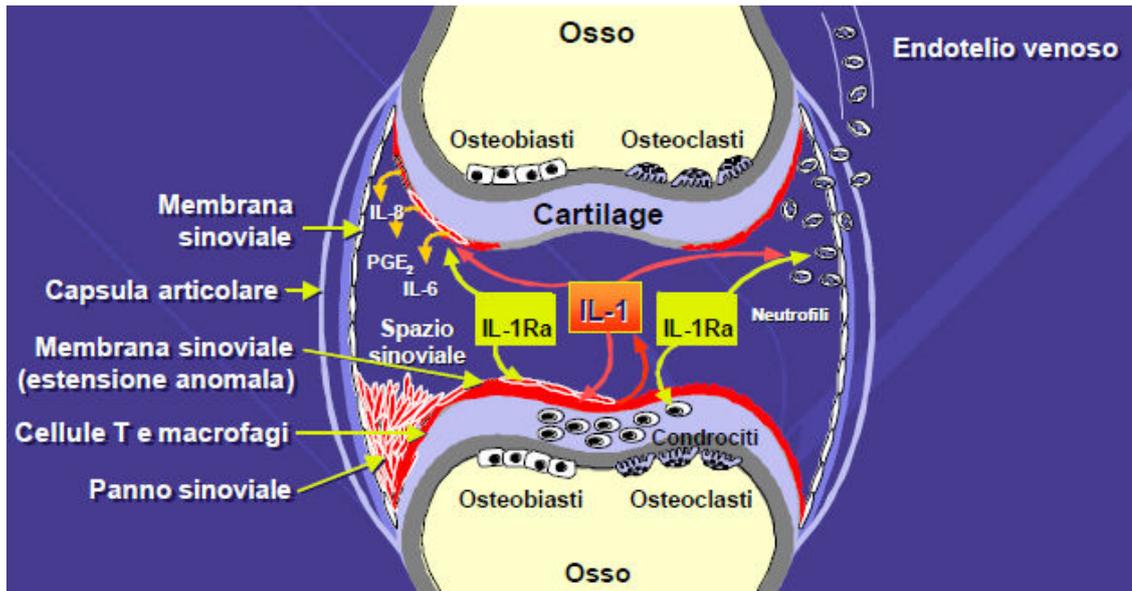


Figura 7 Ruolo di IL-1 e IL-1Ra nell'articolazione patologica Figura adattata da :Dinarello C, Moldawer L. *Proinflammatory and Anti-inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis: A Primer for Clinicians*. 3rd ed. Thousand Oaks, Ca, USA: Amgen Inc.; 2001.

1.4 ARTRITE REUMATOIDE

L'artrite reumatoide è una sindrome a decorso cronico, caratterizzata da un'inflammatione non specifica e generalmente simmetrica delle articolazioni periferiche, che può evolvere in una distruzione progressiva delle strutture articolari e periarticolari, con o senza manifestazioni generalizzate.

Una predisposizione genetica è stata identificata e, nelle popolazioni bianche, localizzata a carico di un pentapeptide nel locus HLA-DR b₁ dei geni di istocompatibilità di classe II; possono essere coinvolti anche fattori ambientali.

Il tessuto sinoviale viene infiltrato principalmente da linfociti T helper e da macrofagi, responsabili della produzione di citochine infiammatorie. Partecipano alla patogenesi dell'artrite reumatoide gli immunocomplessi, responsabili di vasculite, che si ritrovano elevati nel liquido sinoviale assieme a diversi autoanticorpi (fattori reumatoidi ed anticorpi anti peptidi ciclici citrullinati).

Nel tessuto sinoviale vi è un aumento progressivo di cellule macrofagiche e di linfociti; questo ha come conseguenza l'ispessimento della membrana sinoviale dovuto a ipertrofia e iperplasia delle cellule di rivestimento. I fibroblasti, stimolati dalle citochine infiammatorie producono enzimi come la collagenasi che portano alla degradazione della cartilagine; i linfociti e i macrofagi producono IL-1 e IL-2 in abbondanza, fattore reumatoide e altre immunoglobuline. Questo ambiente fortemente infiammato può causare lentamente la distruzione della cartilagine, dell'osso subcondrale e infine della capsula articolare.

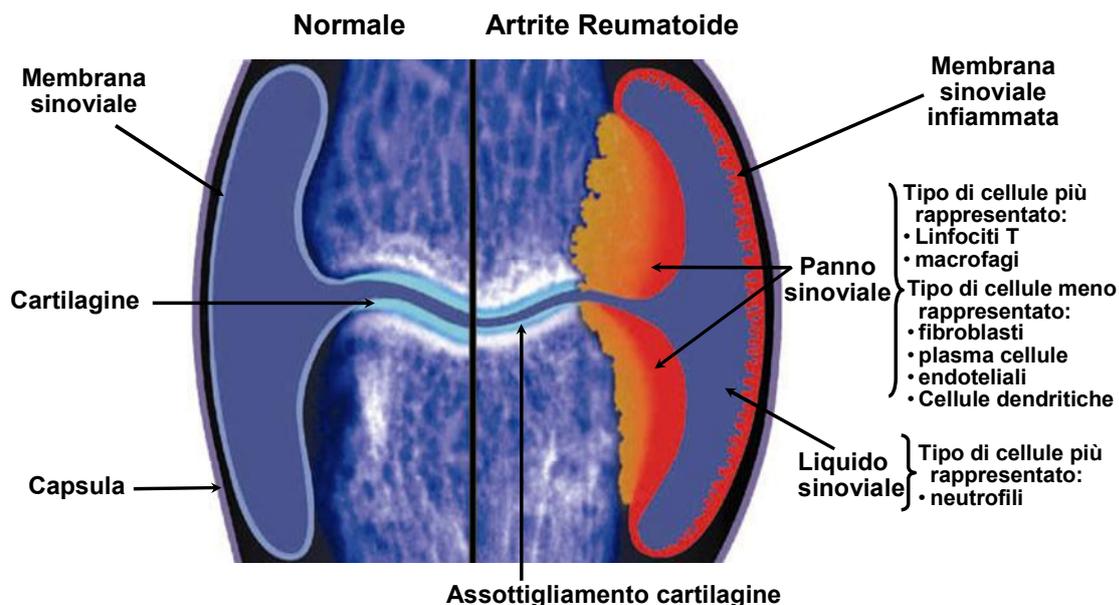


Figura 8 Confronto schematico tra un'articolazione sana ed una affetta da artrite reumatoide. Adattato da Feldmann M, et al. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:397-440.

La patologia può avere un esordio acuto, con interessamento poliarticolare, oppure più lento, con coinvolgimento progressivo di più articolazioni. Il sintomo più evidente è il dolore proveniente dalle articolazioni interessate; progressivamente vi è ispessimento della membrana sinoviale in tutte le articolazioni colpite.

Vi è spesso rigidità mattutina delle articolazioni o dopo lunga inattività. Spesso la patologia evolve rapidamente portando a deformazioni soprattutto delle mani; vi può essere anche l'insorgenza di sindrome del tunnel carpale.

All'analisi del liquido sinoviale, questo risulta sempre alterato, opaco sebbene sterile, di viscosità ridotta e con concentrazione di 3000-5000 leucociti/ml. Tra i leucociti solitamente presenti sovrabbondano i polimorfonucleati e meno del 50% è costituito da linfociti e altri mononucleati.

1.4.1 TERAPIA FARMACOLOGICA DELL'ARTRITE REUMATOIDE

1.4.1.1 FANS

L'utilizzo di FANS può portare sollievo sintomatico agli stati infiammatori della patologia, ma non altera il decorso della malattia.

I salicilati sono medicinali economici, dalle proprietà analgesiche ed antiinfiammatorie; il loro utilizzo prolungato, però, può causare effetti come l'erosione ed il sanguinamento

gastrico. L'associazione di misoprostolo o di inibitori della pompa protonica può essere utile nel diminuire i danni causati dalla somministrazione di salicilati.

Esistono molti altri farmaci antiinfiammatori non steroidei, caratterizzati da specificità più elevata verso la cicloossigenasi di tipo 2; i FANS che possono inibire, infatti, soltanto o principalmente la COX-2, non hanno molti degli effetti collaterali tipici dei farmaci che inibiscono anche l'enzima COX-1.

1.4.1.2 CORTICOSTEROIDI

I corticosteroidi sono antiinfiammatori molto efficaci e potenti; i loro benefici nell'AR, però, spesso diminuiscono con il progredire della terapia. Questi farmaci non sono in grado di prevenire la progressiva distruzione articolare e la loro sospensione spesso causa riacutizzazioni dei sintomi.

Questi medicinali sono causa di molti effetti collaterali a lungo termine: ad esempio problemi gastrointestinali e aumento del rischio di infezioni.

In molti casi l'utilizzo di corticosteroidi porta a risoluzione immediata dei sintomi della patologia e vi si può ricorrere nelle riacutizzazioni dell'AR. L'uso cronico deve essere evitato a causa degli effetti collaterali. In caso di infiammazioni particolarmente violente di una o più articolazioni, cortisonici come triamcinolone, prednisolone o tributilacetato possono essere somministrati per via intraarticolare.

1.4.1.3 IDROSSICLOROCHINA

Pazienti affetti da AR lieve o di moderata intensità possono trarre parziale beneficio dalla terapia con idrossiclorochina. Gli effetti collaterali di questo farmaco sono piuttosto rari e generalmente lievi comprendendo dermatiti, miopatie e opacità corneale reversibile. L'evento avverso, potenzialmente grave, della degenerazione retinica irreversibile è prevenibile purché il paziente si sottoponga a controlli oculistici periodici in corso di trattamento con il farmaco.

1.4.1.4 SULFASALAZINA

La sulfasalazina (salazopirina) è un efficace farmaco antireumatico in grado di modificare l'andamento della malattia. I suoi principali effetti sfavorevoli sono la nausea, il vomito e il dolore epigastrico. I pazienti devono essere controllati periodicamente con l'emocromo e i test di funzionalità epatica.

1.4.1.5 FARMACI CITOTOSSICI O IMMUNOSOPPRESSORI

I farmaci citotossici ed immunosoppressori come metotrexato, azatioprina e ciclosporina vengono impiegati frequentemente nel trattamento di pazienti con artrite in forma grave.

Sono medicinali in grado di sopprimere l'infiammazione e di ridurre così le dosi di FANS e corticosteroidi. Bisogna però tenere conto che l'utilizzo di questi farmaci può dare luogo ad effetti collaterali molto gravi quali, depressione del midollo osseo, tossicità epatica, aumentato rischio di patologie respiratorie e neoplastiche. I pazienti cui vengono somministrate tali terapie devono, quindi, essere tenuti sotto stretto controllo medico per monitorare la possibile insorgenza di gravi complicanze.

In un recente trial, l'idrossiclorochina, la sulfasalazina e il metotrexato utilizzati insieme si sono dimostrati più efficaci che il metotrexato da solo o gli altri due farmaci insieme.

1.4.1.6 SALI D'ORO

I sali d'oro (es. sodio aurotiomalato o aurotioglucosio) sono spesso associati ai FANS, per migliorare i sintomi infiammatori e possono in alcuni pazienti ridurre notevolmente la sintomatologia. Dopo un primo periodo di trattamento a dosi elevate, necessario per ottenere il massimo miglioramento, i benefici possono essere conservati per diversi anni con terapia di mantenimento; questi medicinali sono controindicati in pazienti affetti da patologie renali o epatiche; possono essere causa di molti effetti più o meno gravi, a livello renale, cutaneo, polmonare.

1.4.1.7 FARMACI BIOTECNOLOGICI

Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi farmaci biotecnologici per la terapia delle patologie reumatiche come l'artrite reumatoide. Il primo tra questi è stato Etanercept, una proteina di fusione, costituita dal recettore per il TNF legato al frammento Fc di una immunoglobulina; questo farmaco viene somministrato due volte alla settimana.

Sono stati inoltre sviluppati e commercializzati anticorpi monoclonali anti-TNF α . In un primo momento Infliximab, un anticorpo chimerico, umano al 75% e murino per il restante 25%; successivamente è stato approvato Adalimumab, un anticorpo monoclonale anti-TNF completamente umano.

I farmaci biologici possono favorire le patologie infettive. Nei pazienti in trattamento con Etanercept, Infliximab, Adalimumab e Anakinra le infezioni più frequenti comprendono sinusiti, infezioni urinarie, faringiti, polmoniti e celluliti. Inoltre, diverse infezioni opportunistiche sono state osservate inclusi herpes zoster, infezioni fungine, herpes simplex e

candida. Sono stati rilevati altresì casi di Tuberculosis (TBC) polmonare ed extrapolmonare, polmoniti da pneumocystis carini, aspergillosi listeriosi e cryptococcosi.

La sicurezza della terapia con farmaci biologici non è stata ancora stabilita nelle infezioni virali croniche comprese le infezioni da virus HIV e virus dell'epatite B e C.

Casi di insufficienza cardiaca acuta e casi di linfomi non Hodgkin sono stati riportati nella sorveglianza post-marketing per agenti biologici anti-TNF α .

Pur non essendo ancora definita con certezza l'associazione tra aumentata incidenza di linfomi e trattamento con farmaci anti-TNF, vi è al riguardo particolare attenzione. Preoccupazioni derivano dal fatto che: a) diverse malattie autoimmuni (tra cui l'artrite reumatoide) si associano di per se ad una più elevata incidenza di neoplasie (linfomi), b) i pazienti che ricevono farmaci anti-TNF, spesso hanno subito in precedenza trattamenti con altri farmaci potenzialmente induttori di neoplasie (azatioprina, ciclofosfamide, ciclosporina), c) il trattamento con farmaci anti-TNF è frequentemente cronico, d) il TNF è una molecola chiave nelle sorveglianza immunitaria contro i tumori, ed in definitiva non si conoscono gli effetti della sua soppressione a lungo termine, e) il blocco del TNF, alterando le difese immunitarie, può portare alla riattivazione di infezioni virali latenti. Alcuni virus (EBV, HLTV, HPV) possono essere responsabili dell'insorgenza di linfomi ed altre neoplasie.

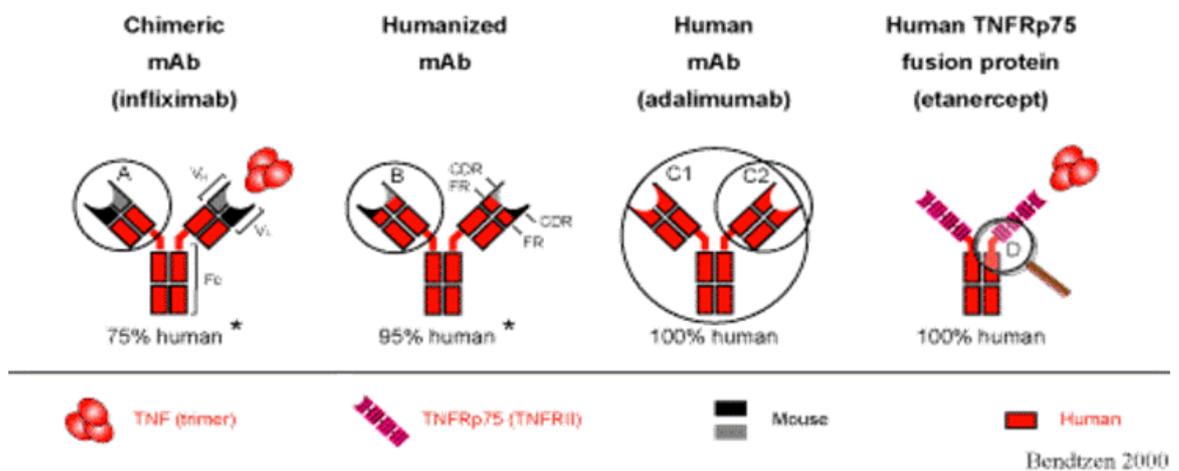


Figura 9 Agenti anti-TNF

1.4.2 RUOLO DELL'IL-1RA NELLA TERAPIA DELL'ARTRITE REUMATOIDE

A causa dell'elevato numero di recettori per l'IL-1 e della spiccata sensibilità di questi alla citochina, IL-1Ra deve essere presente in grande eccesso affinché vi sia un blocco degli effetti infiammatori di IL-1.

Nel liquido sinoviale di pazienti affetti da AR si riscontrano sempre IL-1 β , IL-1Ra e le forme solubili di tipo I e II del recettore della IL-1 (sIL-1R_I e sIL-1R_{II})²⁹.

Poiché IL-1Ra e le forme solubili del recettore per l'IL-1 sono in grado di contrastare le attività infiammatorie di quest'ultima, è chiaro che il rapporto tra queste proteine diviene fondamentale nel definire la gravità della patologia.

Nelle forme patologiche meno gravi si riscontrano, nel liquido sinoviale, concentrazioni più alte di IL-1Ra e più basse di IL-1, mentre questo rapporto si inverte nei pazienti con sintomatologia più grave.

Tuttavia, in molti pazienti, nonostante IL-1Ra sia prodotta in quantità superiore ad IL-1, non si raggiunge un eccesso di 10-100 volte, il quale permette di ottenere un blocco efficace degli effetti infiammatori di IL-1.

L'efficacia dell'IL-1Ra endogeno, nel contrastare gli effetti infiammatori e degenerativi di IL-1, viene spesso ridotta dalle basse concentrazioni di questo antagonista a livello sinoviale, insufficienti per controllare una intensa flogosi.

La somministrazione di IL-1Ra ricombinante (Anakinra) nei pazienti affetti da AR rappresenta una opportunità preziosa, che va ad affiancarsi all'utilizzo in terapia di farmaci biotecnologici in grado di bloccare l'azione del TNF- α , l'altra citochina proinfiammatoria corresponsabile delle manifestazioni patologiche dell'AR³⁰.

1.5 OSTEOARTROSI

L'osteoartrosi (OA) è una patologia degenerativa delle articolazioni; è forse la più comune di tutte le patologie articolari, inizia in modo asintomatico tra i 20 e i 30 anni ed è molto diffusa tra le persone maggiori di 70 anni. Quasi tutti i soggetti intorno ai 40 anni mostrano qualche alterazione delle articolazioni sottoposte al carico, benché spesso pochi di essi mostrino una sintomatologia. Entrambi i sessi sono colpiti anche se con esordio più precoce nel maschio.

L'OA può essere primaria (idiopatica) e secondaria (con fattori causali noti). L'OA primaria coinvolge le articolazioni interfalangee distali e prossimali, la prima articolazione carpo-metacarpale, i dischi intervertebrali e le apofisi articolari vertebrali della colonna nei tratti cervicale e lombare, la prima articolazione metatarso-falangea, l'anca, il ginocchio. Esistono forme di OA primaria erosiva e infiammatoria.

L'OA secondaria sembra essere causata da particolari condizioni come anomalie articolari o genetiche congenite, infezioni, malattie metaboliche, neurologiche, traumi, artrite reumatoide, gotta o uso eccessivo e prolungato di un particolare gruppo articolare (malattie professionali).

Normalmente le articolazioni hanno un coefficiente di frizione basso e sono in grado di sostenere un utilizzo intenso ed anche traumi di una certa entità. La cartilagine ialina non presenta vascolarizzazione né innervazione; è costituita principalmente da acqua, da una matrice extracellulare e da un 5% di condrociti. La compressione esercitata dal peso del corpo e dal movimento sposta i liquidi dalla cartilagine allo spazio articolare e ai vasi adiacenti, mentre il rilasciamento consente alla cartilagine di riespandersi, idratarsi e assorbire nutrienti.

In corso di OA, a causa di una modificazione del microambiente, i condrociti aumentano la velocità di duplicazione e la sintesi di proteoglicani e collagene di tipo II; gli osteoblasti subcondrali, probabilmente stimolati dagli stessi condrociti, aumentano la sintesi ossea. Questi processi causano un cambiamento nelle caratteristiche dell'articolazione: l'osso diventa più rigido, si ha creazione di microfratture, formazione di speroni ossei.

L'esordio è graduale, generalmente con interessamento di una sola o poche articolazioni. Il dolore è il sintomo più precoce e abitualmente si aggrava con l'esercizio e migliora con il riposo. La rigidità mattutina è presente dopo inattività, ma dura < 15-30 min e migliora con il movimento. Con il progredire della OA la motilità articolare diminuisce e compaiono dolorabilità e sensazioni di crepitazione o di scrosci.

Una progressiva e lenta degenerazione si verifica a carico della cartilagine, dell'osso subcondrale, della capsula articolare, dei legamenti, dei tendini e della membrana sinoviale e può manifestarsi versamento articolare che produce il tipico gonfiore articolare dell'OA. Solitamente non si sviluppa una grave e acuta sinovite. Nell'articolazione affetta da OA, delle forme più gravi, si osservano nei monociti periferici livelli maggiori di IL-1 β , mentre nelle forme meno gravi sono presenti livelli maggiori di IL-1Ra.

L'osteoartrosi nell'anca è caratterizzata da graduale diminuzione della funzionalità conseguente all'aumento di rigidità e alla perdita di ampiezza di motilità articolare.

Nel ginocchio vi è una perdita di cartilagine nel 70% dei casi, si manifesta una minore stabilità dell'articolazione dovuta alla lassità legamentosa e vi è insorgenza di dolore locale dovuto ai legamenti e ai tendini. Si possono presentare anche spasmi muscolari e si possono verificare dei blocchi funzionali dell'articolazione dovuti agli osteofiti o a frammenti ossei che si muovono nello spazio articolare.

1.5.1 TERAPIA DELL'OSTEOARTROSI

Le linee guida per la terapia dell'OA dell'anca e del ginocchio sono state approvate in vari convegni internazionali^{31,32,33,34}. Queste includono terapie non farmacologiche (riduzione

della disfunzione biomeccanica e di altri fattori di rischio modificabili), terapie occupazionali e fisiche, terapie farmacologiche (analgesici topici, integratori alimentari come glucosamina e condroitin solfato, analgesici orali, farmaci antinfiammatori non steroidei), e iniezioni intraarticolari di corticosteroidi e di ialuronato^{17,18,19,20}.

Non ci sono evidenze che l'utilizzo dei FANS dia benefici a lungo termine; la somministrazione di acetaminofene, aspirina e altri FANS può migliorare temporaneamente i sintomi della patologia. L'utilizzo di anti COX-2 può contribuire ad attenuare gli stati infiammatori, diminuendo i rischi di effetti collaterali a livello gastrointestinale.

I corticosteroidi depot per via intraarticolare possono risultare utili, se somministrati ad intermittenza, quando vi siano versamenti e stati infiammatori. L'uso di acido ialuronico (preparazioni commerciali come Hyalgan e ARTZ), componente fisiologico del liquido sinoviale, ha dimostrato una grande efficacia nel trattamento dell'OA nel ginocchio.

A causa della progressiva distruzione della cartilagine, a lungo andare è spesso necessario effettuare una sostituzione chirurgica della cartilagine articolare^{35,36,37}.

Citochine come l'IL-1, possono svolgere un ruolo fondamentale nello svilupparsi dell'OA, stimolando la sintesi di enzimi proteolitici, altre citochine, ossido nitrico, prostaglandine, e altri effettori e mediatori di infiammazione e degradazione dei tessuti^{38,39,40}.

Il ruolo positivo dell'antagonista del recettore dell'IL-1 (IL-1Ra) è stato dimostrato per la prima volta in pazienti affetti da artrite reumatoide^{41,42}.

La forma umana ricombinante di IL-1Ra, Anakinra, somministrato per via sistemica, può ridurre le infiammazioni articolari e rallentare il corso erosivo della patologia²⁸. Modelli di OA in vitro animali suggeriscono che Anakinra potrebbe avere effetti benefici sui sintomi e sulle modifiche strutturali nell'OA. In questi studi si è scelto di utilizzare la somministrazione intraarticolare per meglio raggiungere la cartilagine danneggiata.

In uno studio per indagare l'effetto di IL-1Ra in un modello canino di OA sperimentale, Anakinra (2 mg o 4 mg due volte a settimana per 4 settimane) o placebo sono stati iniettati nel ginocchio di cani⁴³; nel gruppo trattato con Anakinra sono state osservate significative riduzioni dose-dipendente del numero e delle dimensioni degli osteofiti e delle lesioni della cartilagine. Si è rilevata anche una significativa riduzione dell'espressione della collagenasi 1 nella cartilagine, fornendo un'ulteriore prova del ruolo fondamentale di IL-1 nella degradazione cartilaginea.

Altri due studi condotti su animali hanno dimostrato l'effetto antiinfiammatorio di IL-1Ra nell'OA, usando la metodologia di terapia gene transfer^{44,45}. Rispetto ai gruppi di controllo, i gruppi trattati con IL-1Ra avevano lesioni della cartilagine meno gravi, una significativa

riduzione delle dimensioni degli osteofiti e delle lesioni macroscopiche e istologiche, e significativi miglioramenti degli indici clinici di dolore e di attività della malattia, buono stato di cartilagine e membrana sinoviale. Un studio clinico pilota condotto per esaminare la tollerabilità delle iniezioni intraarticolari di Anakinra in 13 pazienti con OA del ginocchio ha dimostrato che Anakinra alla dose di 150 mg è ben tollerata e porta ad un miglioramento nella funzionalità e ad una riduzione del dolore⁴⁶.

Un successivo studio multicentrico in doppio cieco ha coinvolto invece 170 pazienti affetti da OA, anche bilaterale; i pazienti sono stati randomizzati e divisi in tre gruppi di trattamento: singola iniezione intraarticolare di placebo, Anakinra alla dose di 50 mg o di 150 mg⁴⁷. Gli studi di farmacocinetica effettuati sui pazienti trattati con Anakinra hanno dimostrato che non vi è un effetto depot dovuto all'iniezione intraarticolare e l'emivita plasmatica è di circa 4 ore.

Non vi sono state significative differenze di risposta a lungo termine tra i tre gruppi di trattamento; si sono però osservati alcuni effetti clinici a breve termine di Anakinra. Al quarto giorno la risposta clinica osservata nei gruppi trattati con Anakinra è stata superiore a quella osservata nel gruppo placebo. Questa osservazione suggerisce che Anakinra, con la sua breve emivita plasmatica, può essere efficace nel sollievo dei sintomi dell'OA nel breve termine. Pertanto, l'utilizzo di un inibitore del recettore per l'IL-1 più potente o con un'emivita più lunga potrebbe portare a risultati migliori e più duraturi nella terapia dell'OA.

1.6 IL-1RA UMANO RICOMBINANTE: ANAKINRA

Anakinra è l'antagonista per il recettore dell'IL-1 umano prodotto mediante tecnologia di DNA ricombinante in *E.coli*, ed è stato sviluppato da Amgen (Thousand Oaks, CA); la sequenza aminoacidica di Anakinra si distingue da quella della citochina umana per un residuo metioninico in più, posto all'N-terminale (caratteristica comune di tutte le proteine espresse in *E.coli*). La sequenza aminoacidica di Anakinra (qui sotto riportata) è di 153 residui, ha un peso molecolare di 17.3 kDa ed inoltre non è glicosilata.

```
MRPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKM  
CLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTN  
MPDEGVMVTKFYFQEDE
```

Anakinra viene somministrato per iniezione sottocutanea; la biodisponibilità per sc in individui sani è circa del 95%. La breve emivita di circa 4-6 ore è giustificata dalla rapida metabolizzazione ed escrezione di questa proteina; questo obbliga ad una somministrazione giornaliera per mantenere dei livelli plasmatici efficaci⁴⁸.

Kineret® (Anakinra) viene utilizzato per il trattamento dei segni e dei sintomi dell'artrite reumatoide, spesso in associazione con metotrexato. Il trattamento combinato di Anakinra e MTX ha mostrato una riduzione statisticamente e clinicamente significativa dei segni e dei sintomi dell'AR in pazienti che hanno mostrato una risposta inadeguata al solo MTX.

Il numero di pazienti trattati ogni anno con questo farmaco è in continuo aumento. I benefici, così come gli effetti collaterali relativi alla riduzione dell'attività di queste citochine, richiedono una attenta valutazione del rapporto rischio/beneficio nel trattamento delle malattie croniche a lungo termine.

Gli inibitori dell'IL-1 hanno dimostrato un profilo di sicurezza maggiore rispetto agli antagonisti del TNF soprattutto grazie ai limitati effetti sulle cellule immunocompetenti.

Il trattamento con Anakinra è ben tollerato, infezioni opportunistiche sono rare rispetto a quelle osservate in pazienti trattati con agenti anti-TNF e i più comuni effetti collaterali sono delle reazioni nel sito di iniezione.

Diversi studi hanno dimostrato l'importanza dell'IL-1 quale mediatore chiave di malattie in cui il TNF svolge un ruolo predominante. Il blocco della cascata infiammatoria attivata dall'IL-1 si riflette su molti processi patologici ma permette di evitare uno sbilanciamento dei naturali meccanismi di difesa. La natura cronica di molte patologie articolari infiammatorie (artrite reumatoide, artrosi, artrite psoriasica, spondilite anchilosante, artropatie da cristalli) richiede lo sviluppo di farmaci sicuri e adatti a somministrazioni croniche.

1.7 TERAPIA INTRAARTICOLARE IN REUMATOLOGIA

Le iniezioni intra-articolari (IA) di farmaci sono frequentemente utilizzate sia per le mono/oligo artriti che per le malattie poliarticolari. Esse permettono di minimizzare gli effetti collaterali tipici delle somministrazioni sistemiche, di aumentare la biodisponibilità del farmaco, in particolare lo scarso assorbimento e la rapida *clearance* di molecole proteiche, e di ottenere una concentrazione locale di farmaco sufficiente per un effetto terapeutico. Per tali motivi, lo sviluppo di formulazioni a rilascio prolungato, che consentano di mantenere una concentrazione terapeutica di farmaco intra-articolare per un periodo di qualche settimana, risulta interessante permettendo di ottenere formulazioni con migliorata efficacia.

In ambito farmaceutico sono state sviluppate varie formulazioni per il rilascio prolungato e controllato di farmaci, tuttavia tali formulazioni non sono sempre facilmente adattabili al rilascio di molecole proteiche quali le citochine. Tali molecole sono, infatti, particolarmente fragili per cui la loro manipolazione così come la loro conservazione e rilascio portano spesso a denaturazione, degradazione ed infine inattivazione del farmaco stesso.

1.8 NUOVE TERAPIE ANTI IL-1

1.8.1 TERAPIA GENICA CON IL-1RA

La terapia genica con IL-1Ra sembra dare buone speranze nel trattamento delle patologie reumatiche; in letteratura è riportato che l'insorgenza nel topo dell'artrite indotta da collagene è stata annullata dalla trasfezione dei sinoviociti del ginocchio con il gene codificante per l'IL-1Ra. Sulla base di questi risultati sono stati effettuati degli studi per valutare la possibilità di trattare dei pazienti affetti da AR mediante terapia genica con vettori retrovirali⁴⁹.

La terapia prevede la rimozione chirurgica della sinovia dall'articolazione dei pazienti in attesa di artroprotesi, la trasfezione dei sinoviociti con il gene per l'IL-1Ra e il reimpianto della sinovia al momento della sostituzione chirurgica dell'articolazione.

Questa procedura è stata eseguita, come riportato in letteratura, in nove pazienti affetti da osteoartrosi in attesa dell'intervento di artroprotesi: la terapia è stata ben tollerata e la trasfezione dei sinoviociti è avvenuta con buoni risultati terapeutici⁵⁰.

1.8.2 ANTICORPI MONOCLONALI ANTI IL-1

È stato sviluppato un anticorpo monoclonale anti IL-1 β completamente umano chiamato Canakinumab (ACZ885). Viene somministrato sottocute ogni due settimane. L'efficacia di questo farmaco è stata dimostrata in modelli animali di artrite sperimentale indotta da collagene⁵¹ ed il suo utilizzo clinico è in corso di valutazione. Nella UE e negli Stati Uniti ha ricevuto il riconoscimento di farmaco orfano per il trattamento dell'artrite idiopatica giovanile ad esordio sistemico (SoJIA) e delle sindromi periodiche associate alla criopirina (CAPS). Canakinumab sembra dimostrare delle buone potenzialità cliniche associate ad una buona sicurezza, tanto da assumere in futuro un ruolo fondamentale nella terapia di malattie come l'artrite reumatoide⁵².

1.8.3 IL-1 TRAP

I cosiddetti "IL-1 Trap" sono dei bloccanti delle citochine altamente selettivi. Attualmente è stato commercializzato Riloncept; si tratta di una proteina chimerica (di fusione), composta dal recettore per l'IL-1 e dalla proteina accessoria IL-1RAcP disposti in linea e legati ad una porzione Fc di una IgG umana. È stato dimostrato che questo farmaco è in grado di legare sia IL-1 α che β e, quindi, di inibire in vivo una più vasta gamma di effetti locali e sistemici di IL-1⁵³. L'FDA ha approvato l'utilizzo di questo farmaco per la terapia delle sindromi

periodiche associate alla criopirina (CAPS), delle sindromi familiari autoinfiammatorie (FCAS) e della sindrome di Muckle-Wells (MWS) in adulti e bambini di età superiore ai 12 anni⁵⁴.

Per ottenere un'efficacia terapeutica è necessario somministrare il farmaco due volte alla settimana.

1.9 FARMACI PROTEICI: LIMITI ED OPPORTUNITA'

Una delle più grandi innovazioni in campo terapeutico degli ultimi venti anni è stato sicuramente l'avvento e lo sviluppo dei farmaci biotecnologici. I farmaci proteici, infatti, sono caratterizzati da una elevata selettività ed attività farmacologica che li hanno portati ad essere spesso il trattamento di elezione per molte gravi patologie. Se da un lato, però, questi farmaci sono dotati di un elevato potenziale farmacologico, dall'altro il loro impiego clinico è spesso limitato da inadeguate caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche.

Le macromolecole proteiche, a causa della loro elevata complessità strutturale, sono molto fragili e facilmente inattivabili da processi fisici, chimici ed enzimatici che possono avvenire durante le fasi di formulazione, conservazione e somministrazione.

Spesso la biodisponibilità di questi farmaci è notevolmente ridotta dalla rapida eliminazione dal circolo sanguigno in seguito ad ultrafiltrazione glomerulare e all'uptake epatico. L'elevata idrofilia e il carattere macromolecolare contrastano l'assorbimento attraverso le membrane biologiche rendendone difficile la somministrazione. Spesso, inoltre, l'impiego terapeutico delle macromolecole considerate è limitato dalla loro immunogenicità e antigenicità.

I problemi biofarmaceutici che limitano l'uso di farmaci proteici possono essere in parte superati mediante la realizzazione di innovativi sistemi di formulazione che permettono di migliorarne la stabilità e, in alcuni casi, di controllarne la velocità di rilascio, di ridurre gli effetti collaterali e di ottimizzare il regime di dosaggio, con un conseguente miglioramento della compliance del paziente.

Attraverso approcci multidisciplinari, la tecnologia farmaceutica moderna ha sviluppato nuove ed interessanti tecniche di drug delivery per farmaci proteici quali, ad esempio, microsfele e nanosfele polimeriche e lipidiche, liposomi, assemblati fisici solubili di vario tipo e bioconiugati polimerici.

I progressi degli ultimi decenni in ambito biotecnologico hanno portato alla conoscenza di molti meccanismi cellulari o molecolari alla base di varie patologie, permettendo così l'individuazione di nuovi target farmacologici e la scoperta di nuove molecole proteiche ed

oligonucleotidiche con elevato potenziale terapeutico^{55,56}. Lo sviluppo terapeutico di farmaci di natura peptidica è oggi possibile grazie alle nuove tecniche di fermentazione, ibridoma e di DNA ricombinante, che consentono di ottenere su larga scala farmaci biotecnologici di terza generazione: “proteine ricombinanti altamente modificate (proteine mutate in più posizioni, proteine chimeriche, fusioni di proteine, ecc.), molecole nuove con differenti attività e nuovi impieghi clinici molto diverse dalle proteine naturali”. L’attenzione dell’industria farmaceutica verso i farmaci biotecnologici è in continua crescita e questo grazie ai numerosi vantaggi terapeutici che tali molecole presentano rispetto a farmaci tradizionali. Infatti, le proteine possiedono elevata attività biologica e specificità d’azione, caratteristiche che li rendono spesso agenti terapeutici unici nel trattamento di molte patologie⁵⁷. Farmaci biotecnologici sono impiegati nella terapia antitumorale e antireumatica (anticorpi monoclonali, citochine, recettori solubili di citochine proinfiammatorie ecc.), nella cura di patologie cardiache (enzimi e fattori del sangue), nella cura del diabete (insulina) e nella terapia sostitutiva di malattie genetiche che causano la deficienza di alcune proteine (ormoni ed enzimi).

1.9.1 STABILITÀ DELLE PROTEINE

La conservazione delle caratteristiche strutturali proteiche rappresenta un requisito fondamentale per il mantenimento della loro attività biologica e il principale problema per il loro sviluppo clinico. I principali problemi, che limitano l’impiego di questa classe di farmaci, sono infatti dovuti alla loro elevata complessità e fragilità strutturale che li rendono facilmente inattivabili per denaturazione e degradazione chimica, fisica o enzimatica durante le fasi di produzione, formulazione, conservazione o somministrazione.

Tra i principali meccanismi di degradazione chimica di molecole proteiche vi sono l’ossidazione di cisteine e metionine, la deamidazione di asparagina e glutammina, l’idrolisi di legami peptidici a livello di residui di acido aspartico, fenomeni di β -eliminazione, fenomeni di reticolazione a livello di lisine o cisteine, riduzione o scambio di ponti disolfuro di cistine, isomerizzazione e racemizzazione di aminoacidi. Processi di denaturazione fisica determinano la perdita della struttura tridimensionale delle proteine a livello secondario, terziario e quaternario.

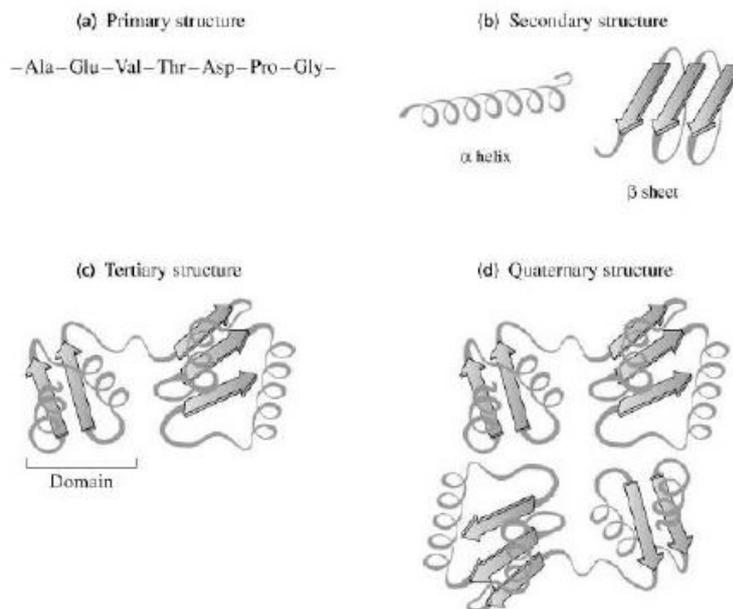


Figura 10 Organizzazione strutturale delle proteine.

Questa complessa organizzazione strutturale dipende da interazioni idrofobiche, elettrostatiche, legami idrogeno, propensità intrinseche, forze di Van der Waals e ponti disolfuro. La rottura di questi legami e la perdita strutturale provoca l'esposizione di aminoacidi idrofobici (Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe Trp, Cys) che normalmente sono disposti all'interno della struttura proteica causando conseguente diminuzione di solubilità, aggregazione, adsorbimento e denaturazione interfacciale. Sebbene i processi di degradazione chimica e fisica siano eventi di diverso tipo, questi avvengono spesso in modo correlato e conseguente. Ad esempio la perdita strutturale di una proteina può dare luogo a fenomeni di degradazione chimica così come una degradazione chimica comporta un processo di denaturazione. Le principali cause di degradazione e denaturazione di proteine sono legate al processo formulativo (temperatura, pressione, forze di taglio, mescolamento e agitazione, radiazioni, atmosfera, solventi organici, contaminanti, pH, forza ionica, radicali liberi, ecc.), all'impiego di eccipienti (polimeri, lipidi, fosfolipidi, ecc.), co-eccipienti e additivi (tamponi, sali, agenti chelanti, gas inerti, surfattanti, stabilizzanti, zuccheri, polimeri, aminoacidi, conservanti ecc.), alla concentrazione.

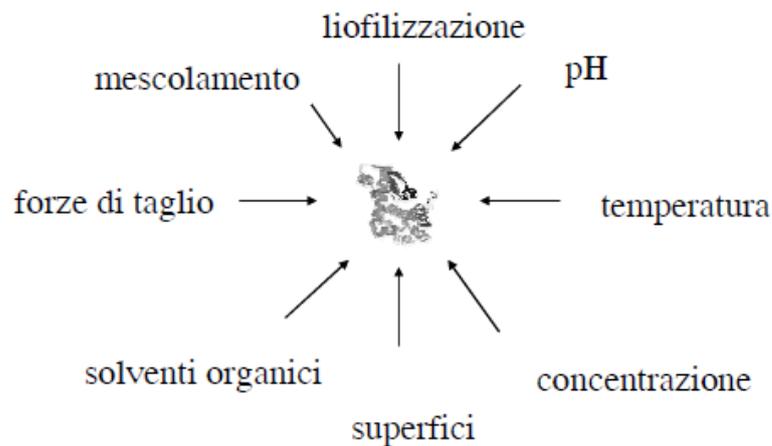


Figura 11 Principali cause di degradazione delle proteine. Figura adattata da : Kissel T, Koneberg R. 1996.

Un altro importante fattore di instabilità è costituito dagli enzimi proteolitici. Endo- ed esopeptidasi catalizzano la reazione di idrolisi dei legami peptidici e provvedono alla frammentazione della catena polipeptidica. Tali enzimi sono ubiquitari e sono altamente rappresentati a livello della maggior parte dei tessuti biologici per cui la degradazione enzimatica rappresenta uno dei principali fattori che limitano la stabilità di questi farmaci durante la somministrazione. In particolare l'elevato contenuto di enzimi proteolitici nelle membrane intestinali e polmonari riduce fortemente la biodisponibilità di farmaci proteici in seguito a somministrazione orale e polmonare. Per questa ragione, questi farmaci vengono principalmente somministrati per via endovenosa, sottocutanea o intramuscolare e difficilmente vengono somministrati per vie che prevedono una fase di assorbimento. Una volta somministrati, inoltre, subiscono rapida clearance dal circolo plasmatico. Peptidi e proteine con peso molecolare inferiore ai 65 kDa vengono usualmente eliminati per via renale, mentre proteine con peso molecolare maggiore possono essere eliminate per via renale dopo frammentazione, oppure vengono eliminate attraverso altre vie quali ad esempio la via epatica. Il cut-off di 65 kDa è stato calcolato sulla base del peso molecolare di albumina che in condizioni fisiologiche non subisce ultrafiltrazione renale e viene trattenuta nel circolo sanguigno.

L'intrinseco carattere immunogenico e antigenico delle proteine rappresenta un ulteriore importante limite all'impiego terapeutico di molecole proteiche. Proteine eterologhe, ottenute da piante, microrganismi, o di origine animale presentano un elevato carattere immunogenico a causa delle significative variazioni strutturali rispetto alle proteine umane.

Tuttavia, anche nel caso di proteine omologhe, i processi di estrazione da organi e tessuti, di manipolazione e di conservazione possono indurre variazioni strutturali nella proteina e renderla di conseguenza immunogenica ed antigenica.

Sebbene i nuovi processi di tecnologia ricombinante abbiano in parte risolto il problema di approvvigionamento di proteine omologhe, il problema dell'immunogenicità di farmaci proteici rimane aperto. Proteine ricombinate umane, ottenute da microrganismi o da cellule di mammifero, possono presentare un carattere immunogenico in seguito a variazioni sequenziali strutturali, quali mancata o anomala glicosilazione. Inoltre, alterazioni strutturali possono verificarsi durante le fasi di produzione e purificazione^{58,59,60}.

E' pertanto chiaro che, per favorire l'impiego in terapia dei farmaci proteici, è necessario sviluppare nuove strategie formulative che consentano di superare almeno in parte i limiti chimico-fisici, farmacocinetici ed immunologici. In questo senso sono state seguite sostanzialmente due vie di sviluppo differenti ma strettamente correlate tra loro: l'ottenimento di nuovi derivati proteici con migliori proprietà biofarmaceutiche rispetto alla proteina nativa di riferimento e lo sviluppo di nuove formulazioni.

1.10 SISTEMI DI DELIVERY PER FARMACI PROTEICI

Negli ultimi anni, grazie ad un approccio multidisciplinare che coinvolge vari settori della ricerca, quali la chimica dei polimeri, la bioingegneria, la biochimica e la fisiologia, la moderna tecnologia farmaceutica ha sviluppato diversi sistemi di drug delivery per farmaci proteici. Tali sistemi sono progettati in modo da migliorare la performance terapeutica del farmaco proteico mediante rilascio lento e prolungato, aumentata permanenza in circolo, migliore solubilità e stabilità, facile assorbimento attraverso le membrane, ridotta immunogenicità e antigenicità, ecc. Tra le più studiate formulazioni per il delivery di proteine vi sono micro- e nano-particelle polimeriche, lipidiche o inorganiche, sistemi solubili supramolecolari fisici quali micelle, liposomi, assemblati di diverso tipo, bioconiugati⁶¹.

1.10.1 SISTEMI SUPRAMOLECOLARI COLLOIDALI

Sistemi supramolecolari solubili sono formati per aggregazione spontanea di macromolecole idrofiliche o anfifiliche mediante interazioni deboli di Van der Waals, ioniche, legami ponte idrogeno, ecc. Tipici esempi di sistemi supramolecolari solubili sono: liposomi, micelle, aggregati, complessi macromolecolari, bioconiugati proteici, gel e vescicole⁶².

I liposomi sono vescicole colloidali formate da un doppio strato fosfolipidico simile alle membrane biologiche. Per la loro elevata biocompatibilità e capacità di intrappolare sia

molecole idrofiliche, nel core acquoso, che lipofile, nel doppio strato fosfolipidico, sono ampiamente studiati per il delivery di farmaci a basso peso molecolare e proteici. I liposomi possono essere somministrati attraverso tutte le vie di somministrazione provvedendo sia ad un rilascio locale che sistemico del farmaco e favorendo l'assorbimento di farmaci attraverso le mucose grazie ad una prolungata permanenza in circolo e alla capacità di fondersi con le membrane cellulari e rilasciare il farmaco selettivamente in cellule e tessuti bersaglio. La tecnologia moderna consente di ottenere liposomi con diversa composizione e struttura rendendo tali formulazioni particolarmente versatili. In particolare i liposomi possono essere derivatizzati sulla superficie con molecole in grado di modificarne il carattere idrofilico/lipofilo o con molecole direzionanti. L'uso di polimeri anfifilici, quali il polietilenglicole, ha permesso di ottenere liposomi di tipo "stealth" che prevengono l'adsorbimento sulla superficie di opsonine. In tal modo si previene l'uptake da parte di cellule fagocitiche e si ottengono long-circulating liposomes con prolungata permanenza nel circolo sanguigno. La derivatizzazione di liposomi con anticorpi, frammenti di anticorpi o altre molecole quali transferrina e acido folico ha permesso di ottenere vescicole con selettività per alcune cellule e tessuti e quindi utilizzabili nel targeting attivo⁶³.

I sistemi micellari sono strutture sovramolecolari con dimensioni variabili tra 10-100 nm ottenute per assemblamento spontaneo di molecole anfifiliche. Questi sistemi sono stati sviluppati per veicolare farmaci poco solubili la cui attività farmacologica è compromessa dalla bassa biodisponibilità. Nel caso della veicolazione di farmaci proteici la frazione lipofila dei polimeri può inserirsi in tasche idrofobiche delle proteine, mentre la frazione idrofila rimane all'esterno garantendone il mantenimento della solubilità. Alcuni materiali impiegati per questi scopi sono i derivati polimerici denominati Medusa® in cui una catena idrofobica di poli-leucina è legata ad una catena idrofila di PEG. Altri polimeri anfifilici impiegati per

la preparazione di questi super-assemblati sono poliidrossiaspartammidi o pullulani aggraffati con molecole alchiliche. Le proprietà di self-assembling di polimeri anfifilici lineari, o con struttura "comb-like", permettono di ottenere aggregati supramolecolari o micellari-simili capaci di inglobare la proteina nel core idrofobico e di proteggerla dal riconoscimento del sistema immunitario e di enzimi proteolitici, di garantire un lento rilascio dopo somministrazione parenterale o sottocutanea con conseguente aumento della emivita plasmatica della proteina stessa^{64,65,66}.

1.10.2 BIOCONIUGAZIONE

Con il termine “bioconiugazione” si intende la modifica covalente di sostanze ad attività biologica con molecole o macromolecole con particolari caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche. Nel caso di proteine terapeutiche una delle più comuni applicazioni della bioconiugazione è il legame di polimeri solubili sulla superficie proteica che consente di ottenere bioconiugati supramolecolari con migliori caratteristiche terapeutiche rispetto alla proteina nativa.

La prospettiva strutturale e funzionale dei bioconiugati proteina-polimero è molto diversa da quella dei bioconiugati che si ottengono con farmaci a basso peso molecolare e polimeri. In quest'ultimo caso infatti il polimero svolge il ruolo di carrier macromolecolare in cui molecole di farmaco a basso peso vengono legate covalentemente e rilasciate attraverso processi di idrolisi chimica o enzimatica a livello di tessuti bersaglio dove svolgono la loro azione terapeutica. Questi sistemi si ottengono generalmente utilizzando polimeri multifunzionali che consentono il legame di varie molecole di farmaco al backbone polimerico. Al contrario, per la preparazione di bioconiugati proteina-polimero vengono impiegate una o più catene polimeriche monofunzionali che vengono legate alla superficie proteica. Il polimero, infatti, non svolge funzione di trasportatore, ma conferisce al farmaco proteico un elevato volume idrodinamico ed una maggiore solubilità, proteggendolo dal riconoscimento enzimatico e del sistema immunitario.

Solitamente il legame polimero-proteina è un legame stabile in condizioni fisiologiche e quindi il bioconiugato proteico svolge la sua azione biologica come tale e non in seguito al distacco del polimero dalla proteina. E' quindi chiaro che la strategia di modifica di proteine con polimeri ricopre un ruolo chiave nell'ottenimento di derivati con adeguate caratteristiche chimico-fisiche, immunologiche, farmacocinetiche e di conseguenza terapeutiche⁶⁷. In Figura 12 sono riportati alcuni esempi di strategie di bioconiugazione che si possono seguire per la modifica di proteine.

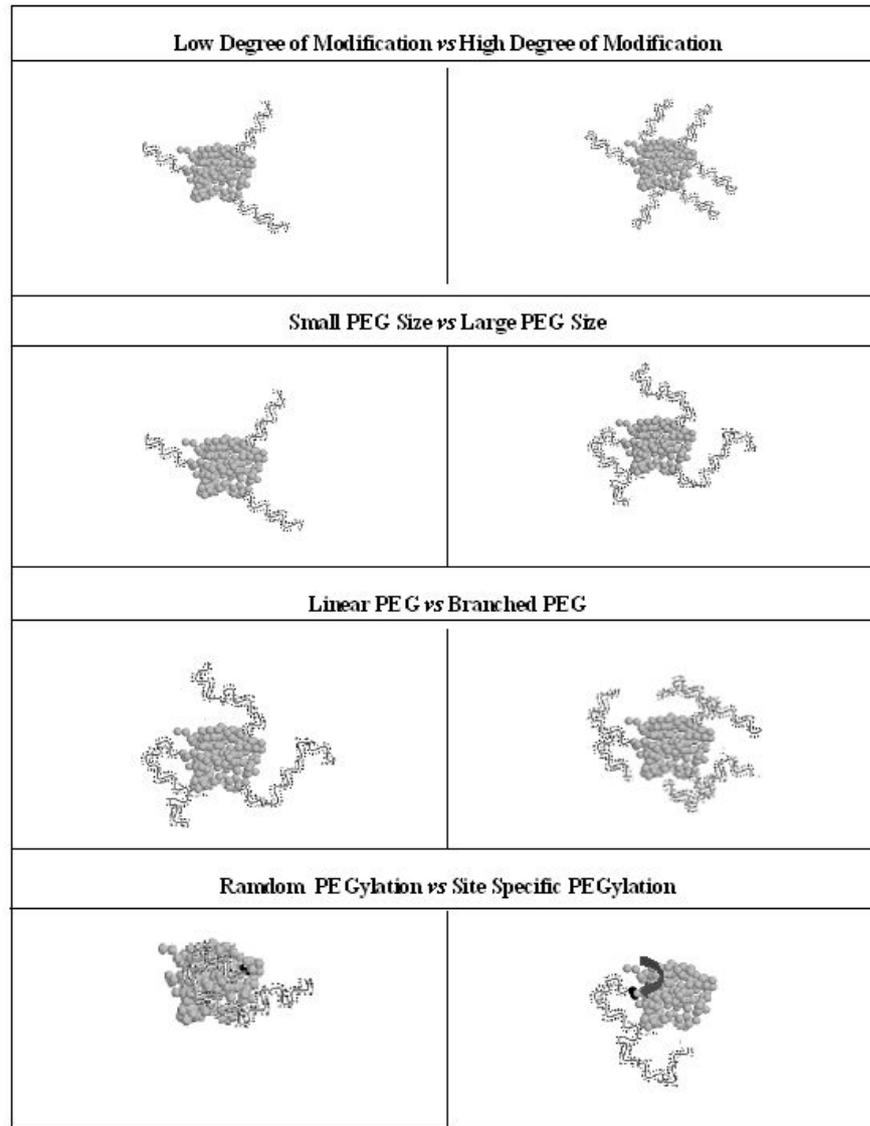


Figura 12 Differenti modelli di coniugati proteici che si possono ottenere per bioconiugazione. Figura adattata da Salmaso S, Bersani S, Semenzato A, Caliceti P. *Nanotechnologies in protein delivery*. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006; 6: 2736-2753.

Dal punto di vista chimico la bioconiugazione di proteine con polimeri preformati può essere schematicamente suddivisa in due principali categorie (Figura 13): metodi di bioconiugazione diretta (A) e di bioconiugazione indiretta (B)⁶⁸.

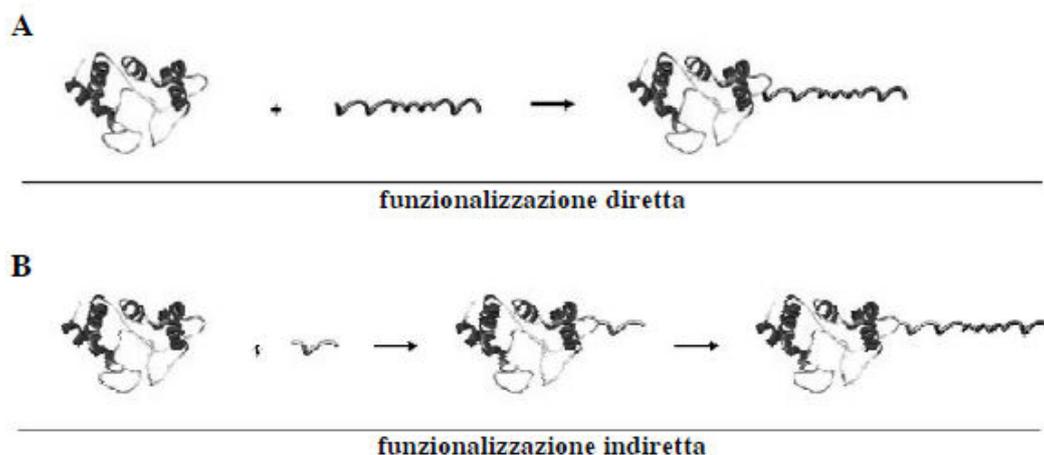


Figura 13 Rappresentazione schematica di possibili strategie di bioconiugazione di proteine: metodo di funzionalizzazione diretta (A) e metodo di funzionalizzazione indiretta (B) Figura adattata da Thordarson P, Le Droumaguet B, Velonia K. Well-defined protein–polymer conjugates synthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 73: 243-254.

Nel primo caso la proteina viene direttamente derivatizzata con polimeri a livello di alcuni siti di ancoraggio naturali, quali i residui aminoacidici o glicosilici esposti sulla superficie proteica. Nel secondo caso invece vengono utilizzati opportuni linker che vengono artificialmente introdotti nella struttura proteica e che diventano in un secondo momento il sito di legame per il polimero.

Il processo di bioconiugazione diretta è semplice ma non sempre selettivo in quanto molte proteine non presentano specifici punti di ancoraggio. Inoltre, la coniugazione di due macromolecole (polimero e proteina) stericamente ingombrate è un processo cineticamente sfavorito e di conseguenza non sempre efficiente. L'impiego di linker, invece, permette l'inserimento nella struttura proteica di specifici siti di legame per il polimero e, sebbene il processo sia sicuramente più complesso rispetto al precedente, esso consente di ottenere in modo più accurato derivati in cui il polimero è legato alla proteina in modo sito-specifico.

1.10.3 MICRO E NANOPARTICELLE SOLIDE

Sistemi micro e nanoparticellari solidi sono stati ampiamente studiati per la somministrazione sottocutanea per il rilascio prolungato di proteine. Tuttavia, solo un numero limitato di prodotti microparticellari, principalmente contenenti polipeptidi, sono stati effettivamente introdotti in terapia.

Microsfere per il drug delivery vengono per lo più preparate con polimeri biodegradabili e biocompatibili, quali ad esempio polioroesteri, poliuretani, polianidridi, policarbonati,

polifosfazeni e poliesteri. In Tabella 1 è riportato un elenco di prodotti impiegati per la preparazione di sistemi microparticellari studiati per la veicolazione di proteine.

Proteine Naturali	Polisaccaridi Naturali	Polimeri Sintetici
Albumina	Chitosan	Poliortoesteri
Collagene	Destrano	Polianidridi
Inulina	Amido	Poliammidi
Fibrinogeno	Acido Ialuronico	Polialchilcianoacrilati
Gelatina	Pullulano	Poliesteri
Caseina	Alginato	Policaprolattoni
	Cellulosa	Policaprolattoni aggraffati su PVA (o sulfobutil-PVA)
		Polifosfazeni
		Pseudo-poli-aminoacidi
		Polimetidilene Malonato

Tabella 1 Elenco di prodotti utilizzati per la preparazione di sistemi microparticellari per la veicolazione di proteine.

Nel corso degli anni sono state messe a punto varie tecniche di preparazione che ne consentono la produzione industriale su larga scala, come ad esempio tecniche di spray drying, spray-congealing e tecniche basate sull'impiego di fluidi supercritici.

Sebbene i sistemi microparticellari siano tra le formulazioni più interessanti per la veicolazione di proteine, il loro sviluppo rimane comunque difficile a causa della difficoltà di incorporamento del farmaco, della sua instabilità fisica e chimica e del difficile controllo delle cinetiche di rilascio.

Le condizioni di preparazione di sistemi microparticellari polimerici spesso provocano la denaturazione e degradazione della proteina. I polimeri utilizzati sono infatti usualmente materiali idrofobici la cui manipolazione richiede l'impiego di solventi organici e condizioni operative che provocano facilmente la denaturazione e inattivazione di proteine. Inoltre, la degradazione del polimero durante il rilascio del farmaco può alterare le condizioni microambientali in cui si trova la proteina degradandola o denaturandola. Un tipico esempio è dato dalla degradazione di poliesteri che porta alla formazione di acidi carbossilici con conseguente diminuzione di pH all'interno della matrice polimerica. Tale diminuzione di pH rappresenta spesso una delle principali cause di denaturazione e degradazione di proteine e in alcuni casi si sono osservate vere e proprie reazioni chimiche tra gruppi carbossilici liberati e funzioni proteiche. Per quanto riguarda il rilascio del farmaco dalle microparticelle uno dei principali problemi è l'effetto burst, rilascio immediato, che spesso compromette l'efficienza terapeutica della formulazione. L'effetto burst è dovuto alla elevata idrofilicità della proteina che viene facilmente rilasciata dalla matrice idrofila. Molti studi sono stati condotti negli

ultimi anni per mettere a punto adeguati metodi di preparazione di microsfele polimeriche in modo da ovviare ai problemi di instabilità e di rapido rilascio della proteina.

Ad esempio, l'intrappolamento di proteina allo stato solido nella matrice polimerica così come l'impiego di co-eccipienti che mantengono le condizioni microambientali fisiologiche durante il rilascio hanno portato ad un miglioramento della stabilità. Migliori cinetiche di rilascio sono state invece ottenute aggiungendo modificatori del rilascio come ad esempio polimeri idrofilici.

Un problema ancora aperto è tuttavia la sterilizzazione di queste formulazioni. Tecniche di sterilizzazione chimiche o di filtrazione non possono essere impiegate con questi prodotti mentre l'impiego di radiazioni sterilizzanti possono portare ad alterazioni e degradazioni della struttura polimerica e del farmaco incorporato⁶⁹.

Le nanoparticelle sono definite, in ambito tecnologico, come "sistemi colloidali formati da particelle solide di dimensioni comprese tra 1 e 1000 nm (1µm). Tali formulazioni sono state impiegate per la veicolazione di proteine che possono essere intrappolate all'interno della matrice oppure adsorbite o coniugate sulla superficie per essere veicolate e successivamente rilasciate nel sito d'azione. Le nanoparticelle possono essere prodotte utilizzando diversi materiali quali polimeri (polymeric nanoparticles, PNPs) e lipidi (solid lipid nanoparticles, SLNs).

Analogamente alle microsfele polimeriche, le nanoparticelle presentano problemi di efficienza di incorporamento e rapido rilascio di farmaco per cui sono stati utilizzati differenti co-eccipienti idrofilici, in grado di bilanciare le caratteristiche idrofiliche e lipofiliche della matrice e che permettono di ottenere sistemi con migliori caratteristiche biofarmaceutiche. In letteratura sono riportati molti studi che confermano la capacità di questi sistemi di attraversare la mucosa epiteliale in seguito a somministrazioni orale, nasale, polmonare, ecc., e di aumentare quindi la biodisponibilità delle proteine veicolate. Una volta in circolo, si accumulano in siti bersaglio attraverso meccanismi attivi o passivi, dove rilasciano il farmaco con meccanismi di diffusione passiva o in seguito a processi di erosione e degradazione della matrice. La somministrazione locale assicura invece un'azione localizzata ad opera di componenti cellulari e sub-cellulari, come nucleo ed organelli⁷⁰.

1.11 IMPIEGO DEI POLIMERI NEL DRUG DELIVERY

Le microparticelle utilizzate per questi sistemi di rilascio controllato sono composte dal farmaco e da un polimero. Un polimero è una sostanza ad elevato peso molecolare formato da unità semplici e ripetitive (monomeri).

Le caratteristiche fondamentali che un polimero deve avere per la preparazione di sistemi per il rilascio controllato sono:

- Biocompatibilità e biodegradabilità: il polimero deve essere degradato in vivo, in frammenti più piccoli, che possono essere poi secreti dal corpo;
- Atossicità: i prodotti di degradazione del polimero non devono essere tossici e non devono ricreare risposte infiammatorie;
- Velocità di assimilazione: il polimero deve essere metabolizzato in un ragionevole periodo di tempo.

La biodegradabilità è la tendenza all'erosione fisica in ambiente fisiologico o comunque biologico. L'erodibilità fisica è conseguenza diretta della reattività chimica all'idrolisi, all'attacco di radicali liberi, alla rottura mediata da enzimi.

Biodegradabile non sempre significa anche biocompatibile: lo è se anche i prodotti di degradazione sono biocompatibili.

Un materiale si può definire biocompatibile se gli insulti all'organismo sono ridotti al minimo di modo che l'organismo ospite vi si possa adattare a tutti i livelli (cellula, tessuto, organo). Materiali idrofilici sembrerebbero maggiormente biocompatibili anche se in realtà un materiale idrofobico risulta più spesso preferibile perché ha minore tendenza a contrarre con le proteine interazioni che sono sfavorevoli per i tessuti biologici.

Un polimero biodegradabile deve presentare gruppi funzionali che si degradano facilmente come esteri, anidridi, amine, peptidi e glucosidi. I materiali corrispondenti possono essere divisi in composti naturali, come proteine (albumina, collagene, fibrina, gelatina), polisaccaridi (alginato, cellulosa, chitosano, destrano, acido ialuronico e mais), o lipidi; o sostanze sintetiche come poliammide, poliamminoamidi, polianidridi, policianoacrilati, polidiossani, poliesteri (policaprolattoni, policarbonati, poliglicolidi, polilattidi), poliortoesteri, polifosfazeni e vari copolimeri.

Alcuni prodotti commerciali con polimeri biodegradabili approvati dal FDA sono riportati in tabella 2.

Prodotti	Produttori	Forma di dosaggio	Polimeri	Farmaco	Durata di azione (mesi)
Profact Depot	Aventis Pharma	impianto	PLGA	Buserelin acetate	2 e 3
Zoladex	AstraZeneca / Promed / pharma-stern	impianto	PLGA	Goserelin acetate	1 e 3
Gliadel*	MGI PHARMA	impianto	Polifeprosan 20	Carmustin	~ 1
Decapeptyl N and Gyn	Ferring Arzneimittel	Micro particelle	PLGA	Triptorelin acetate	1
Enantone	Takeda	Micro particelle	PLGA	Leuprorelin acetate	1
Trenantone	Takeda	Micro particelle	PLA	Leuprorelin acetate	3
Pamorelin LA	IPSEN PHARMA	microparticelle	PLGA	Triptorelin acetate	1 e 3
Sandostatin LAR	Novartis Pharma	microparticelle	PLGA	Ocreotide acetate	1
Risperdal Consta	Janssen-Cilag	microparticelle	PLGA	Risperidon	0.5
Atridox	Atrix / curasan	Impianto in situ	PLA (NMP)	Doxycyclin	4
Eligard	Astellas Pharma	Impianto in situ	PLGA (NMP)	Leuprolide acetate	1 e 3

Tabella 2 Prodotti commerciali con polimeri approvati per uso iniettabile.

1.11.1 MECCANISMI DI RILASCIO DA MATRICI POLIMERICHE

Il termine “rilascio controllato” in tecnologia farmaceutica è impiegato per indicare sistemi in grado di controllare attraverso meccanismi definiti la velocità di rilascio del farmaco nell’organismo.

Alle categorie di “drug delivery system” appartengono formulazioni di diverse composizioni, forme, dimensioni, vie di somministrazione e impiego quali idrogeli, liposomi, micelle, micro particelle lipidiche, polimeriche.

Rappresentano la sottoclasse più ampia di questo gruppo di sistemi di veicolazione di farmaci in quanto possono essere ottenuti con una grande varietà di polimeri di diverso tipo, idrofilici o idrofobici, solubili o insolubili, biodegradabili o non biodegradabili. Inoltre possono essere ottenuti matrici con varie tecniche in modo da poter controllare le condizioni fisiche e biofarmaceutiche.

I sistemi polimerici solidi per il rilascio controllato possono essere classificati in base al meccanismo di rilascio del farmaco.

- Sistemi a controllo diffusionale, nei quali il farmaco viene rilasciato dalla matrice per semplice diffusione. Sono le forme maggiormente utilizzate dall’industria farmaceutica e possono venir formulati in due configurazioni base: reservoir e monoliti.

I sistemi a reservoir sono costituiti da una membrana polimerica che circonda un nucleo centrale contenente il farmaco. La membrana deve essere uniforme e il suo spessore non deve cambiare nel tempo, essa è costituita da un materiale polimerico (omogeneo o eterogeneo, amorfo o semicristallino, non poroso, microporoso o semipermeabile) insolubile nei fluidi biologici acquosi. Il farmaco può essere presente nel reservoir sotto forma di particelle solide sospese in un mezzo liquido oppure come soluzione concentrata in un mezzo disperdente solido o liquido (Figura 14). Questi permettono una velocità di rilascio di farmaco con cinetica di ordine zero, almeno per un certo tempo.

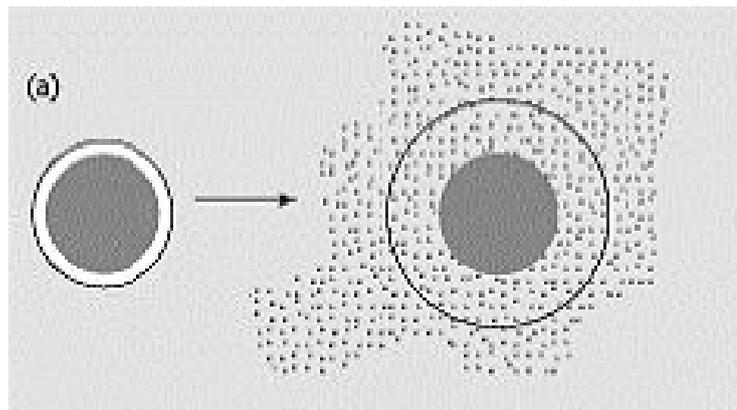


Figura 14 Rilascio da sistemi reservoir

Nei sistemi monolitici il principio attivo è disperso nella matrice polimerica ed il rilascio del farmaco avviene con cinetica di pseudo - primo ordine (Figura 15). Questo tipo di sistema è detto “non all’equilibrio” in quanto la concentrazione del farmaco nella matrice e la distanza percorsa dal farmaco per uscire cambiano continuamente nel tempo.

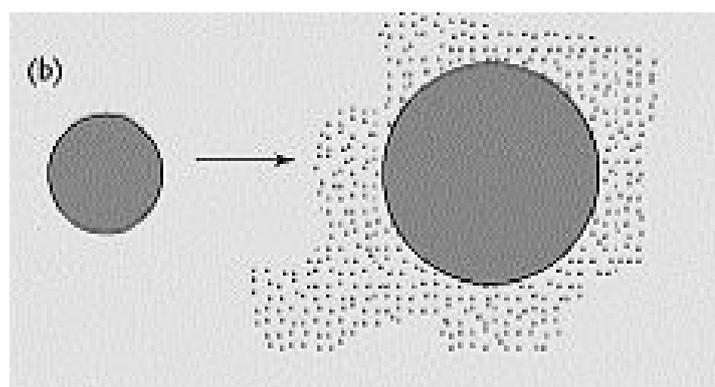


Figura 15 Rilascio da sistemi a matrice

- Sistemi erodibili a controllo chimico, nei quali il rilascio del farmaco è controllato dall'idrolisi del polimero e dalla sua diffusione attraverso esso. Questi sistemi sono in grado di rilasciare il farmaco con ordine zero (Figura 16).

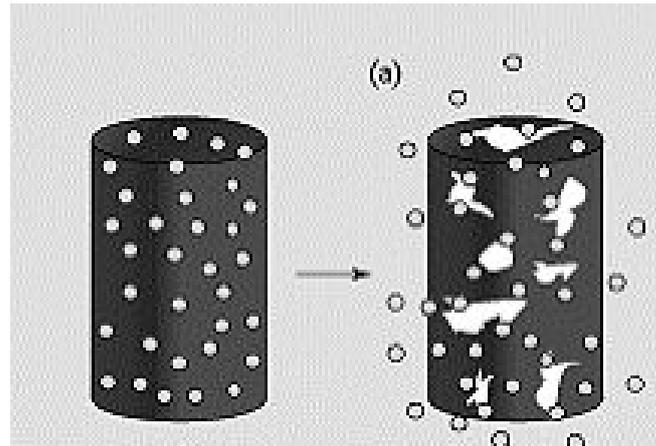


Figura 16 Sistemi erodibili

- Sistemi rigonfiabili sono caratterizzati dalla capacità di rilasciare il farmaco secondo una cinetica di rigonfiamento (swelling), come nel caso degli idrogeli. Questi polimeri rigonfiabili subiscono una transizione vetrosa – amorfa. In questo caso il rilascio è controllato dal rigonfiamento prodotto dall'acqua e successiva diffusione della matrice rigonfiata (Figura 17).

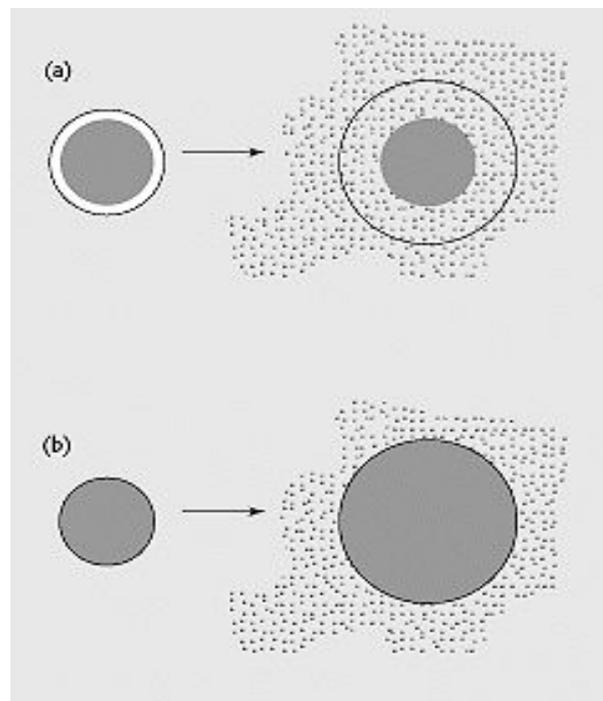


Figura 17 a) idrogel a sistema reservoir: il farmaco è contenuto nel serbatoio e la membrana esterna di idrogel rigonfia aprendo la porosità e rilasciando il farmaco; b) idrogel a sistema a matrice: l'idrogel contiene il farmaco che viene rilasciato per rigonfiamento dell'intero sistema e con conseguente apertura dei canali della porosità.

I sistemi a rilascio controllato presentano alcuni interessanti vantaggi rispetto alle forme farmaceutiche più tradizionali:

- 1) Mantenimento di concentrazioni di farmaco stabili per un lungo periodo di tempo.
- 2) Eliminazione di picchi e valli nei livelli plasmatici in modo da avere una concentrazione costante.
- 3) Riduzione della dose terapeutica.
- 4) Miglioramento della *compliance* del paziente.

Dall'altra parte sistemi a rilascio controllato possono presentare degli svantaggi quali:

- 1) Sovradosaggio per liberazione improvvisa e accidentale della totalità del farmaco a seguito di cause impreviste.
- 2) Perdita di flessibilità nel dosaggio.
- 3) Accumulo del farmaco.

Inoltre questi sistemi non sono adatti per:

- 1) Farmaci poco potenti che richiedono alte dosi non possono essere usati.
- 2) Farmaci molto potenti sono poco adatti perché si ha perdita di flessibilità nel dosaggio e aumentano i rischi dovuti a un potenziale rilascio improvviso in particolare se si impiegano sistemi a reservoir.
- 3) Farmaci che vengono metabolizzati in prodotti attivi.
- 4) Farmaci che tendono a ricristallizzare in forme polimorfe.

1.12 FORMULAZIONE DI MICROSFERE

Il processo di microincapsulazione di farmaci all'interno di matrici polimeriche prevede tre passaggi: il caricamento della proteina, la formazione delle microparticelle e l'essiccamento. Tale processo può essere ottimizzato attraverso l'impiego di varie tecniche di preparazione che nel corso degli anni sono state ottimizzate e messe a punto ex novo.

I principali obiettivi effettuati sulla messa a punto di nuovi metodi di preparazione di microsfele per il rilascio di farmaci sono:

- 1) Definizione di condizioni operative che non provocano degradazione o inattivazione del farmaco. Questo punto è particolarmente rilevante in considerazione della elevata fragilità di molecole di natura proteica e peptidica discussa precedentemente.
- 2) Ottenimento di un alto grado di caricamento del farmaco. Anche questo è un punto importante per farmaci di natura proteica e peptidica che sono normalmente molecole idrofiliche mentre i polimeri sono caratterizzati da una spiccata idrofobicità.

- 3) Alte rese di produzione.
- 4) Limitato uso di materiali non compatibili o non biocompatibili.
- 5) Completa eliminazione dei solventi residui.
- 6) Ottenimento di microsfere con adeguate caratteristiche morfologiche e dimensionali.
- 7) Ottenimento di microsfere con adeguate caratteristiche biofarmaceutiche con limitato burst iniziale e rilascio completo del farmaco.

Il burst iniziale si riferisce al rilascio del farmaco durante i primi minuti dopo somministrazione. Tale fenomeno è dovuto essenzialmente ad una incompleta incorporazione del farmaco nella matrice. È causato anche dall'adsorbimento del farmaco sulla superficie delle microsfere o dall'incompleta formazione degli strati superficiali della matrice.

Altro problema riscontrato nella formulazione di microsfere polimeriche è spesso l'incompleto rilascio del farmaco proteico da parte della matrice o la denaturazione della proteina incorporata. Le cause principali risultano essere la denaturazione da parte del solvente organico, la perturbazione della struttura causata da forze interattive che si instaurano con il polimero, la denaturazione causata da temperature elevate e cambi di pH, la perdita della protezione dell'acqua a causa della liofilizzazione (figura 18).

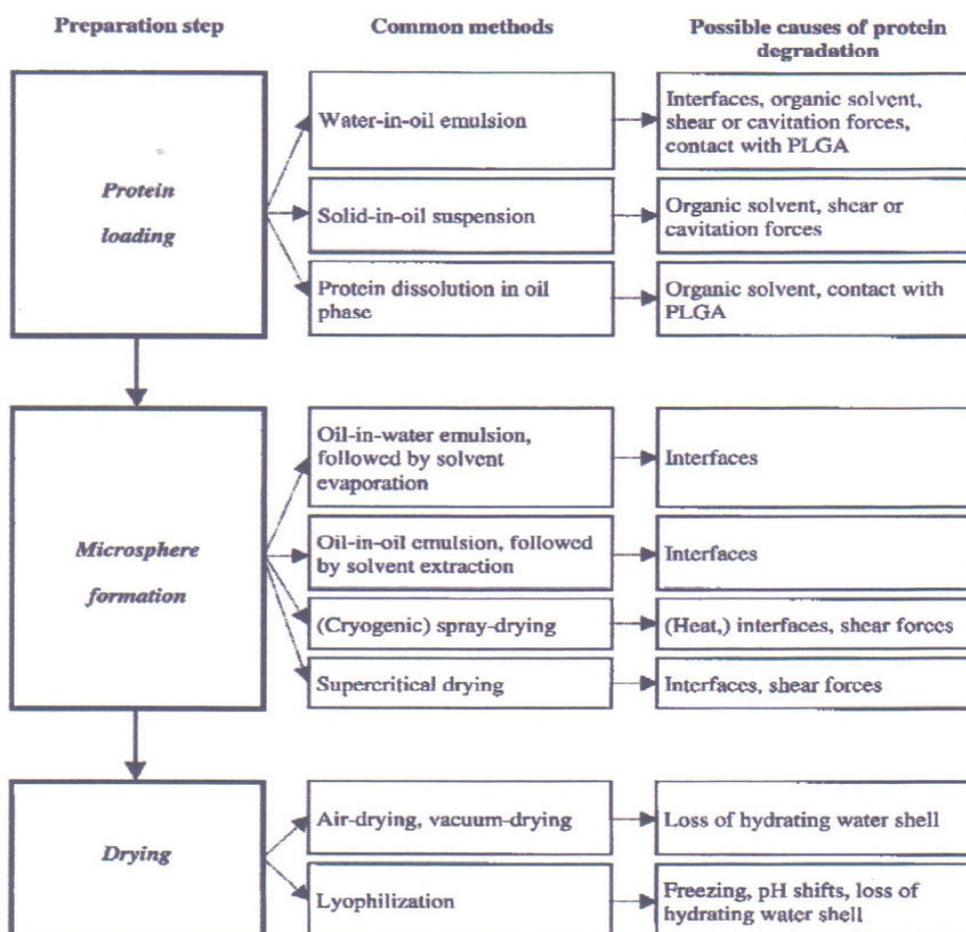


Figura 18 Possibili cause di degradazione della proteina nativa durante la creazione di microsfere

1.12.1 TECNICA SPRAY DRYING



Figura 19 Spray dryer

La tecnica *Spray drying* è una rapida e semplice tecnica, che consente la preparazione di microsfele con un processo continuo ed economico. Una miscela di PLGA e farmaco in un opportuno solvente viene atomizzata in una camera di essiccamento dove un flusso di aria calda consente l'evaporazione del solvente organico volatile formando la matrice di farmaco e polimero. Le particelle, che hanno una dimensione tra 1 e 50 μm , sono selezionate da filtri e cicloni. (Figura 20).

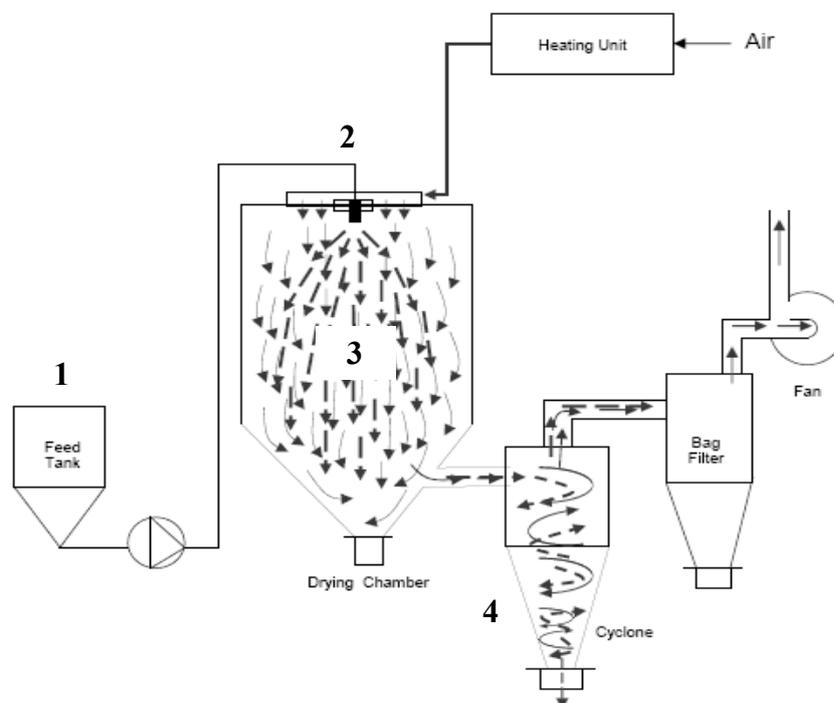
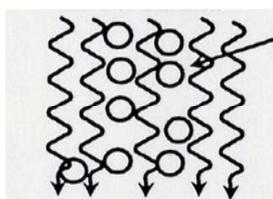
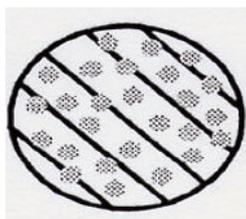


Figura 20 Schema Spray Dryer. 1) Dispersione farmaco + polimero in solvente: soluzione del polimero e soluzione o sospensione o emulsione del farmaco. 2) Iniezione e spray in camera di atomizzazione. 3) Eliminazione del solvente in condizioni di temperatura e pressione controllate. 4) Raccolta e selezione del prodotto microparticellare (ciclone).

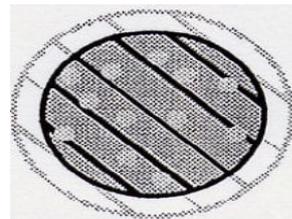
Processo di formazione di particelle solide mediante Spray Drying



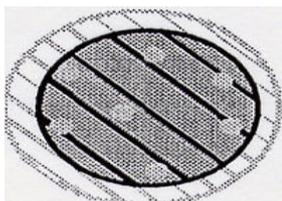
Soluzione nebulizzata dall'ugello



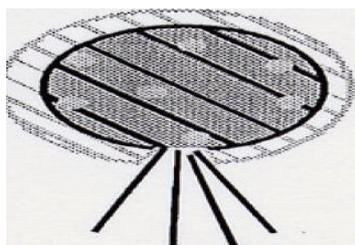
Singola gocciolina con soluto indisciolto



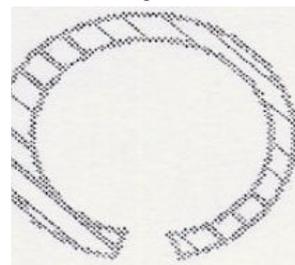
Formazione di una parete semisolida attorno ad un core liquido



Stabilizzazione della parete e riscaldamento del core liquido



Rottura della parete e fuoriuscita del solvente



Particella solida

Le caratteristiche del prodotto finale dipendono dal tipo di polimero utilizzato e dalla sua concentrazione nella soluzione, dal solvente e dalla temperatura di evaporazione di quest'ultimo, dalla temperatura del flusso di aria, dalla velocità del gas utilizzato per nebulizzare la preparazione. La variazione di questi ed altri parametri permette di modificare le proprietà delle microsfele ottenibili, la morfologia, le dimensioni, la sospensibilità, l'efficienza di intrappolamento del farmaco.

1.12.2 TECNICA DELLA EMULSIONE O/W E DOPPIA EMULSIONE W/O/W ED EVAPORAZIONE DEL SOLVENTE

Nella tecnica dell'emulsione O/W il farmaco viene disciolto, sospeso o emulsionato in una soluzione organica di polimero la quale a sua volta viene emulsionata in una soluzione acquosa in presenza di un tensioattivo.

L'eliminazione del solvente organico avviene per evaporazione o estrazione del soluto organico mentre l'emulsione viene mantenuta in continua agitazione con omogeneizzatore permettendo così la formazione delle microsfele.

Le caratteristiche del prodotto finale dipendono da numerose variabili operative quali: il tipo e la concentrazione di polimeri e solvente, la composizione e il volume della fase continua, la temperatura, il metodo di dispersione del farmaco nella fase organica del polimero. La velocità di agitazione durante la preparazione, le temperature di operazione,

l'impiego di eccipienti quali surfattanti e cosolventi, la metodica e il modo di eliminazione del solvente organico possono costituire ulteriori variabili importanti durante il processo⁷¹.

La tecnica dell'emulsione o/w ed evaporazione del solvente è impiegata per incapsulare farmaci poco solubili in acqua mentre è poco efficace nel caso di molecole idrofiliche come le proteine a causa della loro rapida diffusione dalla soluzione organica alla fase acquosa⁷².

Per ovviare allo scarso incorporamento della tecnica di emulsione singola si utilizza la tecnica della doppia emulsione w/o/w dove una soluzione acquosa contenente il farmaco viene emulsionata con la soluzione di polimero. Questa prima emulsione w/o viene successivamente incorporata in una seconda fase acquosa creando una seconda emulsione e agitata sottovuoto in modo da rimuovere il solvente e creare le microsfe.

1.12.3 ALTRE TECNICHE DI PRODUZIONE DI MICROSFERE.

Microsfere polimeriche per il rilascio di farmaci possono essere ottenute con vari metodi quali: tecnica di polimerizzazione interfacciale, polimerizzazione in situ, coacervazione, tecniche supercritiche (SCF) (figura 21).

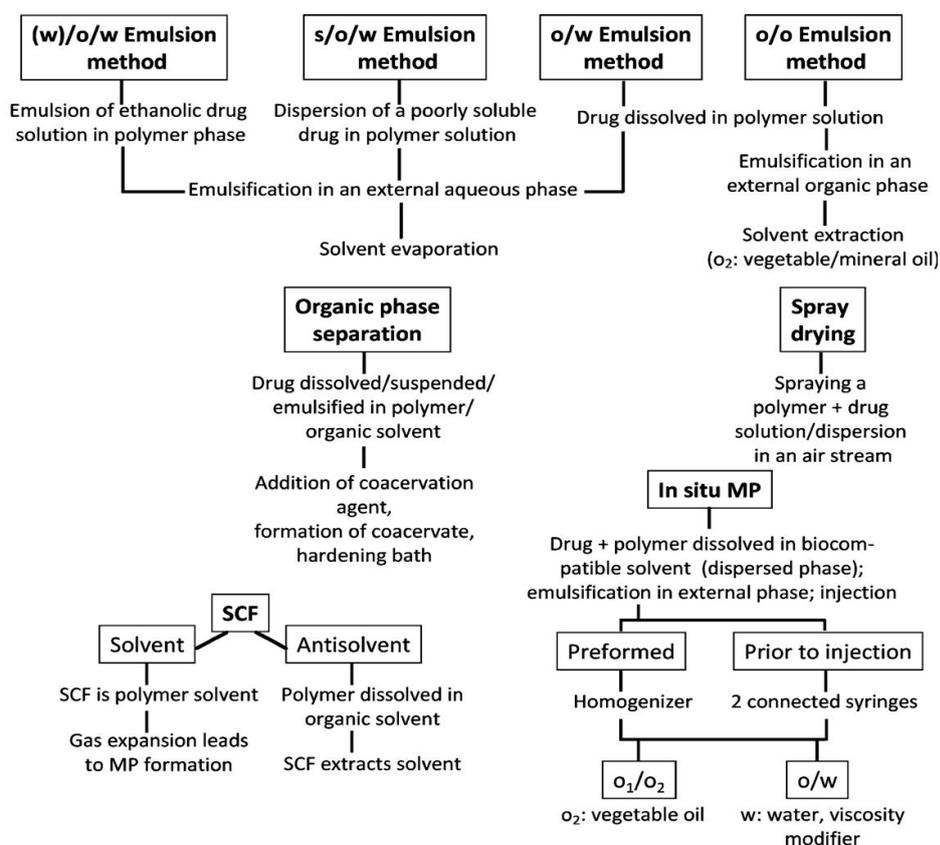


Figura 21 Tecniche principali di microincapsulazione usate per incorporare farmaci in microparticelle biodegradabili.

Con il metodo della coacervazione si induce la precipitazione del polimero sulla superficie di un farmaco sospeso, mediante la variazione della temperatura o l'aggiunta di sali o

solventi. È un metodo utilizzato prevalentemente con polimeri idrofilici (chitosani, sodio alginato e gelatina). Si ottengono così microcapsule di 200 – 1000 nm che vengono separate dal mezzo mediante evaporazione del solvente, filtrazione o centrifugazione. Il processo di coacervazione è stato applicato per incapsulare albumina di siero bovino⁷³. La fase di separazione intorno alla fase dispersa della proteina viene introdotta aggiungendo olio di silicone (un non solvente del polimero) alla soluzione farmaco/polimero (s/o). L'olio di silicone viene lavato via con etere di petrolio o eptano, che viene poi rimosso sottovuoto.

La tecnica di polimerizzazione in situ prevede la polimerizzazione di un monomero disperso con il farmaco in un opportuno solvente. Il monomero e il catalizzatore si trovano entrambi all'interno e all'esterno del core del microincapsulato. In tale processo le condizioni di reazione sono tali che il monomero è solubile, mentre il polimero risulta insolubile. In tal modo, il processo di polimerizzazione avviene sulla superficie del core e il risultante film polimerico ricopre l'intera superficie del core. Tale tecnica permette di ottenere microsfele di piccole dimensioni con il principio attivo uniformemente disperso nella matrice.

Un altro metodo per formare particelle di proteine prevede l'utilizzazione di fluidi supercritici, fluidi che in condizioni di temperatura e pressione superiore al punto critico portano ad una fase indistinguibile tra liquido e vapore detta supercritica. Questa fase presenta caratteristiche particolari, viscosità e velocità di diffusione simili a quelle di un gas e una densità simile a quella di un liquido. Il fluido più utilizzato è l'anidride carbonica, in quanto i valori della sua temperatura critica (31.06°C) e pressione critica (73.8 bar) sono relativamente bassi e quindi facilmente accessibili alla lavorazione industriale. La possibilità di modificare il potere solvente di una sostanza modulando la sua densità e quindi la pressione a temperatura costante, ha portato allo sviluppo delle diverse tecniche grazie alle quali è possibile indurre la ricristallizzazione di una sostanza o di un insieme di sostanze (per esempio un farmaco e un polimero nei sistemi a rilascio controllato). Il fluido supercritico viene utilizzato in due diversi modi: 1) come solvente: il fluido supercritico discioglie la sostanza da cristallizzare; una successiva diminuzione della pressione provoca l'abbassamento della densità quindi del potere solvente che provoca la precipitazione del soluto. (RESS: Rapid Expansion from Supercritical Solution, PGSS: Particles from Gas Saturated Solutions); 2) come antisolvente, l'aggiunta di fluido in cui ad una soluzione organica, abbassa la densità della soluzione inducendo la precipitazione del soluto.

La tecnica dell'emulsione ha diverse varianti: l'emulsione o/o prevede l'estrazione della prima fase oleosa, di solito si usa acetonitrile con un emulsionante con HLB<8, in olio minerale, che riveste il ruolo di non-solvente sia per il polimero che per il farmaco⁷².

L'emulsione s/o/w viene usata per farmaci scarsamente solubili che quindi vengono dispersi nella soluzione organica di polimero. Il tutto poi viene emulsionato con una fase esterna, che poi verrà evaporata sottovuoto.

1.13 SCOPO DELLA TESI

Obiettivo di questo progetto di ricerca è lo sviluppo di sistemi a rilascio controllato e prolungato di farmaci di natura proteica, in particolar modo di citochine utilizzate nella terapia delle patologie reumatiche (es. artrite reumatoide, psoriatca, osteoartrosi e artrite indotta da cristalli), in grado di essere utilizzati anche per via intraarticolare.

Lo scopo è quello di raggiungere lo sviluppo di una piattaforma di *drug delivery* applicabile a farmaci biotecnologici come citochine antiinfiammatorie, recettori solubili di citochine pro infiammatorie, anticorpi monoclonali.

Anakinra (IL-1Ra umano ricombinante), nonostante non sia il farmaco di prima scelta nella terapia delle malattie reumatiche, è stato scelto come modello di farmaco antireumatico ed utilizzato in questo studio per l'elevato profilo di sicurezza dimostrato nell'utilizzo clinico, la vasta conoscenza della molecola stessa, dei suoi effetti e delle sue proprietà, la facile reperibilità di questo medicinale e la disponibilità di metodi analitici per la sua quantificazione in vitro ed in vivo.

Lo studio si è articolato nelle seguenti fasi:

- 1) Sviluppo formulativo. Sono stati considerati diversi approcci tecnologici: micro/nano-particelle a base di polimeri biodegradabili.
- 2) Caratterizzazione chimico-fisica delle nuove formulazioni
- 3) Valutazione in vitro della cinetica di rilascio del farmaco in tampone e in liquido sinoviale
- 4) Valutazione della compatibilità della formulazione con le condizioni fisiologiche articolari (ad esempio il rilascio del farmaco nel liquido sinoviale ex-vivo)
- 5) Valutazione della biodisponibilità della formulazione in modelli animali (es. topo)
- 6) Valutazione dell'efficacia in modelli biologici (es. modello di artrite sperimentale indotta da collagene nel topo).

CAPITOLO 2

MATERIALI E METODI

2.1 MATERIALI UTILIZZATI NELLA PRODUZIONE DELLE MICROSFERE

2.1.1 IL-1RA UMANO RICOMBINANTE (ANAKINRA)

IL-1Ra è stato ottenuto in fiale sterili da 0.67 ml contenenti Anakinra (IL-1Ra ricombinante 150mg/ml) 100mg, sodio citrato 1.29 mg, sodio cloruro 5.48mg, EDTA disodico 0.12mg, Tween80 0.70mg in acqua per preparazioni iniettabili.

Le assorbanze di tre campioni diluiti a 1mg/ml alla lunghezza d'onda di 280 nm sono risultate di 0.8412-0.8463-0.8439 che corrispondono ad un ϵ 1 mg/ml di 0.8438.

2.1.2 PLGA

Acido polilattico co-glicolico con rapporto molare tra i due monomeri 50:50 con peso molecolare di circa 40 kDa è stato acquistato da Boehringer Ingelheim con i nomi commerciali Resomer RG503 (terminale -COOH bloccato) e Resomer RG503H (terminale -COOH sbloccato). Sono polimeri idrofobici biodegradabili e biocompatibili, approvati per l'utilizzo in preparazioni iniettabili a rilascio prolungato.

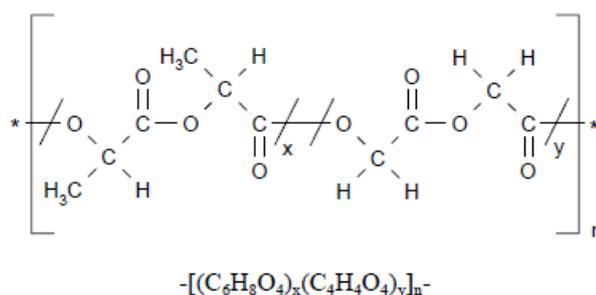


Figura 22 Struttura dell'acido polilattico co-glicolico

2.1.3 PLA

Acido polilattico (PLA) costituito unicamente da monomeri di acido lattico; è, come il PLGA, un polimero biodegradabile e biocompatibile, approvato per l'utilizzo iniettabile. È stato acquistato da Boehringer Ingelheim con il nome commerciale Resomer L206S dal peso di circa 100 kDa.

2.1.4 HYALASTINE

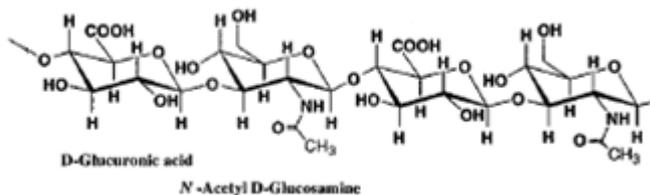


Figura 23 Struttura dell'acido ialuronico

Frazione dell'acido ialuronico con peso molecolare di 92-200 kDa è stato prodotto da Fidia Farmaceutici mediante fermentazione e purificazione.

2.1.5 HYALECTIN

Frazione dell'acido ialuronico con peso molecolare di 500-700 kDa è stato prodotto da Fidia Farmaceutici mediante fermentazione e purificazione.

2.1.6 HYAFF 11 P50-P75-P100

Derivati dell'acido ialuronico, sono stati prodotti da Fidia Farmaceutici; vengono prodotti per parziale o totale derivatizzazione dell'acido ialuronico (benzilazione dei residui carbossilici). Lo HYAFF11 P50 (derivatizzato al 50%) e lo HYAFF11 P75 (derivatizzato al 75%) dimostrano solubilità in acqua; le prove di solubilità effettuate su HYAFF11 P100 hanno dimostrato la solubilità solo in DMSO (dimetilsolfossido), HFP (esafluoropropanolo) e NMP (n-metilpirrolidina).

2.1.7 PEG 5 kDa

Il glicole polietilenico (PEG) è un polimero ottenuto per polimerizzazione dell'ossido di etilene. Esistono diversi tipi di PEG, con diversi pesi molecolari (variazione di lunghezza della catena etilenica) o con diversi tipi di sostituenti (utilizzati ad esempio per eseguire bioconiugazioni). Questi polimeri sono solubili sia in solventi organici che in soluzioni acquose e possono modificare le caratteristiche morfologiche e di rilascio dei sistemi di drug delivery.

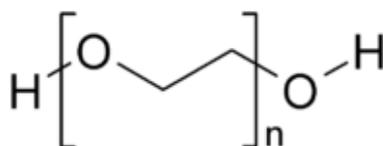


Figura 24 Struttura del polietilenglicole

2.1.8 EPIKURON 200SH

Fosfatidilcolina di grado farmaceutico, approvata per l'utilizzo iniettabile, acquistata da Cargill.

2.1.9 ALCOL POLIVINILICO

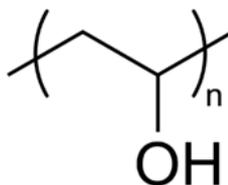


Figura 25 Struttura del Polivinilalcol

Il polivinilalcol (PVA) è un polimero idrofilo, sintetico, dalle capacità emulsionanti, filmogene e antiadesive.

2.2 METODI ANALITICI

2.2.1 PURIFICAZIONE DI IL-1Ra (ESEMPIO)

Una fiala di Anakinra è stata diluita a 3ml con acqua milliQ e caricata su colonna da purificazione preimpaccata con resina Sephadex G25 superfine eluita con acqua mQ. Frazioni di 7 minuti sono state raccolte mediante raccoglitrice di frazioni Pharmacia LKB RediFrac e successivamente analizzate mediante Spettrofotometro Perkin-Elmer Lambda2 a 280 nm. Sono state raccolte le frazioni dalla 15 alla 30 in un pallone da 100mL, quindi congelate in bagno di acetone e ghiaccio secco, infine liofilizzate. Si sono ottenuti 96.4 mg di proteina purificata. La proteina è risultata essere facilmente solubile in tampone.

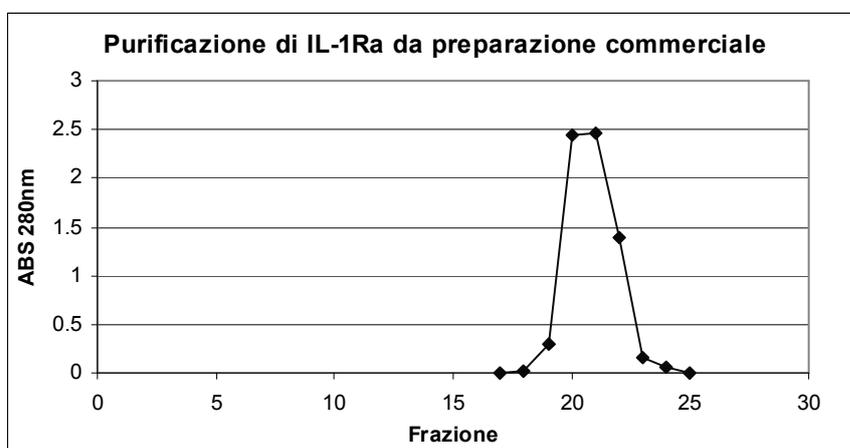


Figura 26 Purificazione di IL-1Ra commerciale: assorbimento UV delle frazioni raccolte

2.2.2 PROTOCOLLI DI ANALISI MEDIANTE HPLC DI IL-1Ra

IL-1Ra in soluzione è stata quantificata secondo un protocollo analitico che prevede l'analisi in cromatografia HPLC utilizzando uno strumento Jasco 1500 equipaggiato con una colonna Phenomenex RP-C18 Jupiter 300A 5µm eluita con gradiente di acqua/acetonitrile aggiunti dello 0.05% di TFA. La proteina è stata determinata mediante detector spettrofotometrico UV-Vis impostato a 280 nm. La proteina è stata determinata sulla base di una retta di taratura ottenuta per diluizioni note della citochina. Il limite inferiore di rilevabilità della metodica è risultato essere di 10 µg/ml.

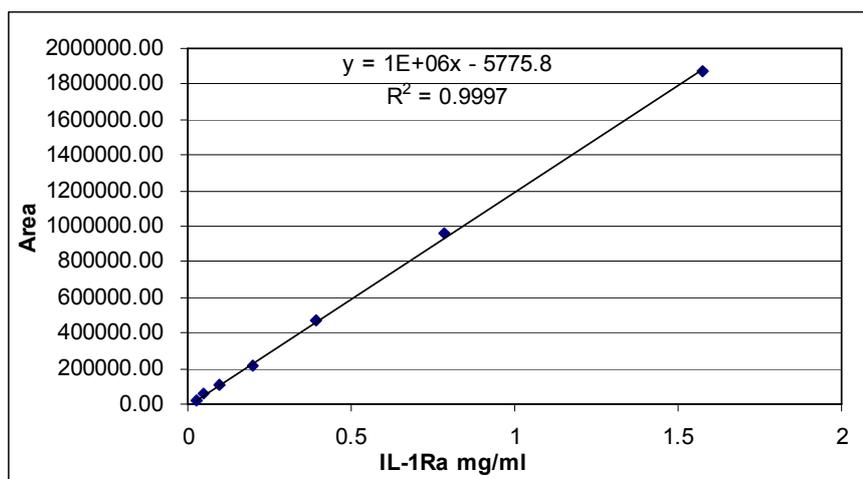


Figura 27 Retta di taratura di IL-1Ra mediante HPLC-RP

Minuti →	0	3	25	27	30	31
% ACN →	10	10	55	90	90	10
flusso 1 ml/min, lettura a 280nm						

Tabella 3 Gradiente di H₂O e AcCN (+0.05%TFA)

2.2.3 ANALISI DIMENSIONALE DEI SISTEMI PARTICELLARI

L'analisi dimensionale delle formulazioni ottenute è stata effettuata mediante tecnica di diffrazione laser (Malvern Mastersizer 2000).

I campioni di micro-particelle sono stati preparati sospendendo 20mg di microsfele in 10ml di tampone PBS contenente lo 0.1% v/v di Tween80 e trattando la sospensione per 20s con omogeneizzatore ad ultrasuoni OmniRuptor250 al 20% della massima potenza (30 Watt). Viene effettuata la taratura dello strumento e la lettura del background con acqua deionizzata; quindi viene effettuata l'analisi sul campione.

2.3 METODICHE UTILIZZATE NELLA PRODUZIONE DI MICROSFERE

2.3.1 EMULSIONE ED ESTRAZIONE DELLA FASE INTERNA (PRIMO METODO) (ESEMPIO)

- Fase A) 20 mg di IL-1Ra purificato e 180mg di HYAFF P100 TBA sono stati solubilizzati in 2.7 mL di solvente (DMSO) sotto costante agitazione a 60 rpm per una notte
 - Fase B) 124 µL di Arlacel A sono stati solubilizzati in 16 mL di Kaidol (olio minerale)
- Le fasi A e B sono state emulsionate per 10 minuti con Ultra Turrax T25 (IKA) a 10000 rpm in bagno di ghiaccio. L'emulsione ottenuta è stata aggiunta goccia a goccia a 46 mL di etile acetato sotto agitazione a 350 rpm con IKA RW20n. La dispersione ottenuta è stata mantenuta in agitazione per 20 minuti, poi filtrata a vuoto con imbuto e filtro millipore Type HV 0.45µm e il precipitato sul filtro è stato lavato con etile acetato e n-esano per tre volte l'uno. Il prodotto è stato posto, infine, in essiccatore per 12h.

2.3.2 EMULSIONE ED ESTRAZIONE DELLA FASE INTERNA (SECONDO METODO) (ESEMPIO)

I° STEP Produzione di microsfere di IL-1Ra/Hyalastine

- Fase A) 180 mg di Hyalastine e 20 mg di IL-1Ra purificato sono stati solubilizzati in 4.32 mL di H₂O milliQ sotto costante agitazione
- Fase B) 0.198 mL di Arlacel sono stati solubilizzati in 25.6 mL di Kaidol (olio minerale)

Le fasi A e B sono state emulsionate per 10 minuti con Ultra Turrax T25 (IKA) a 10000 rpm in bagno di ghiaccio. L'emulsione ottenuta è stata aggiunta goccia a goccia a 100 mL di Acetone/Etile acetato 1:1 sotto agitazione a 350 rpm con IKA RW20n. La dispersione ottenuta è stata mantenuta in agitazione per 20 minuti, poi filtrata a vuoto con imbuto e filtro millipore Type HV 0.45µm e il precipitato sul filtro è stato lavato con acetone/etile acetato/esano.

II° STEP Coating con HYAFF di microsfere di IL-1Ra/Hyalastine

- Fase A) 100 mg di HYAFF11 P100 TBA sono stati solubilizzati in 2.70 mL di DMSO sotto costante agitazione a 60 rpm per una notte; 100 mg di microsfere di IL-1Ra/Hyalastine sono stati aggiunti e dispersi nella Fase A
- Fase B) 0.124 mL di Arlacel sono stati solubilizzati in 16 mL di Kaidol (olio minerale)

Le fasi A e B sono state emulsionate per 10 minuti con Ultra Turrax T25 (IKA) a 10000 rpm in bagno di ghiaccio. L'emulsione ottenuta è stata aggiunta goccia a goccia a 46 mL di etile acetato sotto agitazione a 350 rpm con IKA RW20n. La dispersione ottenuta è stata mantenuta in agitazione per 20 minuti, poi filtrata a vuoto con imbuto e filtro millipore Type HV 0.45µm e il precipitato sul filtro è stato lavato con etile acetato e n-esano per tre volte l'uno.

2.3.3 DOPPIA EMULSIONE ED EVAPORAZIONE DEL SOLVENTE (ESEMPIO)

- Fase A) 134µL di fiala di Anakinra (20 mg di IL-1Ra) sono stati diluiti a 200µL con acqua milliQ; nella stessa fase sono stati solubilizzati 2mg di Trealosio (FLUKA) e 5mg di Hyalastine (FIDIA) agitando molto lentamente
- Fase B) 320mg di PLGA (50:50) Resomer RG503 o RG503H e 80mg di PEG 5kDa sono stati solubilizzati mediante vortex in 4 mL di Diclorometano
- Fase C) 100mg di PVA 13-23kDa sono stati solubilizzati in 100 ml di acqua milliQ

In un reattore utilizzabile per l'agitazione sotto vuoto, sono stati posti 85mL di Fase C. Le fasi A e B sono state emulsionate con IKA UltraTurrax T25 (equipaggiato con dispersore S25N 18G) a 3600 rpm in bagno di ghiaccio per 30s. L'emulsione ottenuta è stata aggiunta rapidamente di 15mL di Fase C ed emulsionata con Ultra Turrax a 3600 rpm in bagno di ghiaccio, per 30s. La doppia emulsione ottenuta è stata trasferita velocemente mediante pipetta nel reattore sotto agitazione meccanica mediante IKA RW20 a 800 rpm, dove è avvenuta la precipitazione del PLGA. La sospensione ottenuta è stata mantenuta in agitazione sotto vuoto per eliminare il solvente a 1500 rpm per 10 min. La sospensione ottenuta nel reattore è stata centrifugata a 3000 rpm per 4min e il precipitato è stato lavato con acqua, risospeso e ri-centrifugato, il procedimento è stato ripetuto due volte e poi la sospensione è stata liofilizzata per 12h in liofilizzatore Heto.

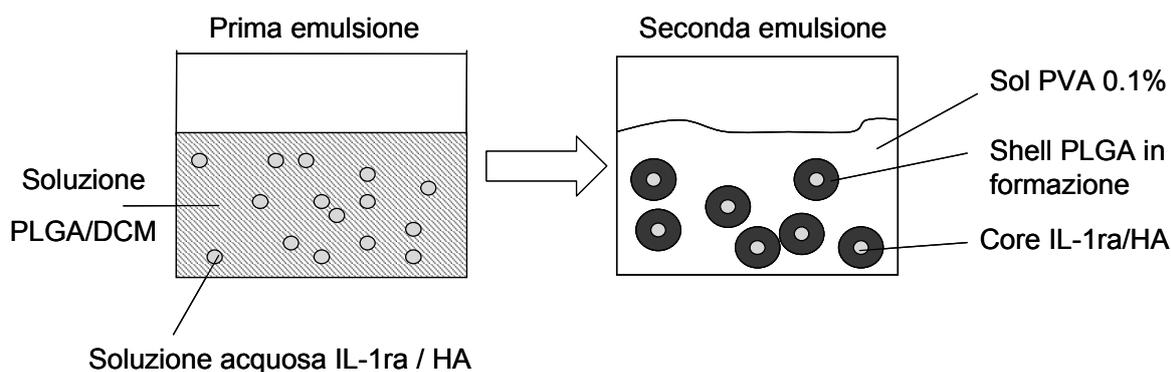


Figura 28 Metodica di doppia emulsione ed evaporazione del solvente

2.3.4 EMULSIONE E SPRAY DRYING (ESEMPIO)

- Fase A) 400mg di PLGA (50:50) Resomer RG503 (4%) sono stati solubilizzati in 10mL di DCM
- Fase B) 134µl di fiala di Anakinra (20mg IL-1Ra) sono stati diluiti ad 1mL con acqua milliQ

Le fasi A e B vengono emulsionate con Ultra Turrax T25 a 5000 rpm per 1min. L'emulsione ottenuta è stata trattata con spray dryer B-290 con le seguenti condizioni operative:

- Pompa peristaltica 20% (flusso feed 5ml/min)
- Tubo peristaltica di silicone 1.6mm X 3.2mm, spessore 0.8mm (SY952 Teknofluor)
- Spray Flow 40mm (473 Normolitri/h)
- Aspiratore 100% (40m³/h)
- Ciclone High Performance
- Temperatura IN: 50°C
- Temperatura OUT: ~30°C

Il prodotto ottenuto è stato posto in essiccatore per 12 ore.

2.3.5 SOSPENSIONE E SPRAY DRYING (ESEMPIO)

I° STEP Produzione di liofilizzato IL-1Ra/PEG

800mg di PEG 5kDa (Fluka) sono stati solubilizzati per agitazione in vortex in 34.64mL di acqua milliQ in provetta tipo Falcon da 50mL. La soluzione ottenuta è stata aggiunta sotto blanda agitazione del contenuto di 8 siringhe di Kineret (800mg di IL-1Ra in 5.36mL). La soluzione è stata trasferita in pallone da 250mL, congelata immediatamente con miscela di ghiaccio secco/acetone e liofilizzata per una notte.

II° STEP Produzione di microsfele per Sospensione e Spray drying

1.5g di PLGA (50:50) Resomer RG503H (Boehringer Ingelheim) sono stati solubilizzati in 37.5mL di Diclorometano (DCM) mediante agitazione magnetica provetta Falcon da 50ml.

A solubilizzazione avvenuta sono stati aggiunti alla soluzione 100mg di Epikuron 200SH (lecitina) (Cargill) mediante agitazione della soluzione su piastra magnetica. 400mg di liofilizzato (200mg IL-1ra, 200mg PEG 5kDa) sono stati aggiunti alla soluzione sotto agitazione magnetica. La sospensione così ottenuta è stata omogeneizzata con Sonicatore OMNI Ruptor250 per 60s al 40% della potenza (60 Watt) in ghiaccio e sotto agitazione magnetica.

La sospensione omogeneizzata è stata processata mediante Mini Spray Dryer Buchi B-290 con le seguenti condizioni operative:

- Pompa peristaltica 20% (flusso feed 5ml/min)
- Tubo peristaltica di silicone 1.6mm X 3.2mm, spessore 0.8mm (SY952 Teknofluor)
- Spray Flow 40mm (473 Normolitri/h)
- Aspiratore 100% (40m³/h)
- Ciclone High Performance
- Temperatura IN: 40°C
- Temperatura OUT: ~28°C

Il prodotto ottenuto è stato raccolto e posto in liofilizzatore per una notte.

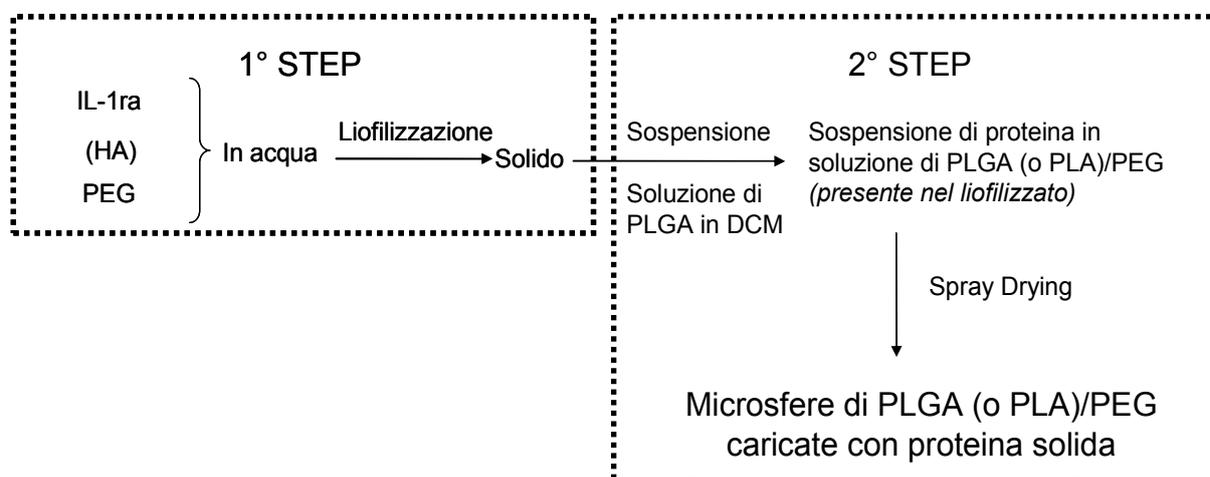


Figura 29 Metodo di preparazione di micro particelle mediante sospensione e spray drying

PLGA RG503H	75%
PEG 5kDa	10%
Epikuron 200SH	5%
IL-1Ra	10%

Tabella 4 Esempio di composizione finale del prodotto

La resa di prodotto è risultata essere compresa tra il 50% e il 70%.

III° STEP Preparazione di microsferi in matrice di mannitolo

È stata preparata una soluzione 7.5mg/ml di mannitolo in acqua. 1g di particelle è stato sospeso in 20ml di soluzione 7.5mg/ml di mannitolo. La sospensione è stata poi sonicata, congelata e liofilizzata.

2.3.6 PREPARAZIONE DI SOSPENSIONI DI MICROSFERE IN SOLUZIONE DI HYALECTIN (ESEMPIO)

57.5mg di polvere di microsfere con mannitolo sono stati inseriti in vial di vetro e aggiunti di 2ml di soluzione 7.5mg/ml di Hyalectin in tampone PBS pH 6.9. Il liofilizzato è stato fatto reidratare per 5min e poi si è agitato manualmente il vial senza mai rovesciare il contenitore. Una volta ottenuta una sospensione omogenea si è aspirato il contenuto del vial con siringa da 5ml e ago 23G. Si è riscontrata una buona siringabilità.

2.4 STUDI *IN VITRO*

2.4.1 CINETICA DI RILASCIO IN TAMPONE CITRATO DI FORMULAZIONI DI MICROSFERE CARICATE CON IL-1RA

Campioni di 20 mg di microsfere polimeriche caricate con IL-1Ra sono stati dispersi in 1 ml di tampone citrato a pH 6.5 con 0.02% di Sodio azide. A tempi definiti la sospensione è stata centrifugata per 5min a 6000 rpm, sono stati prelevati 50 µl di tampone di rilascio (rimpiazzati da 50µl di tampone fresco) e analizzati mediante sistema HPLC per determinare la concentrazione di citochina rilasciata. I risultati ottenuti sono stati riportati in percentuale di proteina rilasciata rispetto alla quantità di proteina caricata nelle formulazioni.

2.4.2 CINETICA DI RILASCIO IN LIQUIDO SINOVIALE DI FORMULAZIONI DI MICROSFERE CARICATE CON IL-1RA

I liquidi sinoviali (LS), ottenuti da pazienti dell'Unità Operativa di Reumatologia del Policlinico Universitario di Padova, sono stati raccolti in provette con EDTA; i liquidi sinoviali sono stati centrifugati per 20 minuti a 1000 rpm. I liquidi sinoviali sono stati riuniti e conservati in congelatore. Prima dell'utilizzo, i liquidi sono stati scongelati e ri-centrifugati a 3000 rpm per 10 minuti. Prima degli esperimenti i liquidi sinoviali sono stati diluiti 1:1 con tampone PBS.

5 mg di microsfere sono stati pesati e dispersi in 10mL di tampone (0.1% di Tween80) mediante vortexing. 50µL della sospensione (25µg di preparato ~ 1.5 µg di IL-1Ra se carica al 6%) sono stati prelevati e diluiti a 1.5mL con LS (1µg/ml IL-1Ra) e vortexati. È stata preparata una soluzione di IL-1Ra 1µg/ml in liquido sinoviale. Le sospensioni di microsfere in LS e la soluzione di controllo di IL-1Ra in LS sono state mantenute in agitazione a 37°C.

Ai tempi stabiliti sono stati effettuati i prelievi: i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti; 100 μ L di surnatante sono stati prelevati e congelati. Il surnatante prelevato è stato sostituito da 100 μ L di liquido sinoviale fresco.

I campioni prelevati sono stati analizzati mediante kit ELISA per IL-1Ra acquistato da RayBiotech. È stata monitorata anche la concentrazione di IL-1Ra nel liquido sinoviale tal quale in funzione del tempo per poi sottrarre la concentrazione basale di citochina dai campioni di rilascio. Il liquido sinoviale destinato a ripristinare i volumi è stato mantenuto in provette a 37°C così da permettere un decadimento della citochina identico a quello dei campioni di rilascio.

2.5 STUDI *IN VIVO*

2.5.1 STUDIO DI FARMACOCINETICA DI FORMULAZIONI MICROPARTICELLARI CARICATE CON IL-1Ra

40 mg di micro-particelle caricate con IL-1Ra sono stati sospesi in 0.5 ml di tampone PBS pH 7.4. La sospensione è stata trattata per 20s con omogeneizzatore ad ultrasuoni OmniRuptor250 al 20% della massima potenza (30Watt). La sospensione così ottenuta è stata iniettata per via intraperitoneale in topi Balb/c del peso di 30 g circa. A tempi predefiniti sono stati effettuati prelievi retro bulbari di sangue agli animali anestetizzati mediante capillare di vetro eparinizzato. Il sangue eparinizzato è stato centrifugato per eliminare la parte corpuscolare, ed il plasma, in seguito a opportune diluizioni, è stato testato per determinare la concentrazione di IL-1Ra mediante test ELISA utilizzando kit fornito da RayBiotech.

2.5.2 STUDIO DI EFFICACIA *IN VIVO* DI FORMULAZIONI MICROPARTICELLARI CARICATE CON IL-1Ra

Topi CD-1 sono stati immunizzati con una soluzione di Collagene Bovino di tipo II emulsionata con adiuvante di Freund completo. Gli animali sono stati monitorati per valutare l'insorgenza dell'artrite sperimentale. La somministrazione di particelle e formulazioni, usate come riferimento, è stata iniziata a 21 giorni dall'immunizzazione con collagene bovino.

Gli animali sono stati suddivisi in gruppi e trattati secondo uno schema predefinito. Le microsfele sono state sospese in tampone PBS (pH 7.4). Le sospensioni ottenute sono state trattate per 20s con omogeneizzatore a ultrasuoni OmniRuptor250 al 20% della massima potenza (30 Watt). La somministrazione è stata effettuata per via intraperitoneale mediante siringhe da 1ml con ago 23G.

I topi sono stati valutati a partire dall'induzione dell'artrite secondo una serie di parametri: il peso dell'animale, il "paw score", la misura del diametro della caviglia e la tumefazione del femore. Queste valutazioni sono state effettuate a giorni alterni fino alla fine del trattamento.

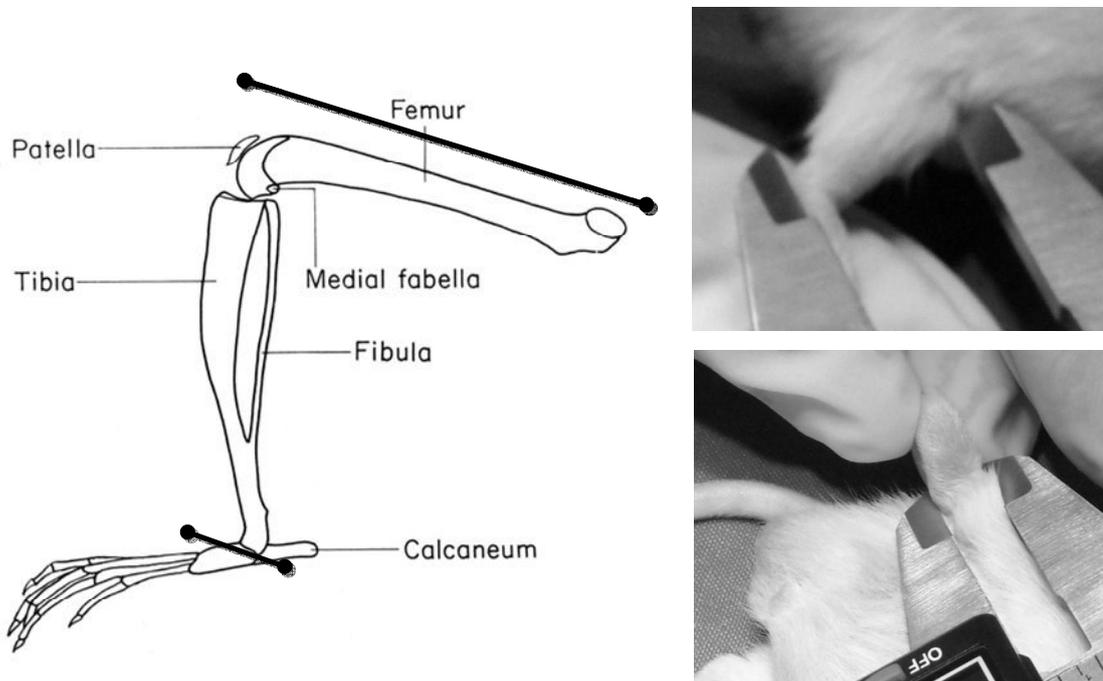


Figura 30 Esempio di misurazione del diametro della caviglia e della tumefazione del femore effettuata sugli animali utilizzati nello studio di efficacia delle formulazioni microparticellari

CAPITOLO 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 PROVE DI SOLUBILITA' DI HYAFF11

Sono state effettuate prove di solubilità di HYAFF11 P75 e P100 in vari solventi organici tra cui: metanolo, NMP, DMF, Cicloesano, DMSO, DCM, Isopropanolo, HFP (esafluoropropanolo). Da tali prove i polimeri sono risultati essere solubili, anche se con difficoltà, solo in NMP e DMSO e in entrambi tendono a dare soluzioni molto viscosi, con evidente propensione alla gelificazione. E' stato verificato che HYAFF11 P100 è solubile in HFP e per questo è stato utilizzato come solvente per le prove con tecnica spray drying.

3.2 PREPARAZIONE DI SISTEMI MICROPARTICELLARI MEDIANTE UTILIZZO DI DERIVATI DELL'ACIDO IALURONICO

Nella prima fase del progetto si è valutata la possibilità di preparare sistemi microparticellari contenenti IL-1Ra attraverso varie metodiche di produzione (spray-drying, microprecipitazione, emulsione/estrazione) utilizzando come polimero un derivato dell'acido ialuronico (HYAFF11 P100).

3.2.1 SPRAY DRYING

E' stata studiata la preparazione di microsfele mediante spray-drying in previsione di una produzione industriale, in quanto tale processo consente di ottenere prodotti solidi, sottoforma di polveri, da qualsiasi tipo di liquido, sia esso una soluzione, un'emulsione o una sospensione. Le soluzioni da processare in spray-dryer sono state preparate utilizzando HFP per la sua capacità di solubilizzare lo HYAFF, difficilmente solubile in altri solventi e per il basso punto di ebollizione (61°C).

3.2.1.1 *Preparazione delle formulazioni denominate "HSD 2-3-4-10-11"*

E' stata preparata una miscela 1:1 di HFP con DCM in cui solubilizzare i componenti polimerici. Tale miscela ha un basso punto di ebollizione derivante dai due solventi organici. Le formulazioni sono state preparate utilizzando solo HYAFF P100 o una miscela 1:1 di HYAFF e PEG 5000. Le condizioni operative sono riportate nella Tabella 5. Sono state

processate le soluzioni polimeriche a varie temperature allo scopo di trovare la condizione che garantisca la qualità migliore del prodotto finale. Le temperature investigate sono state di 45°C, 60°C e 70°C. Queste prove preliminari sono state effettuate con una concentrazione di HYAFF pari a 25 mg/ml nella miscela organica, poi ridotta a 12.5 mg/ml per operare ad una viscosità inferiore, caratteristica che dovrebbe rendere il materiale più facilmente processabile. Né la variazione di temperatura, né l'utilizzo di miscele di polimeri né la variazione di concentrazione di HYAFF hanno permesso di ottenere materiali particellari uniformi e con proprietà adeguate.

Prova	Componenti	Solvente	<u>Tin</u> (°C)	Pompa %	Flusso (cm)	Pgas (bar)	<u>Volume</u> (ml)	Conc mg/mL	Massa iniziale (g)	Massa ottenuta (g)	Resa %
2	Hyaff11P100	HFP-DCM 1:1	<u>45</u>	20	4	6	<u>20</u>	25	0.500	0.064	12.8
3	Hyaff11P100	HFP-DCM 1:1	<u>60</u>	20	4	6	<u>20</u>	25	0.500	0.083	16.6
4	Hyaff11P100 Peg5000	HFP-DCM 1:1	60	20	4	6	20	25	0.500 0.500	0.083	16.6
10	Hyaff11 P100 BA	HFP-DCM 1:1	70	10	4	6	10	12.5	0.125		0
11	Hyaff11 P100 BA Peg5000	HFP-DCM 1:1	70	10	4	6	10	12.5	0.125 0.500		0

Tabella 5

3.2.1.2 Preparazione delle formulazioni denominate "HSD 9-15"

Le formulazioni ottenute usando 12.5mg/ml di HYAFF 11P100 BA, solubilizzato in HFP, hanno portato ai migliori risultati. Sono state ottenute particelle aggregate e con aspetto filamentoso ma discretamente disperdibili in tampone fosfato così come in soluzioni acquose contenenti PEG 5000 o Pluronic F127 al 3% impiegate come "dissolution promoters". La tabella 6 riporta i parametri operativi usati per queste formulazioni.

Prova	Componenti	Solvente	<u>Tin</u> (°C)	Pompa %	Flusso (cm)	Pgas (bar)	<u>Volume</u> (ml)	Conc mg/mL	Massa iniziale (g)	Massa ottenuta (g)	Resa %
9	Hyaff11 P100 BA	HFP	<u>70</u>	10	4	6	<u>10</u>	12.5	0.125		0
15	Hyaff11 P100 TBA	HFP	<u>70</u>	7	4	6	<u>8</u>	12.5	0.100	0.058	58

Tabella 6

3.2.1.3 Preparazione delle formulazioni denominate "HSD 12-13-14-16-17"

Sulla base delle formulazioni riportate al punto precedente si è deciso di incorporare fin da subito alcuni adiuvanti che potessero promuovere la ridispersione delle particelle. Si sono

prodotte particelle a partire da miscele in HFP di HYAFF11 P11 TBA (12.5 mg/ml) e Pluronic F127 (12.5 mg/ml) o Epikuron 100H (12.5 mg/ml) o PEG 5000 (12.5 mg/ml). Solo le particelle ottenute dalla soluzione di HYAFF e Pluronic sono risultate essere ben disperdibili e dall'aspetto polverulento. I parametri operativi sono riportati nella Tabella 7.

Prova	Componenti	Solvente	T_{in} (°C)	Pompa %	Flusso (cm)	Pgas (bar)	Volume (ml)	Conc mg/mL	Massa iniziale (g)	Massa ottenuta (g)	Resa %
12	Hyaff11 P100 BA Peg5000	HFP	70	7	4	6	8	12.5	0.100 0.100		0
13	Hyaff11 P100 BA Epikuron 100H	HFP-CHCl3 10:1	70	7	4	6	8	12.5	0.100 0.010		0
14	Hyaff11 P100 BA Pluronic P-127	HFP	70	7	4	6	6	12.5	0.075 0.075		0
16	Hyaff11 P100 TBA Pluronic P-127	HFP	70	7	4	6	8	12.5	0.100 0.100	0.094	47
17	Hyaff11 P100 TBA Peg5000	HFP	70	7	4	6	8	12.5	0.100 0.100	0.107	53.5

Tabella 7

Nonostante ci siano stati alcuni miglioramenti, durante gli adattamenti metodologici, nelle proprietà della formulazione finale, la metodica per spray-dryer non è adeguata alla produzione di sistemi microparticellari utilizzando il polimero HYAFF.

3.2.2 NANOPRECIPITAZIONE

3.2.2.1 Preparazione delle formulazioni denominate LBH 3-4.

Due diverse soluzioni al 10% di HYAFF11 P100 in DMSO o NMP (500 mg di HYAFF11 P100 in 5 ml di solvente) sono state gocciolate in DCM (100ml) tenuto sotto costante e vigorosa agitazione. Il materiale che spontaneamente si separa dalla fase acquosa è stato recuperato per filtrazione ed essiccato. Come si nota dalla Figura 31 non si è ottenuto un materiale polverulento ma piuttosto un aggregato.

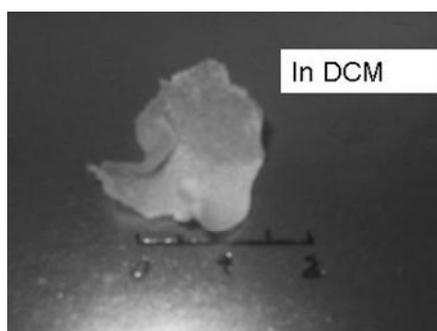


Figura 31 Prodotto ottenuto per nanoprecipitazione in DCM

3.2.2.2 Preparazione delle formulazioni denominate LBH 13-14-15.

Sono state ripetute le formulazioni riducendo la concentrazione dello HYAFF fino al 7.4% ed è stata eseguita la nanoprecipitazione in solventi diversi. Tre diverse soluzioni al 7.4% di HYAFF11 P100 TBA in DMSO (200 mg HYAFF11 P100 TBA in 2,7 mL DMSO) sono state gocciolate in una soluzione all'1.5% di Pluronic F127 (50ml), o in acqua mQ (35ml) o in etile acetato (35ml) sotto agitazione mediante turboemulsore senza ottenere, però, prodotti polverulenti, come si può notare nella figura 32. I prodotti ottenuti sono grossolani e filamentosi. Vista l'impossibilità di ottenere dei prodotti polverulenti si è deciso di non utilizzare nuovamente questa tecnica.

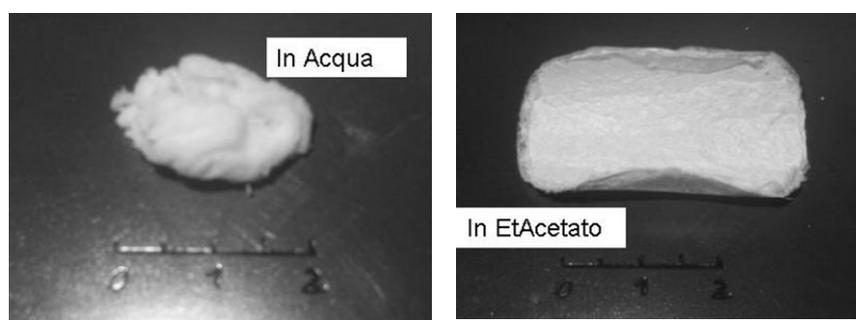


Figura 32 Prodotti ottenuto per nanoprecipitazione in acqua/pluronic ed etil acetato.

3.2.3 EMULSIONE, ESTRAZIONE DELLA FASE INTERNA E PRECIPITAZIONE

Seguendo una procedura riportata in letteratura⁷⁴ per la processazione di HYAFF, sono state effettuate preparazioni mediante la tecnica di emulsione:

3.2.3.1 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 5"

Una soluzione al 7,4% di HYAFF11 P100 BA in DMSO (200 mg di HYAFF11 P100 BA in 2,7 ml di DMSO) è stata emulsionata con 16 ml di Kaidol (olio minerale) usando 0,124 ml di Arlacel A come emulsionante. L'emulsione è stata gocciolata in 46 ml di etile acetato fino a precipitazione del polimero. Il materiale separato dalla fase liquida è stato filtrato, lavato con etile acetato ed essiccato. Il prodotto si presenta polverulento e ben disperdibile sia in PBS che in PBS contenente PEG 5000 o Pluronic F127. Le dimensioni delle particelle sono di circa 20 μm , come è stato verificato mediante misurazione con microscopio ottico dotato di analizzatore d'immagini (Figura 33).

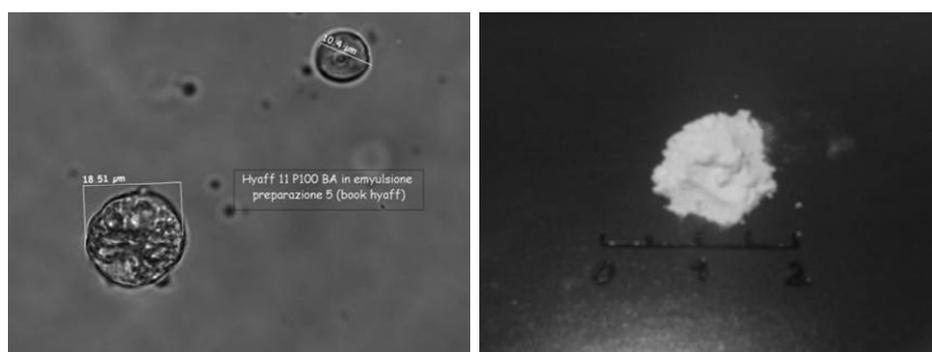


Figura 33 Immagine ottenuta mediante microscopia ottica di particelle di HYAFF ottenute per emulsione (sinistra) e materiale appena processato (destra).

3.2.3.2 Preparazione delle formulazioni denominate “LBH 6-7”

Al fine di valutare la possibilità di includere nella formulazione eccipienti in grado di modulare la cinetica di rilascio di proteine, sono state preparate due soluzioni in DMSO, la prima contenente HYAFF e PEG 5000 in rapporto 4:1 (w/w), la seconda con HYAFF e Pluronic F127 in rapporto 4:1 (w/w). Le soluzioni sono state processate come riportato al paragrafo precedente; i prodotti ottenuti si presentano come polveri fini, ben disperdibili in tampone fosfato e dalle dimensioni comprese tra i 9 e i 15 µm come evidenziato nella Figura 34.

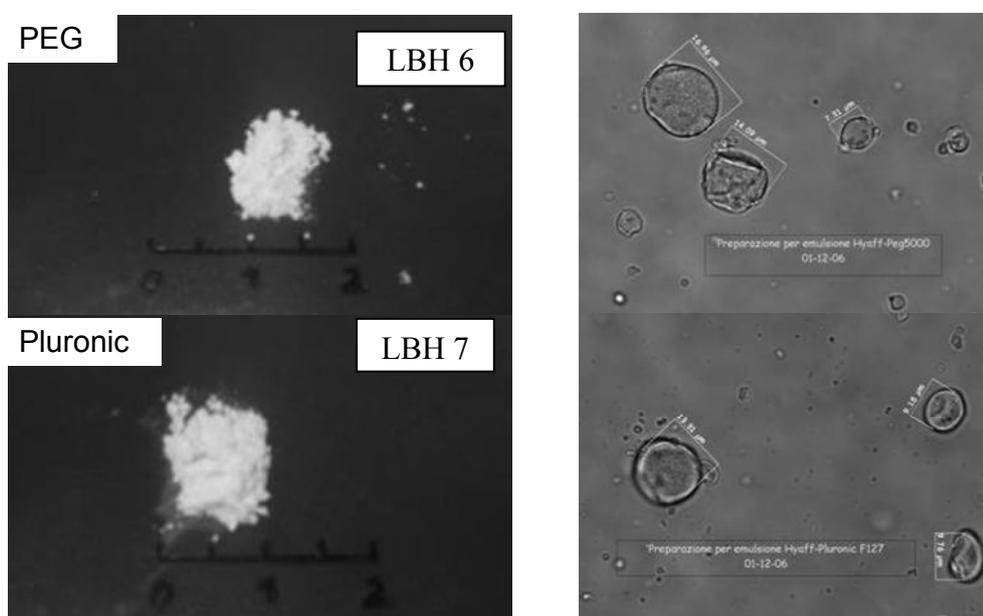


Figura 34 Immagine ottenuta mediante microscopia ottica di particelle di HYAFF/PEG e HYAFF/Pluronic ottenute per emulsione (destra) e materiale appena processato (sinistra).

Questa tecnica sembra quindi potenzialmente valida per l’ottenimento di prodotti con caratteristiche morfologiche e chimico-fisiche adeguate allo scopo del progetto.

3.2.3.3 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 11"

Visti i buoni risultati ottenuti nella formulazione di particelle non caricate con citochina, si è proceduto alla produzione di microsfeere di HYAFF e PEG 5 kDa caricate con IL-1Ra. Una soluzione al 7.4% di HYAFF11 P100 TBA in DMSO (2.7 ml) contenente 20 mg di IL-1Ra è stata processata per emulsione. E' stata prodotta una polvere di buona qualità, disperdibile ed omogenea. Lo studio di rilascio eseguito in tampone citrato pH 6.5 non ha evidenziato alcun rilascio di citochina dalle particelle come mostrato in Figura 35.

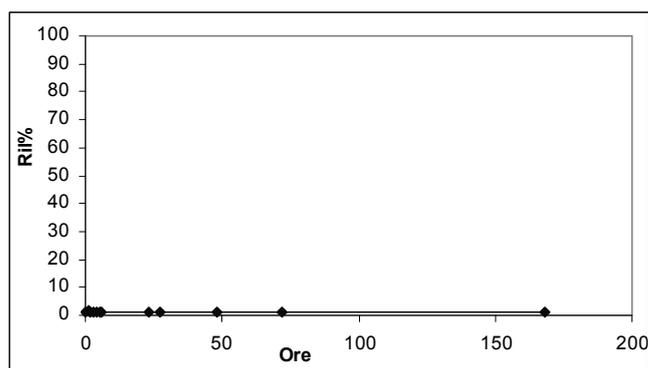


Figura 35 Studio di rilascio in tampone di IL-1Ra da particelle di HYAFF e PEG 5kDa

La citochina molto probabilmente non viene rilasciata poichè il processo di produzione delle particelle e il contatto con solventi organici ne provoca la degradazione chimica o, più probabilmente, l'unfolding con conseguente aggregazione e insolubilizzazione. Inoltre la citochina potrebbe non essere rilasciata dalla matrice polimerica poichè le particelle non erodono o il polimero non degrada. Per approfondire il problema sono state in seguito formulate ulteriori preparazioni, in primo luogo valutando l'effetto del solvente organico sulla stabilità della proteina e sulla produzione di microparticelle.

3.2.3.4 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 16"

Simili particelle sono state anche prodotte impiegando HFP in alternativa al DMSO. Essendo HFP un solvente basso bollente risulta infatti più conveniente rispetto al DMSO. Una soluzione al 7,4% di HYAFF11 P100 TBA in HFP (2.7 ml) è stata processata seguendo lo stesso procedimento per emulsione riportato per la preparazione LBH 5, ottenendo una polvere di buona qualità, disperdibile ed omogenea. Si è proceduto quindi al caricamento di IL-1Ra in microsfeere di HYAFF sostituendo il DMSO con HFP.

3.2.3.5 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 17"

Una soluzione al 7,4% di HYAFF11 P100 TBA in HFP (2.7 ml) contenente 20 mg di IL-1Ra è stata processata come le preparazioni precedenti, ottenendo una polvere di buona qualità, disperdibile ed omogenea. Gli studi di rilascio in tampone citrato pH 6.5, però, non hanno mostrato alcun rilascio significativo di farmaco dalle particelle stesse come si evince dalla Figura 36.

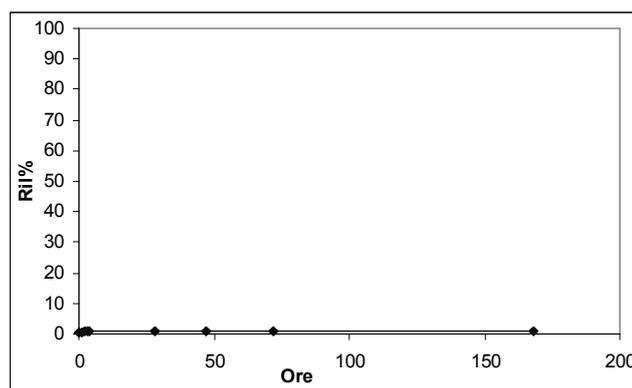


Figura 36 Studio di rilascio in tampone di IL-1Ra da particelle di HYAFF

Poiché anche le particelle ottenute per emulsione dei componenti in HFP non mostrano alcun rilascio di IL-1Ra, si è studiato se il processo in sé provoca denaturazione della citochina. IL-1Ra è stata processata nelle stesse condizioni delle preparazioni LBH 11-17 in assenza di HYAFF. Il prodotto solido che si recupera alla fine del processo non è risultato solubile in acqua indicando che il processo stesso provoca la completa denaturazione della proteina e la rende insolubile.

E' stato eseguito anche un test per valutare se solo il contatto con i solventi organici potesse rendere insolubile la citochina in seguito ad unfolding. IL-1Ra è stata solubilizzata in DMSO e HFP e le due soluzioni sono state liofilizzate. Dopo liofilizzazione la proteina non è più solubile in acqua, indicando che il problema principale della sua denaturazione è il contatto e la dissoluzione nei solventi organici più che il processo di produzione delle particelle.

Pertanto questo metodo di preparazione non è come tale adatto alla preparazione delle microsfele contenenti IL-1Ra. Per ovviare a questo problema si è perseguita quindi una procedura che non richiedesse la dissoluzione della citochina in solventi organici. Per questo si è pensato di produrre particelle di IL-1Ra e acido ialuronico come agente protettivo e insolubile in solvente organico e di far quindi aggregare queste particelle all'interno di una matrice di HYAFF in una sorta di sistema definito core-shell.

3.2.3.6 *Preparazione della formulazione denominata "LBH 19-20"*

Due diverse soluzioni di acido ialuronico (100 o 200 mg di Hyalastine in 2.7 ml di acqua mQ) sono state emulsionate con 16 ml di Kaidol (olio minerale) mediante turboemulsore. Le emulsioni così ottenute sono state aggiunte goccia a goccia a 46 ml di Acetone/Etile acetato 1:1 sotto agitazione; le sospensioni sono state filtrate e lavate con acetone ed etile acetato. Il materiale ottenuto è stato sottoposto a microscopia ottica, analisi che ha evidenziato come le particelle abbiano dimensioni di 0.5-2 μm nella formulazione ottenuta con la concentrazione inferiore di HA (100 mg in 2.7 ml di acqua). Le microsfele sono risultate completamente solubili in soluzioni acquose. Si è deciso pertanto di procedere al caricamento delle stesse particelle con IL-1Ra.

3.2.3.7 *Preparazione della formulazione denominata "LBH 21-23"*

Due soluzioni di acido ialuronico e IL-1Ra (160-180 mg Hyalastine e 40-20 mg di IL-1Ra in 4.32 ml di H₂O milliQ) sono state emulsionate con 25.6 ml di Kaidol (olio minerale) mediante turboemulsore. Le emulsioni così ottenute sono state aggiunte goccia a goccia a 100 ml di Acetone/Etile acetato 1:1 sotto agitazione. Le sospensioni ottenute sono state filtrate e lavate con Acetone/Etile acetato. I prodotti sono risultati essere polveri fini contenenti presumibilmente il 20 o il 10% in peso di IL-1Ra. Mediante microscopia ottica si sono verificate dimensioni delle microsfele pari a 2-5 μm . Le microsfele ottenute sono state quindi solubilizzate in acqua ed è stata testata la quantità di IL-1Ra rilasciata dal sistema mediante analisi HPLC. I risultati ottenuti hanno dimostrato che tutta la proteina caricata risulta solubile indicando che questo procedimento è compatibile con l'integrità della citochina. Si è proceduto quindi alla inclusione delle microparticelle di Hyalastine/IL-1Ra in HYAFF.

3.2.3.8 *Preparazione della formulazione denominata "LBH 22-24"*

100-200 mg di HYAFF11 P100 TBA sono stati solubilizzati in DMSO; in queste soluzioni sono stati sospesi 100 mg di particelle HA/IL-1Ra (formulazioni LBH 21-23). Le sospensioni ottenute sono state emulsionate con 32 ml di Kaidol (olio minerale) mediante turboemulsore. Le emulsioni sono state aggiunte goccia a goccia a 92 ml di etile acetato sotto agitazione. Il materiale sospeso è stato recuperato per filtrazione e lavato con etile acetato e n-esano per tre volte l'uno. Il prodotto risulta essere una polvere abbastanza fine ed omogenea. Le microsfele sono state osservate mediante SEM, analisi che ha mostrato la presenza di particelle dalla forma sferica, compatte e dalle dimensioni comprese tra i 5 e i 10 μm (Figura 37).

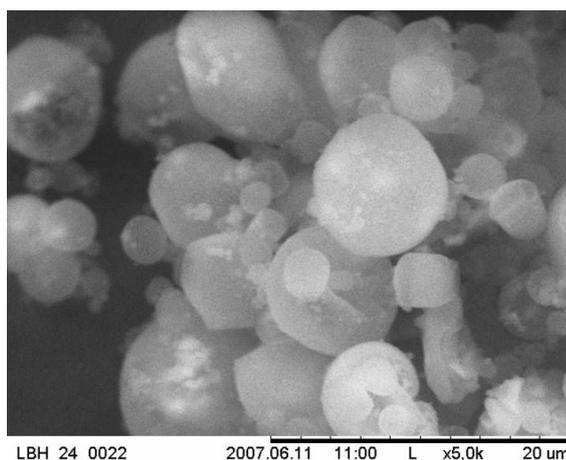


Figura 37 Analisi SEM della formulazione di particelle LBH 24

Sono stati condotti studi di rilascio di IL-1Ra in tampone citrato pH 6.5 da microsfele delle formulazioni LBH 22-24 da cui risulta un rilascio immediato di circa il 45-50% di citochina caricata ma non si nota alcun rilascio protratto nelle successive 300 ore (Figura 38).

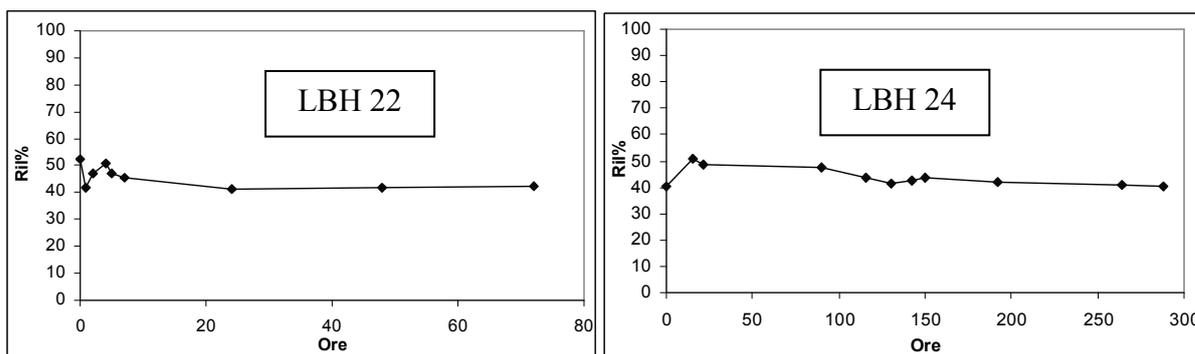


Figura 38 Cinetica di rilascio di IL-1Ra da particelle della formulazione LBH 22 e 24.

Questa particolare metodica di ottenimento di particelle core-shell ha quindi permesso di proteggere la citochina dall'azione denaturante dei solventi organici e garantisce un rilascio di IL-1Ra integra dal sistema. Sono state effettuate altre preparazioni (LBH 31-32-33-34-35-36) per cercare di migliorare la metodica ed ottenere un rilascio modulato di IL-1Ra ma non si è riusciti ad ottenere un sistema con una profilo di rilascio adeguato.

I risultati poco incoraggianti ottenuti utilizzando i derivati insolubili dell'acido ialuronico sono dovuti principalmente alle caratteristiche chimico-fisiche degli stessi: la loro solubilità, infatti, essendo limitata a solventi come DMSO e HFP, costringe ad operare in condizioni aggressive per la proteina che deve essere caricata. Si è così deciso di proseguire la sperimentazione sostituendo questi polimeri con i poliesteri biodegradabili comunemente

utilizzati in drug delivery (PLA e PLGA) che possono essere processati con metodiche più semplici e richiedono l'impiego di solventi meno aggressivi.

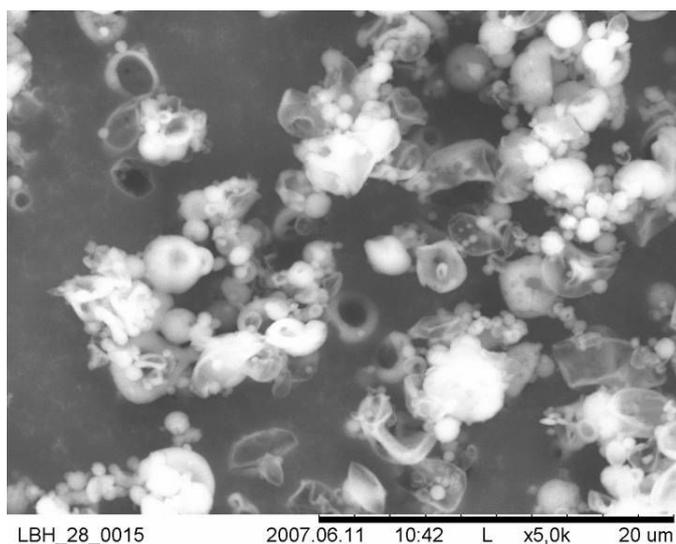
3.3 PREPARAZIONE DI SISTEMI MICROPARTICELLARI MEDIANTE UTILIZZO DI POLIESTERI BIODEGRADABILI

3.3.1 TECNICA DI EMULSIONE E SPRAY DRYING

3.3.1.1 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 25-26-27-28-29"

Si sono effettuate alcune preparazioni per valutare la possibilità di produrre microparticelle di poliesteri processando emulsioni di acqua (fase interna) in DCM (fase esterna) mediante tecnica spray-drying. Nel DCM è stato solubilizzato PLGA 50:50 e nella fase acquosa è stata solubilizzata IL-1Ra. Nella fase interna è stato aggiunto anche HA (formulazione denominata LBH 29) quale agente stabilizzante e promotore del rilascio della citochina, date le sue caratteristiche di buona idrofilia che favoriscono la creazione di pori nella particella. Lo scopo del processo è quello di ottenere particelle costituite da un core idrosolubile contenente la citochina stabilizzata e ricoperto da uno shell idrofobico di PLGA.

Mediante questa metodica sono state ottenute microsfele dalle dimensioni comprese tra 2 e 10 μm (Figura 39).



	Volume o peso
DCM	10 ml
PLGA RG503	400 mg
Acqua MilliQ	1 ml
IL-1Ra	20 mg

Figura 39 Analisi SEM della formulazione di particelle LBH 28

Si sono condotti studi di rilascio in tampone citrato pH 6.5 (riportati di seguito) di IL-1Ra dalle microsfele ottenute con questa metodica che hanno evidenziato un burst di rilascio

iniziale del 22–25% rispetto alla proteina caricata ma non è stato notato alcun rilascio ulteriore di citochina fino a 300 ore (Figura 40).

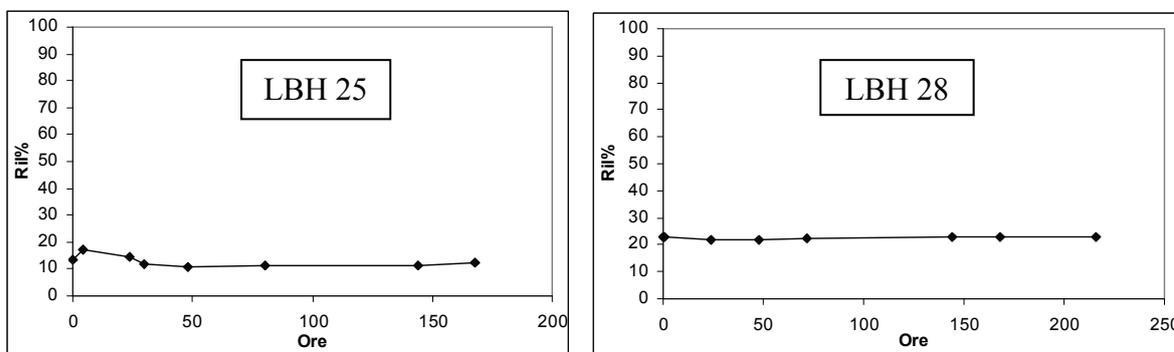


Figura 40 Cinetica di rilascio di IL-1Ra da particelle delle formulazioni LBH 25 e 28

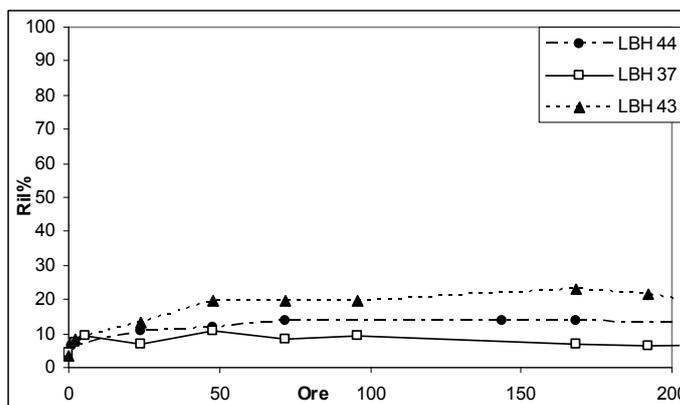
Questa metodica di preparazione di microparticelle, più semplice dal punto di vista tecnologico rispetto alle precedenti finora riportate e con un numero minore di steps preparativi, è risultata essere adatta alla produzione di sistemi microparticellari per la veicolazione di IL-1Ra. Va detto che la resa è inferiore rispetto alle tecniche precedenti ed anche il loading di citochina è inferiore. Anche in seguito ad adattamenti della composizione della formulazione e dei parametri operativi effettuati (temperatura di esercizio dello spray dryer, velocità di spray dell'emulsione) non si sono ottenute particelle ritenute accettabili per il proseguimento di questa specifica metodica formulativa.

3.3.2 DOPPIA EMULSIONE ED EVAPORAZIONE DEL SOLVENTE

3.3.2.1 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 37-43-44"

Soluzioni acquose di IL-1Ra come da fiala di Kineret (formulazione denominata LBH 37) o aggiunte di acido ialuronico (formulazione denominata LBH 43) o un derivato estereo solubile di acido ialuronico (HYAFF P50, ialuronico esterificato al 50%) (formulazione denominata LBH 44), sono state emulsionate con soluzioni di PLGA (Resomer RG503) in DCM mediante l'utilizzo di agitatore magnetico. L'emulsione ottenuta viene gocciolata in soluzioni acquose contenenti un tensioattivo e le emulsioni trifasiche così ottenute sono state sottoposte ad agitazione sotto vuoto per permettere l'evaporazione del solvente organico inducendo così la precipitazione del PLGA e l'intrappolamento della citochina. Il prodotto è stato recuperato mediante centrifugazione, lavaggio con acqua depurata e successiva liofilizzazione. Le particelle ottenute sono state analizzate mediante microscopia ottica che ha mostrato una dimensione compresa tra i 4 e i 15 μm . Gli studi di rilascio effettuati hanno

dimostrato che la citochina viene rilasciata dalle microsfeere per circa 48-72 ore come evidenziato nella Figura 41. Questo profilo è nettamente migliore rispetto a quelli finora ottenuti.



	LBH 37	LBH 43	LBH 44
DCM	2 ml	2 ml	2 ml
PLGA	400 mg	400 mg	400 mg
Ialuronico	0 mg	50 mg	30 mg
IL-1Ra	20 mg	20 mg	20 mg
Tween80	5 g	2 g	2 g
Acqua	200 ml	200 ml	200 ml

Figura 41 Cinetica di rilascio in tampone citrato pH 6.5 di IL-1Ra dalle formulazioni LBH 37, 43, 44.

3.3.2.2 Preparazione delle formulazioni denominate “LBH 47-48-49-50-51-52-53-54-61”

Allo scopo di migliorare le caratteristiche fisiche e di rilascio dei sistemi particellari ottenuti sono state apportate alcune modifiche alla formulazione. Soluzioni di 20 mg di IL-1Ra e 5 mg di Hyalastine (formulazioni denominate LBH 50-51-52-53-54-61) o HYAFF11 P50 (derivato dell'acido ialuronico solubile in acqua) (formulazione denominata LBH 48) sciolti in 200 µl di acqua sono state emulsionate con 4 ml di soluzione 100 mg/ml di PLGA, eventualmente in parte sostituito da PEG 5 kDa (formulazioni denominate LBH 51-53-54-61), in DCM mediante l'utilizzo di turboemulsore (formulazioni denominate LBH 47-48-49-50-51-61) o di agitatore meccanico (formulazioni denominate LBH 52-53-54). L'emulsione così ottenuta è stata emulsionata a sua volta con 15 ml di soluzione 0.1% di polivinilalcol (PVA) in acqua. La doppia emulsione risultante è stata diluita in 85 ml di soluzione 0.1% di PVA in acqua sotto agitazione e sotto vuoto per permettere l'evaporazione del solvente organico causando così la precipitazione del PLGA e l'intrappolamento della citochina nelle

microsfere. Mediante analisi microscopica si è evidenziato che le particelle ottenute avevano dimensioni comprese tra i 2 e i 20 μm .

L'efficienza di caricamento di questi sistemi è del 30-40%. Dagli studi di rilascio effettuati in tampone citrato pH 6.5 si è verificato che la citochina viene resa disponibile dalle microsfere gradatamente per un tempo di 48-72 ore, come si può osservare nella figura 42, solo nella formulazione LBH 51, caratterizzata dalla presenza di PEG e HA e dall'utilizzo di turboemulsore.

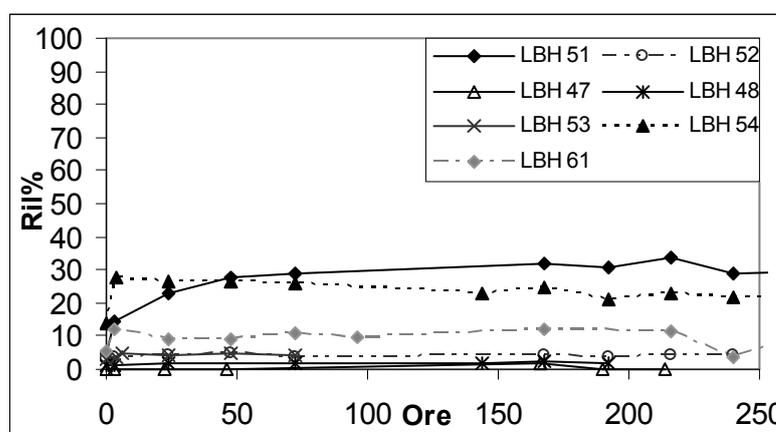


Figura 42 Cinetica di rilascio in tampone citrato pH 6.5 di IL-1Ra da particelle delle formulazioni LBH 47, 48, 51, 52, 53, 54, 61.

3.3.3 SOSPENSIONE E SPRAY DRYING

3.3.3.1 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 55-56-57"

Allo scopo di diminuire il rischio di degradazione della proteina durante le fasi di emulsione che possono indurre unfolding irreversibile della citochina e di aumentare l'incorporamento di farmaco, si è sviluppato un nuovo protocollo di preparazione delle microsfere: la proteina è stata processata in forma solida così da evitare le cause di degradazione che si presentano in soluzione.

Soluzioni acquose di IL-1Ra aggiunte di PEG ed eventualmente HA sono state liofilizzate, ottenendo così polveri fini adatte ad essere sospese in solvente organico; i liofilizzati sono stati dispersi mediante turboemulsore in soluzioni di PLGA (o PLA) in DCM in cui il PEG risulta solubile ottenendo una micro-sospensione della proteina (e dell'HA se presente); la sospensione così ottenuta è stata processata mediante Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI).

Questa metodica ha permesso di ottenere micro-particelle costituite da una matrice di polimero biodegradabile nella quale è intrappolata fisicamente IL-1Ra allo stato solido. Sono state preparate alcune formulazioni di microparticelle utilizzando liofilizzati composti da HA, IL-1Ra e PEG in rapporto ponderale 1:1:1 (formulazione denominata LBH 55), 1:1:2 (formulazione denominata LBH 56) e 1:1:4 (formulazione denominata LBH 57). Le dimensioni delle microsfele sono state analizzate mediante uno strumento a diffrazione laser. Le particelle hanno diametro compreso tra 5 e 20 μm come mostrato in figura 43.

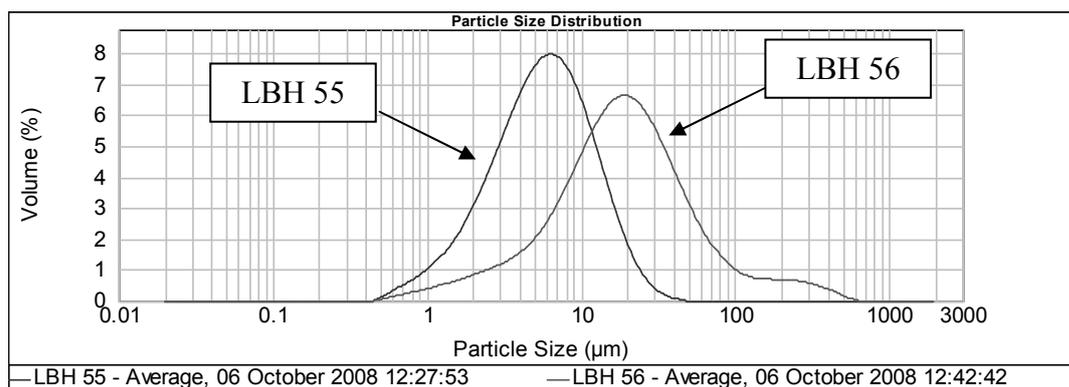
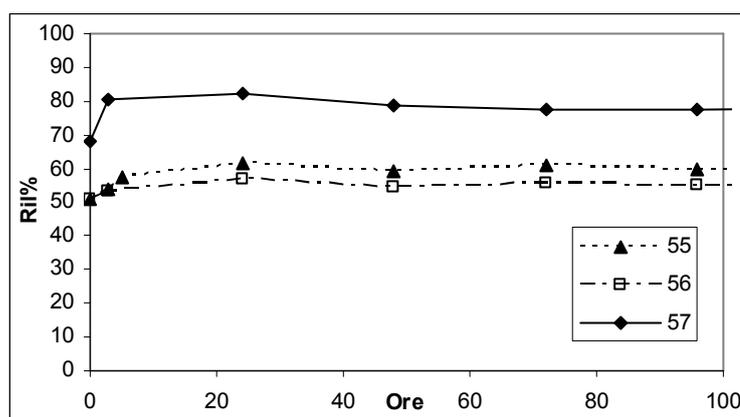


Figura 43 Analisi dimensionale di particelle ottenute per sospensione e spray drying

Considerate le caratteristiche morfologiche dei campioni ottenuti si è concluso che un rapporto elevato di PEG nel liofilizzato rispetto agli altri componenti induce la formazione di micro particelle scarsamente risospesibili dopo la fase produttiva (formulazione denominata LBH 57). Inoltre, la presenza di HA nel liofilizzato rende disomogenea la dispersione del liofilizzato stesso nella soluzione organica di PLGA.

La presenza di PEG nella formulazione condiziona inoltre la cinetica di rilascio della citochina e, all'aumentare del rapporto di PEG, viene ridotta l'efficienza di incorporamento nelle microparticelle. Come si nota nella Figura 44 le formulazioni LBH 55 e 56 presentano un rilascio di proteina istantaneo di circa 50% (che corrisponde a citochina non incorporata) mentre la formulazione 57 mostra una percentuale del 70% di proteina rilasciata immediatamente.



	LBH 55	LBH 56	LBH 57
DCM	5 ml	5 ml	5 ml
PLGA	200 mg	200 mg	200 mg
PEG	10 mg	20 mg	40 mg
IL-1Ra	10 mg	10 mg	10 mg
HA	10 mg	10 mg	10 mg

Figura 44 Profilo di rilascio in tampone citrato pH 6.5 delle formulazioni ottenute per sospensione di IL-1Ra con PEG e HA

Sulla base di questi risultati il metodo di preparazione delle microparticelle è stato riadattato: il liofilizzato di citochina è stato preparato utilizzando unicamente PEG e non HA. Inoltre si è scelto di utilizzare per le successive preparazioni il liofilizzato IL-1Ra/PEG con rapporto 1:1 per facilitare la micro-sospensione della citochina nella soluzione organica di PLGA e migliorare il caricamento di IL-1Ra nelle microsfe.

3.3.3.2 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 59-62"

Allo scopo di migliorare il profilo di rilascio delle microparticelle prodotte mediante la tecnica di sospensione e spray drying, si sono testate le performance di due diversi tipi di PLGA che costituiscono la matrice insolubile delle particelle: RG503 (formulazione denominata LBH 59) e RG503H (formulazione denominata LBH 62). Questi due poliesteri differiscono per avere il gruppo carbossilico terminale libero o esterificato che determina un diverso rapporto idrofilicità/idrofobicità e una diversa cinetica di degradazione. La figura 45 mostra l'analisi dimensionale di particelle ottenute con questa metodica e con i due tipi di PLGA.

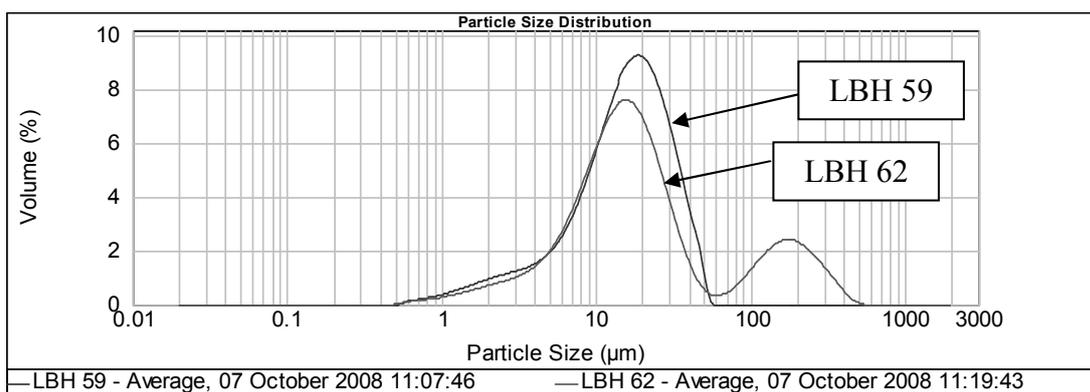
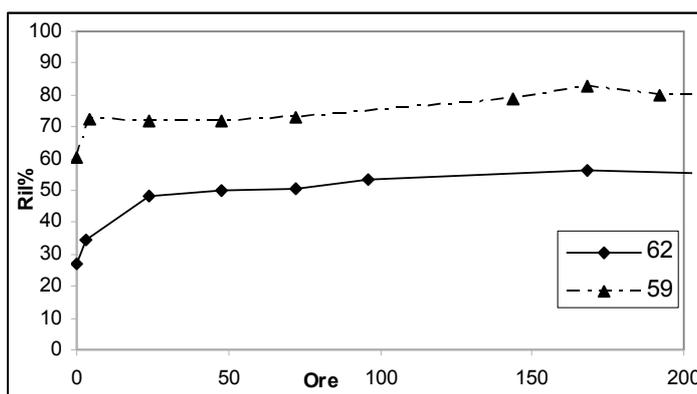


Figura 45 Analisi dimensionale di particelle ottenute per sospensione e spray drying con due diversi tipi di PLGA.

Resomer RG503H consente di avere una cinetica di rilascio di IL-1Ra protratta per circa 48 ore, mentre Resomer RG503, pur garantendo una percentuale maggiore di citochina rilasciata rispetto alla proteina caricata, non mostra un rilascio sostenuto nel tempo (Figura 46). Si è quindi scelto di utilizzare, per le prove successive, solo il Resomer RG503H.

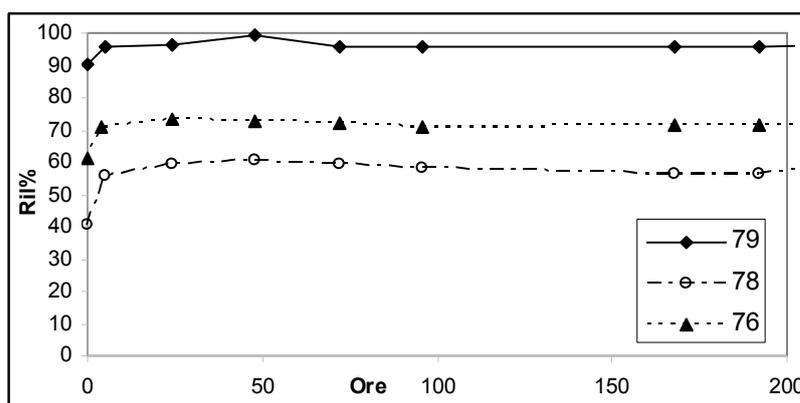


Componenti	LBH 59-62
DCM	4 ml
PLGA	160 mg
PEG 5kDa	20 mg
IL-1Ra	20 mg

Figura 46 Profilo di rilascio in tampone citrato pH 6.5 delle formulazioni ottenute per sospensione di IL-1Ra e PEG e due diversi tipi di PLGA.

3.3.3.3 Preparazione delle formulazioni denominate “LBH 76-78-79”

Con l’intento di caratterizzare tutte le variabili del processo di produzione mediate questa metodica, è stato studiato se la concentrazione di PLGA nella soluzione di DCM avesse un effetto sulla cinetica di rilascio di IL-1Ra dalle microparticelle. I risultati riportati in Figura 47 hanno evidenziato che la formulazione LBH 78 in cui la concentrazione di PLGA in DCM è inferiore (2% p/v), permette un caricamento di citochina maggiore anche se si ottiene un rilascio inferiore rispetto alla formulazione LBH 76 (concentrazione di PLGA del 4% p/v).

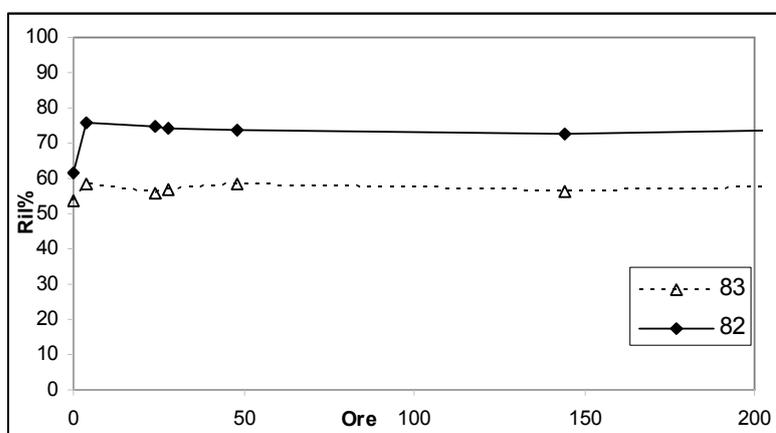


	Conc PLGA
LBH 76	4 %
LBH 78	2 %
LBH 79	8 %

Figura 47 Profilo di rilascio in tampone citrato pH 6.5 delle formulazioni ottenute con Resomer RG503H processato in diverse concentrazioni in DCM.

3.3.3.4 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 82-83"

E' stato successivamente valutato quale effetto potesse avere, sulle proprietà tecnologiche delle formulazioni, la quantità di sospensione iniettata per minuto nell'impianto di spray drying. Si è notato che all'aumentare della velocità di *feed* dello strumento si ha un aumento della resa di caricamento della citochina come mostrato nella figura 48.

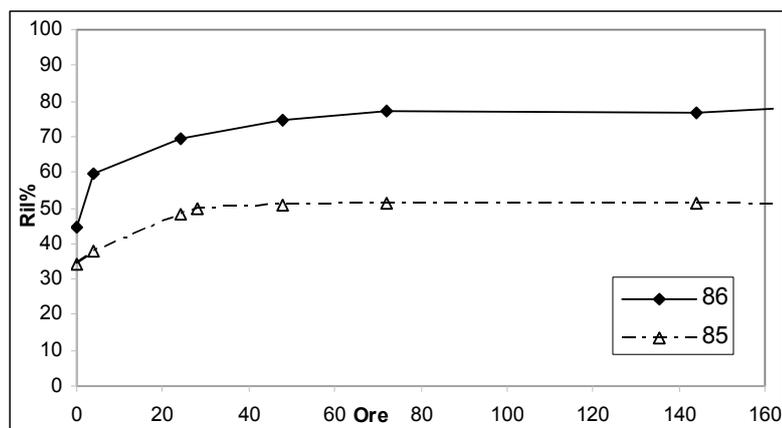


	Velocità feed
LBH 82	4 ml/min
LBH 83	5 ml/min

Figura 48 Profilo di rilascio in tampone citrato pH 6.5 delle formulazioni ottenute iniettando nello spray dryer le sospensioni a velocità di feed diverse.

3.3.3.5 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 85-86"

E' stata studiata anche la preparazione di sistemi particellari impiegando acido polilattico (PLA) quale matrice insolubile biodegradabile. Tali formulazioni sono state eseguite seguendo lo stesso metodo di sospensione e spray drying sopra descritto, sospendendo in DCM i liofilizzati provenienti da soluzioni di IL-1Ra/PEG (formulazione denominata LBH 86) o solo IL-1Ra (formulazione denominata LBH 85). I profili di rilascio ottenuti con queste formulazioni sono riportati nella Figura 49.



	LBH 85	LBH 86
DCM	4.5 ml	4 ml
PLA	180 mg	160 mg
PEG	0 mg	20 mg
IL-1Ra	20 mg	20 mg

Figura 49 Profilo di rilascio in tampone citrato pH 6.5 delle formulazioni ottenute con PLA.

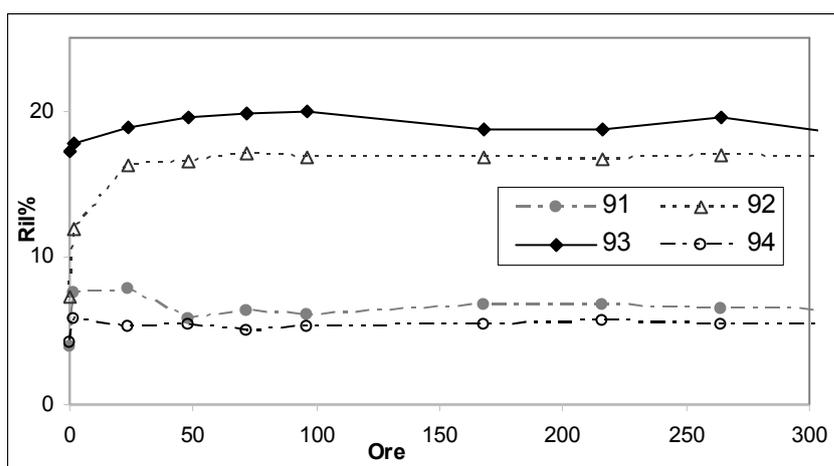
Il profilo di rilascio qui riportato mostra come il rilascio di IL-1Ra dalle microparticelle sia sostenuto per un tempo maggiore rispetto ai microsistemi ottenuti impiegando PLGA quale matrice insolubile e che la presenza di PEG nella formulazione prolunga il rilascio fino a 72 ore.

Tenuti in considerazione i dati ottenuti durante lo studio è stato quindi possibile definire le componenti polimeriche, i rapporti e le condizioni di processo che hanno dato i risultati migliori per la preparazione di microsfele caricate con IL-1Ra:

- PLGA Resomer RG503H oppure PLA all'80% p/p rispetto ai componenti totali
- PEG 5 kDa al 10% p/p rispetto ai componenti totali
- PLGA o PLA in soluzione al 2-4% nella fase organica da processare
- Velocità di feed dello spray di 5ml/min

3.3.3.6 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 91-92-93-94"

Combinando le condizioni di processo e le composizioni con migliore performance fin qui individuate, sono state preparate alcune formulazioni utilizzando PLGA Resomer RG503H o PLA 80% p/p, IL-1Ra 10% p/p e PEG 5 kDa 10% p/p o PEG al 5% p/p ed Epikuron 200SH (lecitina idrogenata) al 5% p/p. La cinetica di rilascio della citochina è stata studiata in tampone citrato pH 6.5 dopo il lavaggio delle microsfele in acqua al fine di rimuovere la citochina semplicemente adesa alla superficie. (Figura 50).



	LBH 91		LBH 92		LBH 93		LBH 94
DCM	8 ml	DCM	8 ml	DCM	8 ml	DCM	8 ml
PLGA	160 mg	PLA	160 mg	PLGA	160 mg	PLA	160 mg
				Epikuron	10 mg	Epikuron	10 mg
PEG	20 mg	PEG	20 mg	PEG	10 mg	PEG	10 mg
IL-1Ra	20 mg	IL-1Ra	20 mg	IL-1Ra	20 mg	IL-1Ra	20 mg

Figura 50 La figura in alto mostra il profilo di rilascio delle formulazioni ottenute processando materiali nei rapporti riportati nella tabella sottostante

La lecitina di soia, essendo un agente con proprietà anfifiliche, è stata introdotta in due formulazioni quale agente stabilizzante biocompatibile in grado di promuovere la dispersione dei sistemi particellari. Inoltre per la stessa ragione, dovrebbe creare canali nella matrice polimerica che favoriscano la diffusione della citochina verso l'esterno.

Le quattro formulazioni discusse sopra sono state studiate anche in liquido sinoviale umano per delineare il profilo di rilascio. Lo studio è stato condotto per tre settimane e i risultati sono riportati in Figura 51.

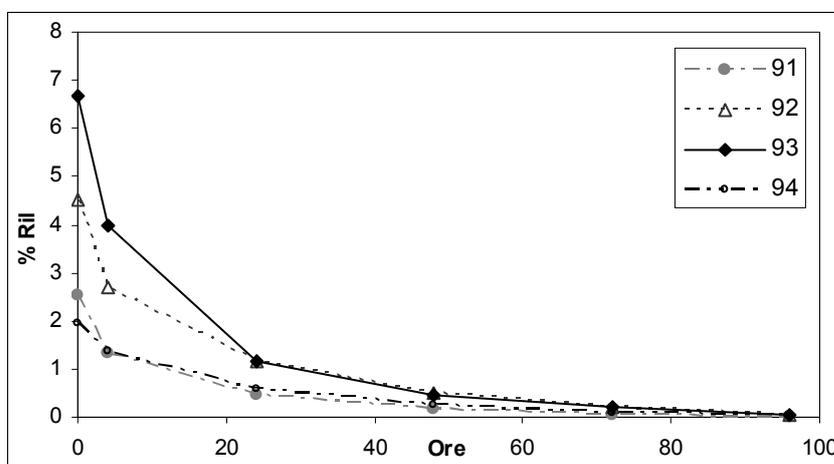


Figura 51 Profilo di rilascio delle formulazioni LBH 91-92-93-94 in liquido sinoviale umano.

Come si può osservare dalla figura, la concentrazione di IL-1Ra in liquido sinoviale diminuisce oltre il limite inferiore di rilevabilità dopo 90-100 ore; questo è causato dalla rapida degradazione della citochina stessa ad opera di enzimi proteolitici presenti nel liquido sinoviale. Considerato il profilo di rilascio, è plausibile che la velocità di degradazione del *biological* sia più elevata rispetto a quella di rilascio dalle microsfele, tenuto conto che il pool di liquido sinoviale fornito è comprensivo di liquidi provenienti da pazienti affetti da patologie infiammatorie del ginocchio con elevate attività enzimatiche accessorie.

3.3.3.7 Preparazione delle formulazioni denominate “LBH 95-96”

Sono state effettuate alcune preparazioni aumentando la percentuale di proteina fino al 25% in peso rispetto al totale della miscela processata in spray drying al fine di verificare se fosse possibile ottenere sistemi micro-particellari con loading di citochina più elevato. In tabella 8 è riportata la composizione delle miscele processate.

	LBH 95		LBH 96
DCM	8 ml	DCM	8 ml
PLGA	140 mg	PLA	140 mg
PEG 5kDa	10 mg	PEG 5kDa	10 mg
IL-1Ra	50 mg	IL-1Ra	50 mg

Tabella 8

Sono state ottenute microsfele dalle caratteristiche morfologiche e dimensionali simili alle precedenti formulazioni ma l'efficienza di intrappolamento è risultata essere solo del 10% circa rispetto alla citochina teoricamente caricata, e si è notato un conseguente effetto di rilascio iniziale di citochina non microincapsulata molto pronunciato. Le microparticelle risultano, così, avere una percentuale in peso di caricamento di IL-1Ra del 5% circa. Risulta così evidente che il caricamento effettivo delle microsfele si aggiri intorno al 5-6% a prescindere dalla percentuale in peso di citochina processata.

3.3.3.8 Preparazione delle formulazioni denominate “LBH 97-98-99”

Seguendo alcune metodiche riportate in letteratura sono stati prodotti sistemi particellari costituiti da una matrice lipidica di Tristearina in cui sono stati microincapsulati liofilizzati di HP- β -Ciclodestrine e IL-1Ra (rapporto 3:1 p/p). In alcune preparazioni sono stati usati eccipienti quali il PEG 5kDa o la lecitina deidrogenata (Epikuron 200SH). IL-1Ra è stata liofilizzata con HP- β -Ciclodestrine e il liofilizzato disperso in soluzioni di tristearina con o

senza PEG o Epikuron in diclorometano e processate mediante spray-drying. La tabella 9 riporta la composizione della varie formulazioni.

	LBH 97		LBH 98		LBH 99
DCM	4.5 ml	DCM	4 ml	DCM	4 ml
Tristearina	180 mg	Tristearina	160 mg	Tristearina	160 mg
		PEG	20 mg	Epikuron	20 mg
HP- β -CD	15 mg	HP- β -CD	15 mg	HP- β -CD	15 mg
IL-1Ra	5 mg	IL-1Ra	5 mg	IL-1Ra	5 mg

Tabella 9

Tutti i prototipi di microsfele ottenuti con questo metodo si sono rilevati non disperdibili in tampone fisiologico, probabilmente per l'elevata energia superficiale della matrice lipidica.

3.3.3.9 Preparazione delle formulazioni denominate "LBH 101-102"

Tenuti in considerazione i risultati ed i dati tecnologici acquisiti studiando gli ultimi prototipi riportati, si sono ridefiniti i componenti polimerici e gli eccipienti, i rapporti dei componenti e le condizioni di processo migliori per la preparazione di microsfele caricate con IL-1Ra:

- PLGA Resomer RG503H al 75% p/p rispetto ai componenti totali e al 4% p/v in DCM
- PEG 5 kDa al 10% p/p
- Epikuron 200SH al 5% p/p
- IL-1Ra al 10% p/p
- Velocità di feed dello spray di 5ml/min

La lecitina di soia è stata introdotta definitivamente nelle formulazioni in quanto è stato verificato ridurre l'aggregazione delle particelle e migliorare la siringabilità, garantendo quindi anche l'omogeneità di dose. La presenza di lecitina nella formulazione, inoltre, consente un miglioramento della resa di produzione (~75%) dovuto forse a un effetto lubrificante sulla superficie del ciclone di raccolta e l'ottenimento di microsfele di dimensioni leggermente inferiori (~7 μ m) rispetto a quelle prodotte senza il suo impiego e con una minore polidispersività.

E' stata studiata anche la possibilità di disperdere il liofilizzato IL-1Ra/PEG nella soluzione organica di PLGA mediante l'ausilio di un omogeneizzatore ad ultrasuoni per ottenere una sospensione più fine ed uniforme. La composizione delle formulazioni così ottenute è riportata in tabella 10.

	LBH 101-102
DCM	4 ml
PLGA Resomer RH503H	150 mg
Epikuron 200SH	10 mg
PEG 5kDa	20 mg
IL-1Ra	20 mg

Tabella 10

Si sono quindi confrontate due formulazioni, una (denominata LBH 101) ottenuta mediante dispersione del liofilizzato con turboemulsore e l'altra (denominata LBH 102) mediante omogeneizzatore ad ultrasuoni. Come si può notare dalla figura 52 riportante l'analisi dimensionale, l'utilizzo del sistema ad ultrasuoni permette di ottenere un prodotto di dimensioni inferiori ma soprattutto meno polidisperso.

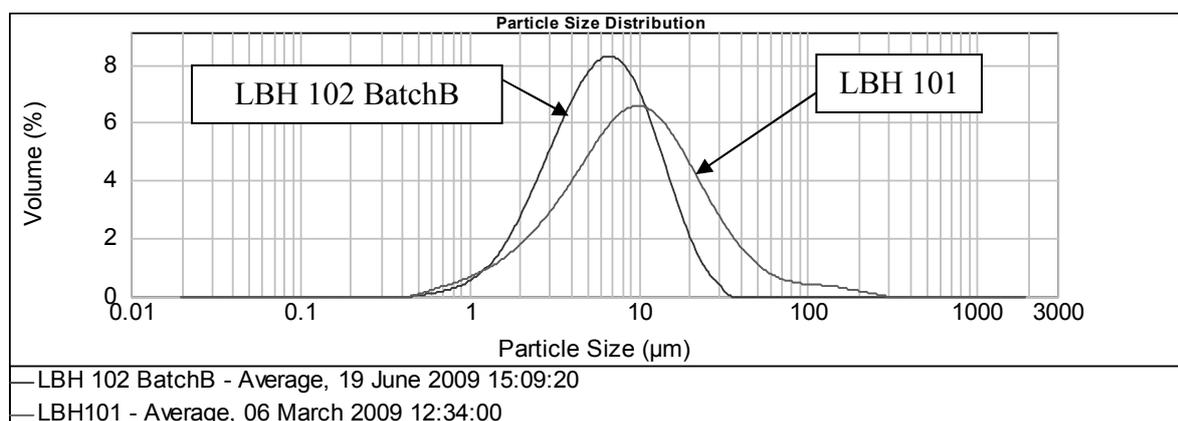


Figura 52 Analisi dimensionale di due formulazioni processate disperdendo il liofilizzato in DCM con turboemulsore o sonificatore.

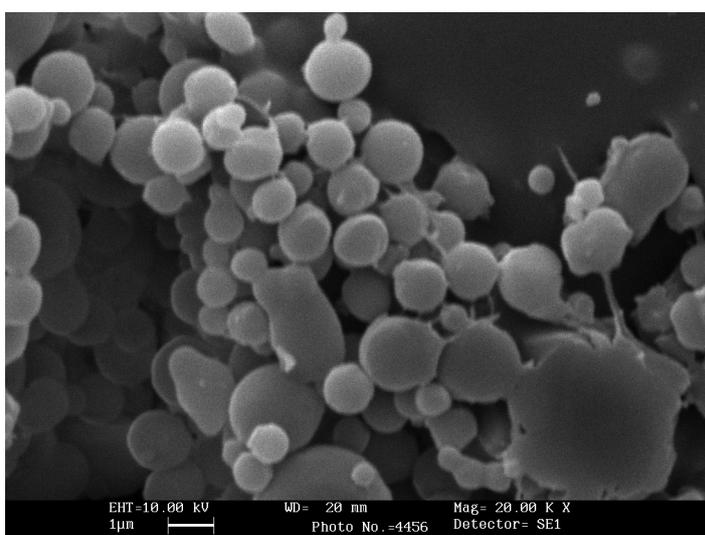


Figura 53 Analisi SEM della formulazione di particelle LBH 102 BatchB.

Negli studi di seguito riportati è stata impiegata, per le sue adeguate caratteristiche farmaceutiche quali la buona resa di processo, le caratteristiche morfologiche, la buona sospensibilità in tampone fisiologico, esclusivamente la formulazione LBH 102 ottenuta per dispersione con sonicazione. L'efficienza di intrappolamento della citochina è stata determinata monitorando il rilascio di IL-1Ra immediato dopo sospensione in tampone fisiologico ed è risultata essere pari al 50% rispetto alla citochina teorica inglobata.

3.3.4 STUDI DI FARMACOCINETICA DI IL-1Ra CARICATA NELLA FORMULAZIONE LBH 102

Sono stati eseguiti studi di farmacocinetica per una durata complessiva di 10 giorni ciascuno, somministrando la formulazione LBH 102 BatchB (PLGA Resomer RG503H 75%, PEG 5kDa 10%, IL-1Ra 10% e Epikuron 200SH 5%) per via intraperitoneale a topi ed è stata determinata la concentrazione plasmatica di IL-1Ra mediante test ELISA. Per confronto, è stato studiato il profilo farmacocinetico di Kineret somministrato attraverso la stessa via. Come si può osservare nella figura 54 la concentrazione plasmatica di IL-1Ra, in seguito a somministrazione i.p. di Kineret, raggiunge la C_{max} dopo 30 minuti e diminuisce rapidamente entro le 6 ore successive alla somministrazione. IL-1Ra non è praticamente più rilevabile dopo 24 ore. La concentrazione plasmatica di IL-1Ra, in seguito a somministrazione i.p. della formulazione LBH 102 BatchB, perdura per tempi anche superiori alle 48 ore e diminuisce con cinetica più lenta rispetto alla citochina somministrata in soluzione. Pur essendo minima la differenza di concentrazione plasmatica dopo 10 ore dalla somministrazione, è comunque una buona indicazione che un certo rilascio sostenuto viene garantito dalla formulazione particellare.

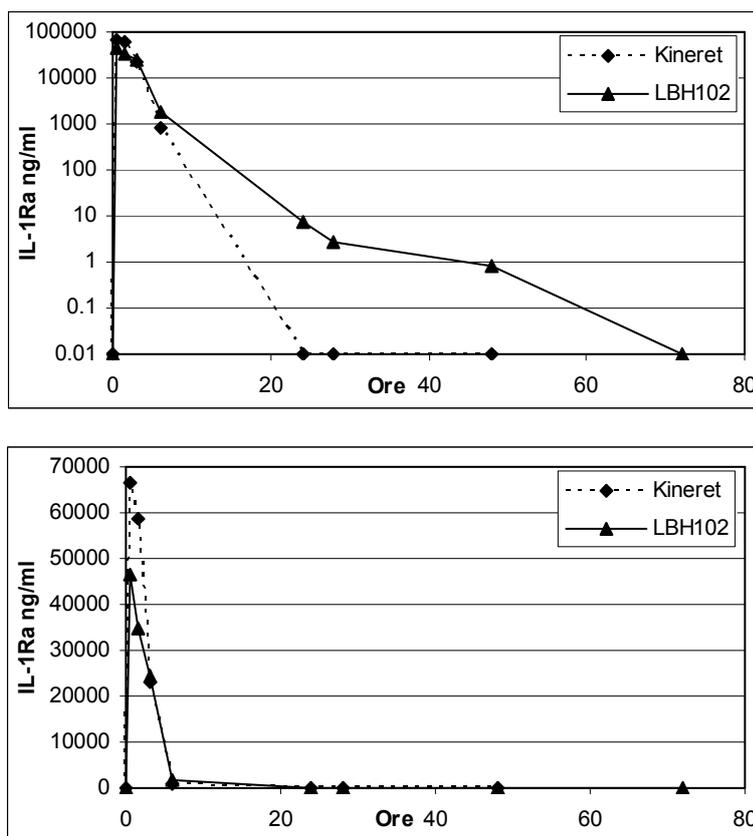


Figura 54 Profilo farmacocinetico di Kineret e della formulazione LBH 102 BatchB dopo somministrazione intraperitoneale a topo (in scala logaritmica e decimale).

Dal profilo farmacocinetico è stato possibile calcolare i parametri di AUC, Cmax e Tmax per le due formulazioni come riportato in tabella 11.

	LBH 102 Batch B	Kineret
Cmax (ng/ml)	46412.50325	66405.54
Tmax (h)	0.5	0.5
AUC (ng)	153066.558	183639.7

Tabella 11

Come si può notare, a margine di un Tmax che risulta uguale per le due formulazioni, la preparazione costituita da particelle ha una Cmax e un AUC inferiore rispetto al Kineret, ma sempre nello stesso ordine di grandezza, a testimoniare che la formulazione microparticellare garantisce un'insorgenza ematica meno brusca ma più prolungata rispetto al farmaco di riferimento confermando buone prospettive per il suo utilizzo come formulazione alternativa.

3.3.5 STUDI DI EFFICACIA TERAPEUTICA DELLA FORMULAZIONE LBH 102 MEDIANTE MODELLO DI ARTRITE SPERIMENTALE

Lo stesso prototipo formulativo (LBH 102 BatchB) è stato impiegato per effettuare uno studio di efficacia terapeutica in vivo su modello animale di artrite sperimentale indotta da collagene (denominata CIA).

Il primo studio effettuato ha coinvolto 8 gruppi randomizzati di topi, tra i quali, un gruppo di controllo sano (al quale non è stata indotta l’artrite sperimentale e a cui non è stato iniettato alcun preparato), un gruppo di animali a cui sono state iniettate microsfele di solo veicolo prive di IL-1Ra, quattro gruppi trattati con microsfele caricate con IL-1Ra e due gruppi trattati con la formulazione commerciale Kineret. In tabella 12 è riportato il trattamento somministrato a ciascun gruppo, la quantità di particelle, la dose di citochina e la frequenza di somministrazione. Nella tabella 12, la numerazione dei giorni fa riferimento al giorno 0 in cui i topi hanno ricevuto l’induzione con collagene.

Giorno →	20	21	22	23	24	25	Dose IL-1Ra (mg)
Sani							0
Veicolo (microsfere vuote) 40 mg i.p.	x		x	x	x	x	0
Kineret 2 mg i.p.	x	x	x	x	x	x	2
Kineret 2 mg i.p.	x		x				2
Microsfere 102 LD 20 mg i.p.	x		x				1
Microsfere 102 MD 40 mg i.p.	x		x				2
Microsfere 102 HD 80 mg i.p.	x		x				4
Microsfere 102 MD 40 mg i.p.	x		x		x		2

Tabella 12 Schema di trattamento dei gruppi di animali randomizzati

La figura 55 riporta il profilo di “paw score” dall’induzione dell’artrite sperimentale (giorno 0).

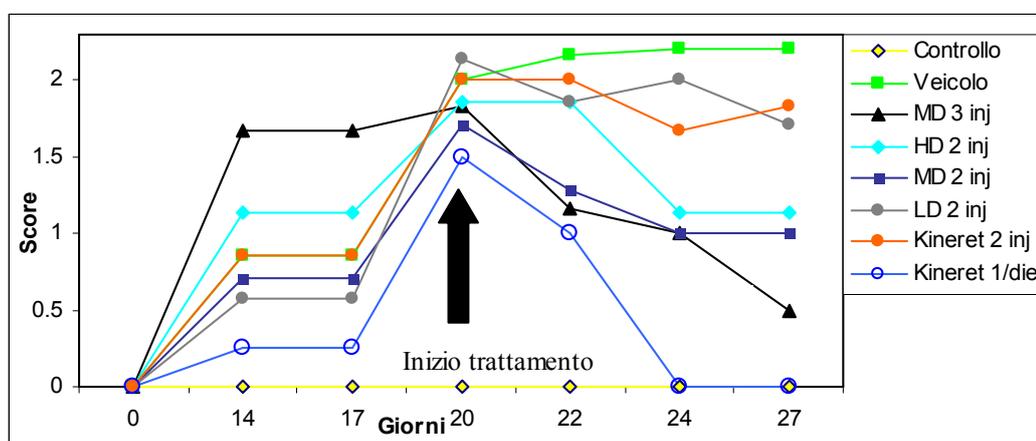


Figura 55 Profilo di “paw score” dall’induzione dell’artrite sperimentale in topo.

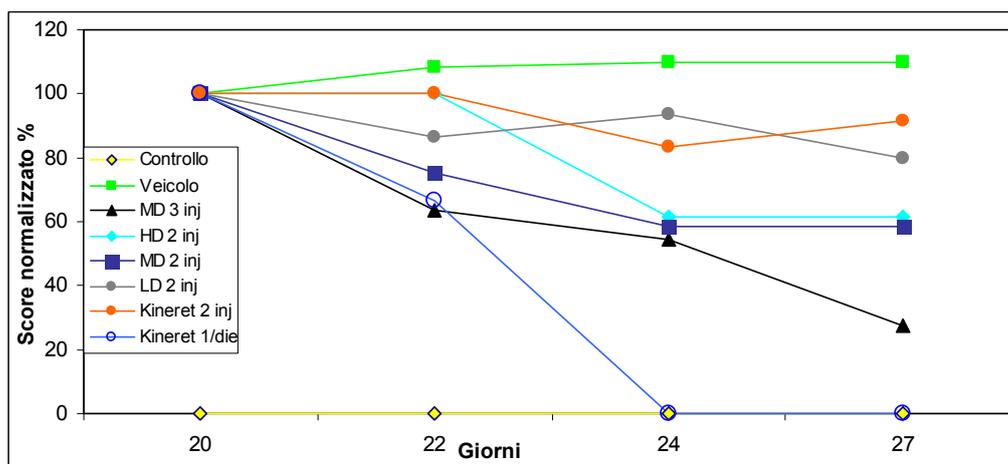


Figura 56 Profilo di “paw score” normalizzato dall’inizio del trattamento.

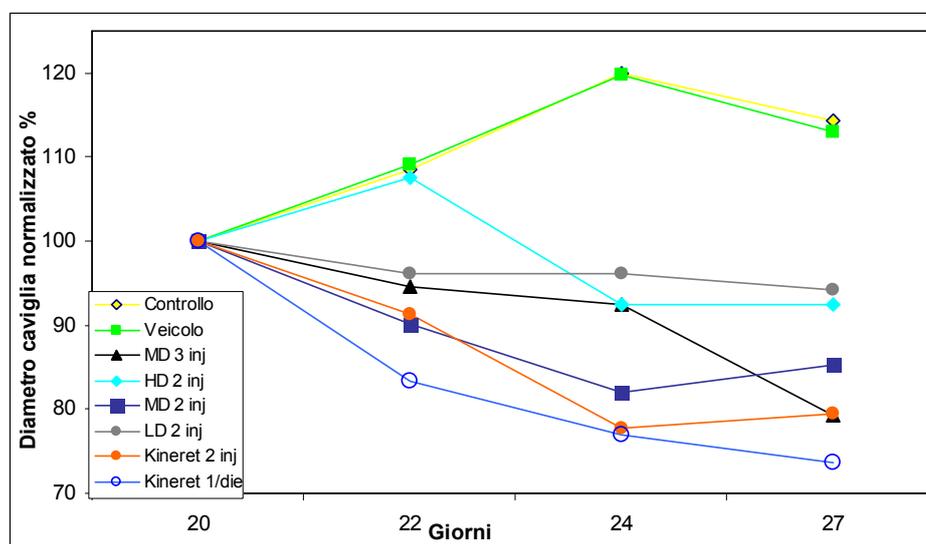


Figura 57 Variazione in percentuale del diametro della caviglia a partire dal giorno di inizio trattamento.

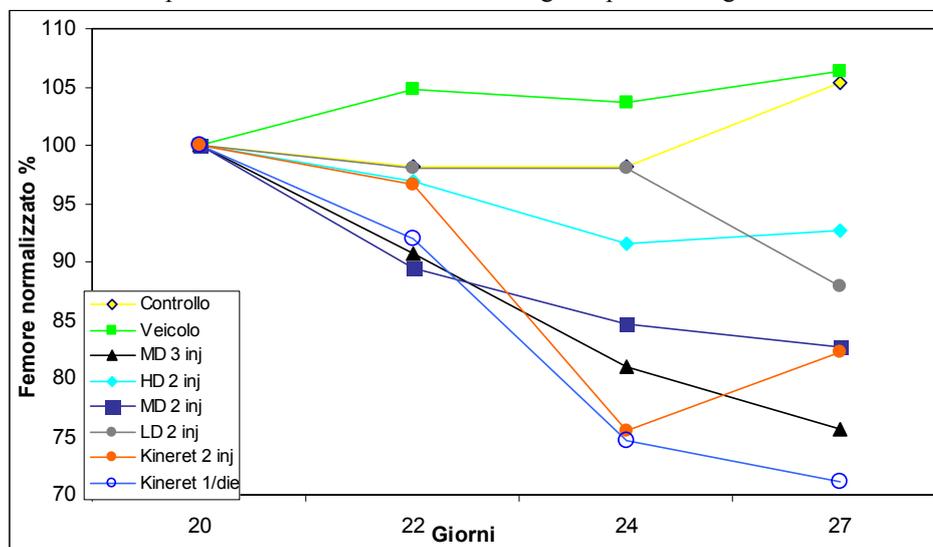


Figura 58 Variazione in percentuale della tumefazione del femore a partire dal giorno di inizio trattamento.

Un valore elevato di paw score indica uno stato generale negativo. Tutti i gruppi, tranne quelli in cui non è stata indotta l'artrite, hanno avuto un significativo aumento del valore di score fino al giorno di somministrazione del trattamento (giorno 20).

Dai dati raccolti sono state tratte alcune informazioni:

- il gruppo di animali trattati con le microsfele prive di IL-1Ra non hanno mostrato un miglioramento delle condizioni patologiche;
- il gruppo di animali trattati ogni giorno con Kineret (2 mg IL-1Ra/topo) hanno mostrato una diminuzione sensibile dei fenomeni infiammatori a carico delle articolazioni;
- la somministrazione effettuata al giorno 20 e 22 del dosaggio più basso di IL-1Ra in microsfele (1 mg IL-1Ra/topo) e di Kineret (2 mg IL-1Ra/topo) hanno dimostrato entrambi una scarsa efficacia;
- il gruppo di animali trattati al giorno 20 e 22 con un dosaggio più alto di IL-1Ra in microsfele (4 mg IL-1Ra/topo) mostra una diminuzione dello score rispetto al gruppo trattato con il dosaggio minore anche se non vi è un miglioramento marcato delle condizioni complessive rispetto al gruppo trattato quotidianamente con Kineret;
- il gruppo di animali trattati al giorno 20 e 22 con una dose intermedia di IL-1Ra in microsfele (2 mg IL-1Ra/topo) mostra una diminuzione significativa e più evidente dei fenomeni infiammatori rispetto che nei gruppi a più alto e più basso dosaggio. L'efficacia terapeutica è però ancor più evidente nel gruppo di animali trattati con lo stesso dosaggio con 3 somministrazioni successive ai giorni 20, 22 e 24.

Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio è possibile concludere che, rispetto al Kineret commerciale, la formulazione microparticellare consente di ridurre la frequenza di somministrazione garantendo un'efficacia terapeutica prolungata. I dati acquisiti sull'aumento della durata terapeutica sono comunque riferiti al topo che ha un metabolismo molto più veloce dell'uomo. Si è inoltre notato che l'effetto terapeutico è la risultante anche della dose e della frequenza delle somministrazioni. La somministrazione a giorni alterni di 2 mg/topo di IL-1Ra formulati in particelle, ha dato il miglior risultato sulla base del paw score.

Va anche detto che lo studio di efficacia è stato eseguito per somministrazione intraperitoneale, via di somministrazione in cui l'effetto è visibile in seguito a biodistribuzione della citochina, cosa che ha una propria cinetica e che viene minimizzata dalla biodegradazione. Il progetto prevede invece una somministrazione locale nel ginocchio, in cui l'effetto sarà sicuramente esaltato poichè entrambe le componenti citate

(biodistribuzione e biodegradazione) non saranno così influenti come nel caso della somministrazione intraperitoneale.

3.3.6 STUDIO DI MIGLIORAMENTO DELLA RISOSPENDIBILITÀ DELLA FORMULAZIONE MICROPARTICELLE LBH 102

Si è tentata una strategia che permettesse di ridisperdere le microparticelle senza l'utilizzo di sonicatori o vortexing, operazioni non realizzabili dal personale medico in vista di una applicazione clinica. A partire dalla letteratura in merito, 1 grammo di particelle è stato sospeso in 20 mL di soluzione acquosa di mannitolo 7.5 mg/mL, congelato immediatamente e liofilizzato.

Sono stati quindi compiuti studi di analisi dimensionale delle particelle della formulazione LBH 102 BatchE disperse in tampone mediante sonicazione e delle particelle liofilizzate con mannitolo e ridisperse in tampone manualmente o mediante sonicazione (Figura 59).

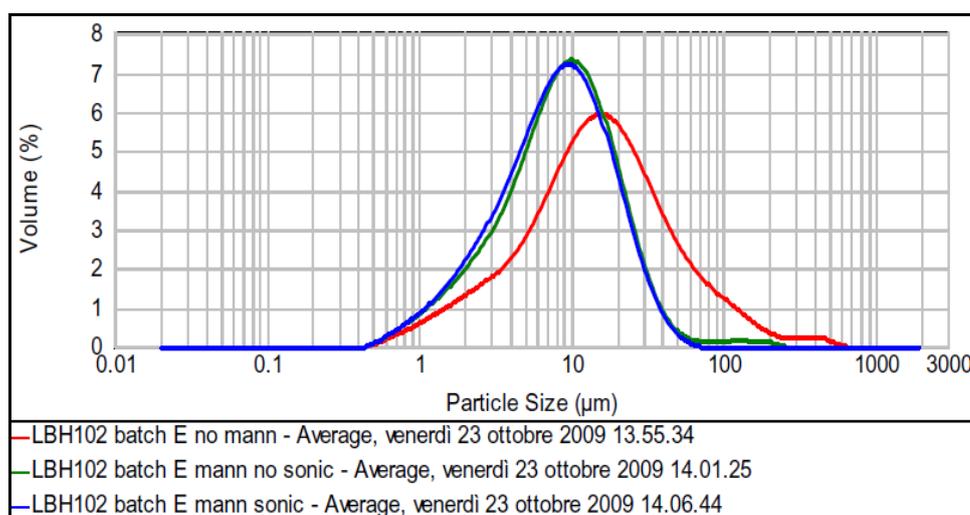


Figura 59 Analisi dimensionale delle particelle denominate LBH 102 BatchE ridisperse con varie metodiche.

Come viene evidenziato dalla figura, le particelle della formulazione LBH 102 BatchE (prive di mannitolo) in seguito a dispersione e sonicazione hanno una dimensione di circa 15 µm e sono moderatamente polidisperse. Al contrario, la formulazione di particelle liofilizzate con mannitolo sono auto-disperdenti e mostrano dimensioni minori (10 µm). Questo dato è anche prova che le particelle prive di mannitolo, una volta ridisperse in acqua, si aggregano debolmente. Inoltre le particelle trattate con mannitolo mostrano una dispersione dimensionale che non è assolutamente alterata dalla sonicazione (curve azzurra e verde rispettivamente).

Ciò dimostra che la presenza di mannitolo aggiunto nella fase post produttiva garantisce una facile ridispersione delle particelle anche senza l'apporto di energia esterna (vortexing e sonicazione). Questo dato conferma che le proprietà tecnologiche delle particelle sono assolutamente compatibili per un adeguato uso clinico.

3.3.7 STUDIO DI FORMULAZIONE DEL VEICOLO IN CUI RIDISPERDERE LE MICROSFERE LBH 102

E' stato previsto che le particelle formulate con mannitolo venissero risospese in una soluzione di Hyalectin prima di essere somministrate. Alcune prove hanno evidenziato come le particelle si risospendano agevolmente, fino a 100 mg/ml, in una soluzione tamponata di Hyalectin allo 0.75% p/v. Hyalectin, oltre ad avere un effetto benefico e già di per sè terapeutico sull'articolazione colpita da processi infiammatori, impartisce al mezzo una certa viscosità che rallenta i processi di aggregazione e sedimentazione della formulazione nei pochi minuti che intercorrono tra la ridispersione delle particelle e la somministrazione da parte del personale medico, e poi successivamente a livello intra-articolare. Inoltre la viscosità impartita da Hyalectin alla formulazione rallenterà la biodistribuzione di IL-1Ra al di fuori dell'articolazione a vantaggio dell'effetto terapeutico locale per il quale la formulazione è stata realizzata.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo lavoro mostrano come, mediante lo studio di particolari tecniche formulative, sia possibile ottenere dei prodotti tecnologicamente avanzati, adatti alla veicolazione di farmaci biotecnologici.

L'intrappolamento di IL-1Ra in sistemi a rilascio prolungato, oggetto di questo progetto di dottorato, ha portato all'ottenimento di formulazioni microparticellari adatte alla somministrazione intraarticolare nel trattamento delle patologie reumatiche.

Sono state ottenute tipologie differenti di formulazioni utilizzando diversi tipi di polimeri biocompatibili, diversi rapporti tra i componenti, diverse concentrazioni di polimero e differenti procedure di preparazione.

La tecnica che ha portato ai risultati migliori, dal punto di vista formulativo, è risultata essere quella di sospensione e spray drying; ha permesso, infatti, di ottenere microparticelle morfologicamente omogenee, poco polidisperse dal punto di vista dimensionale e, date le dimensioni ridotte (2-15 μm), adatte alla somministrazione intraarticolare.

L'utilizzo di una particolare combinazione di eccipienti (acido poli-lattico-co-glicolico, polietilenglicole e fosfatidilcolina) ha, inoltre, consentito di ottenere un'elevata efficienza di caricamento del farmaco (50-70%), una buona resa produttiva (70%), un'elevata biocompatibilità ed un accettabile rilascio in vitro.

Gli studi farmacocinetici effettuati hanno permesso di evidenziare che la formulazione micro particellare di IL-1Ra permette una permanenza del farmaco a livello plasmatico più lunga rispetto alla formulazione commerciale in soluzione.

L'utilizzo del modello animale di artrite sperimentale ha permesso di valutare l'efficacia terapeutica delle microsfe: la somministrazione di microsfe caricate con IL-1Ra consente di ridurre la frequenza di trattamento ottenendo risultati confrontabili ad una iniezione giornaliera di Kineret.

Studi, tuttora in corso, evidenziano l'assenza di tossicità delle microsfe polimeriche somministrate a livello articolare in conigli; in un prossimo futuro verranno portati a termine uno studio di farmacocinetica in coniglio ed una valutazione dell'efficacia in un modello animale di artrosi indotta da taglio del legamento.

Concludendo, lo sviluppo e l'ottimizzazione di un metodo di produzione di microsfele polimeriche per sospensione e spray drying ha permesso di ottenere una piattaforma di drug delivery utilizzabile per il rilascio prolungato a livello intraarticolare di diversi farmaci biotecnologici come anticorpi monoclonali, citochine antiinfiammatorie e proteine di fusione.

BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med.* 2005 May 2;201(9):1355-9.
- ² Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095–147.
- ³ P. Eisenberg, J. Evans, P. Arend, E. Verderber, MT Brewer, H. Hannum, C. Thompson. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 1990; 343: 341-346.
- ⁴ C.A. Dinarello. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu. Rev. Immunol.* 2009. 27:519–50.
- ⁵ Firestein GS, Boyle DL, Yu C, Paine MM, Whisenand TD, Zvaifler NJ, et al. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 644-52.
- ⁶ Greenfeder SA, et al. Insertion of a structural domain of interleukin (IL)-1 β confers agonist activity to the IL-1 receptor antagonist. *J Biol Chem* 1995; 270:22460–22466.
- ⁷ Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2001; 14: 397-440.
- ⁸ Arend WP, Guthridge CJ. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis* (2000) 59(suppl 1):60–64.
- ⁹ Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87:2095-147.
- ¹⁰ Rivier C, Rivest S. Mechanisms mediating the effects of cytokines on neuroendocrine functions in the rat. *Ciba Found Symp* 1993;172:204.
- ¹¹ Furmanski P, Johnson CS. Macrophage control of normal and leukemic erythropoiesis. Identification of the macrophage derived erythroid suppressing activity as interleukin-1 and the mediator of its effect as tumor necrosis factor. *Blood* 1990;75:2328.
- ¹² Arend WP. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: The role of interleukin-1 receptor antagonist, *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 2001; 30: 5, 1-6.
- ¹³ Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist: a new member of the interleukin 1 family. *J Clin Invest* 1991; 88: 1445-51.

-
- ¹⁴ Dinarello CA. The role of interleukin-1 receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 2000; 242: 732-4.
- ¹⁵ Cutolo M, Bresnihan B, Dayer JM. IL-1Ra as a new biological approach for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 29.
- ¹⁶ Arend WP, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995;38:151-160.
- ¹⁷ Straub R, Cutolo M. Impact of the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axes and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: a systemic pathogenic view point. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 493-507.
- ¹⁸ Cutolo M, Straub RH, Masi AT, Bijlsma JWJ, Lahita R, Bradlow HL. Altered Neuroendocrine Immune (NEI) Networks in Rheumatology. *Ann NY Acad Sci* 2002; 966: XIII.
- ¹⁹ Cutolo M. Macrophages as effectors of the immunoendocrinologic interactions in autoimmune rheumatic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 876: 32-43.
- ²⁰ Mottonen T, Hannonen P, Leirisalo-Repo M, Nissila M, Kautiainen H, Korpela M, et al. Comparison of combination therapy with single-drug therapy in early early rheumatoid arthritis: a randomised trial. FIN-RACo trial group. *Lancet* 1999; 353: 1568-73.
- ²¹ Cutolo M, Bisso A, Sulli A, Felli L, Briata M, Pizzorni C, et al. Antiproliferative and antiinflammatory effects of methotrexate on cultured differentiating myeloid monocytic cells (THP-1) but not on synovial macrophages from rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol* 2000; 27: 2551-7.
- ²² Cutolo M, Straub RH. Antiinflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 729-35.
- ²³ Breedveld FC, Dayer JM. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000; 59: 841-9.
- ²⁴ Dinarello CA. Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-147.
- ²⁵ Clifton O, Bingham III. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol* 2002; 29: 3-9.
- ²⁶ Arend WP. Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 2001; 14: 397-440.
- ²⁷ Dinarello CA. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 1-20.

-
- ²⁸ Goldring SR. Bone and Joint destruction in rheumatoid arthritis: What is really happening? *J Rheumatol* 2002; 29: 44-8.
- ²⁹ Cauli A, Yanni G, Panayi GS. Interleukin-1, Interleukin-1 receptor antagonist and macrophage populations in rheumatoid arthritis synovial membrane. *Br J Rheumatol* 1997; 36: 935-40.
- ³⁰ Bresnihan B. Anakinra as a new therapeutic option in rheumatoid arthritis. Clinical results and perspectives. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: 32-4.
- ³¹ American College of Rheumatology Subcommittee on Osteoarthritis Guidelines. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. *Arthritis Rheum* 2000;43:1905–15.
- ³² Schnitzer TJ and the American College of Rheumatology. Update of ACR guidelines for osteoarthritis: role of coxibs. *J Pain Symptom Manage* 2002;23:S24–30.
- ³³ Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JW, Dieppe P, et al. EULAR recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis. Report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1145–55.
- ³⁴ Zhang W, Doherty M, Arden N, Bannwarth B, Bijlsma J, Gunther KP, et al. EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis* 2005;64:669–81.
- ³⁵ Cicuttini FM, Jones G, Forbes A, Wluka AE. Rate of cartilage loss at two years predicts subsequent total knee arthroscopy: a prospective study. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1124–7.
- ³⁶ Wluka AE, Ding C, Jones G, Cicuttini FM. The clinical correlates of articular cartilage defects in symptomatic knee osteoarthritis: a prospective study. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44:1311–6.
- ³⁷ Davies-Tuck ML, Wluka AE, Wang Y, Teichtahl AJ, Jones G, Ding C, et al. The natural history of cartilage defects in people with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16: 337–42.
- ³⁸ Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33: 305–15.
- ³⁹ Shingu M, Nagai Y, Isayama T, Naono T, Nobunaga M, Nagai Y. The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes

and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 1993;94:145–9.

⁴⁰ Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JR Jr. Evidence for metalloprotease and metalloprotease inhibitors imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989;84:678–85.

⁴¹ Seckinger P, Klein-Nulend J, Alander C, Thompson RC, Dayer JM, Raisz LG. Natural and recombinant human IL-1 receptor antagonists block the effects of IL-1 on bone resorption and prostaglandin production. *J Immunol* 1990;145:4181–4.

⁴² Jiang Y, Genant HK, Watt I, Cobby M, Bresnihan B, Aitchison R, et al. A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis: radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores. *Arthritis Rheum* 2000;43:1001–9.

⁴³ Caron JP, Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Tardif G, Mineau F, Geng C, et al. Chondroprotective effect of intraarticular injections of interleukin-1 receptor antagonist in experimental osteoarthritis: suppression of collagenase-1 expression. *Arthritis Rheum* 1996;39:1535–44.

⁴⁴ Pelletier JP, Caron JP, Evans C, Robbins PD, Georgescu HI, Jovanovic D, et al. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis Rheum* 1997;40:1012–9.

⁴⁵ Fernandes J, Tardif G, Martel-Pelletier J, Lascau-Coman V, Dupuis M, Moldovan F, et al. In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints: prevention of osteoarthritis progression. *Am J Pathol* 1999; 154:1159–69.

⁴⁶ Chevalier X, Giraudeau B, Conrozier T, Marliere J, Kiefer P, Goupille P. Safety study of intraarticular injection of interleukin 1 receptor antagonist in patients with painful knee osteoarthritis: a multicenter study. *J Rheumatol* 2005;32: 1317–23.

⁴⁷ Chevalier et al. *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Res.)*. 2009;61,3: 344–352.

⁴⁸ Granowitz EV, Porat R, Mier JW, et al. Pharmacokinetics, safety, and immunomodulatory effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in healthy humans. *Cytokine* 1992;4:353–60.

⁴⁹ Otani K, Nita I, Macaulay W, et al. Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by ex vivo gene therapy. *J Immunol* 1996;156:3558.

⁵⁰ Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:8698.

-
- ⁵¹ Alten R, Gram H, Joosten LA, et al. The human anti-IL-1 beta monoclonal antibody ACZ885 is effective in joint inflammation models in mice and in a proof-of-concept study in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10:67.
- ⁵² Church LD, McDermott MF. Canakinumab, a fully-human mAb against IL-1beta for the potential treatment of inflammatory disorders. *Curr Opin Mol Ther* 2009;11:81–9.
- ⁵³ Church LD, McDermott MF. Rilonacept in cryopyrin-associated periodic syndromes: the beginning of longer-acting interleukin-1 antagonism. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2009;5:14–5.
- ⁵⁴ Ratner M. IL-1 trap go-ahead. *Nat Biotechnol* 2008;26:485.
- ⁵⁵ Borgia JA, Fields GB. Chemical synthesis of proteins. *Trends Biotechnol.* 2000; **18**, 243-251.
- ⁵⁶ Molowa DT, Mazanet R. The state of biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2003; **9**: 285-302.
- ⁵⁷ Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature.* 1998; **392**: 5-10.
- ⁵⁸ Cleland JL, Daugherty A, Mersny R. Emerging protein delivery methods. *Curr Opinion Biotechnol.* 2001; **12**, 212-219.
- ⁵⁹ Orive G, Hernández RM, Gascón RA, Domínguez-Gil A, Pedraz LJ. Drug delivery in biotechnology: present and future. *Curr. Opinion Biotechnol.* 2003; **14**, 659-664.
- ⁶⁰ McNall EJ. Protein Formulation and Delivery. *Marcel Dekker, McNall EJ Eds., New York*, 2000.
- ⁶¹ Salmaso S, Bersani S, Semenzato A, Caliceti P. Nanotechnologies in protein delivery. *J Nanosci Nanotechnol.* 2006; **6**: 2736-2753.
- ⁶² Yang L, Alexandridis P. Physicochemical aspects of drug. delivery and release from polymer-based colloids. *Curr Opin Coll Interf Sci.* 2000; **5**, 132-143.
- ⁶³ Spangler RS. Insulin administration via liposomes. *Diabetes Care.* 1990; **13**: 911-922.
- ⁶⁴ Soula O, Meyrueix R, Chan YP, Grangeon C, Kravtsoff R, Soula G. Sustained release of IL-2 from MEDUSA® comb-like hydrophobically modified polyglutammate. *Contr Rel Soc. 30th Annual Meeting*, 2003; 688.
- ⁶⁵ Meyrueix R, Lacomte JP, Soula O, Pouliquen G, Chan YP, Nicolas F, Kravtsoff P, Soula G. Sustained release of interferon alpha 2b from MEDUSA® nanoparticles of comb-like hydrophobically modified polyglutammate. *Contr Rel Soc. 30th Annual Meeting*, 2003;690.
- ⁶⁶ Salmaso S, Schrepfer R, Cavallaro G, Bersani S, Caboi F, Giammona G, Tonon G, Caliceti P. Supramolecular association of recombinant human growth hormone with hydrophobized polyhydroxyethylaspartamides. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007.

-
- ⁶⁷ Duncan R, Spreafico F. Polymer conjugates: pharmacokinetic considerations for design and development. *Clin. Pharmacokinet.* 1994; **27**: 290-306.
- ⁶⁸ Thordarson P, Le Droumaguet B, Velonia K. Well-defined protein–polymer conjugates synthesis and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; **73**: 243-254.
- ⁶⁹ Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release.* 2003; **90**: 261–280.
- ⁷⁰ Almeida AJ, Souto E. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv Drug Del Rev.* 2007; **6**: 478-490.
- ⁷¹ P.B. O'Donnell and J.W. McGinity, Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28 (1997), pp. 25–42.
- ⁷² C. Wischke and S.P. Schwendeman. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles, *Int. J. Pharm.* 364 (2008), pp. 298–327.
- ⁷³ Wang, H. T., Schmitt, E., Flanagan, D. R. and Linhardt, R. J.. Influence of formulation methods on the in vitro controlled release of protein from poly (ester) microspheres. *J.Control. Release* 17 (1991): 23-32.
- ⁷⁴ Rochira M., Miglietta M.R., Richardson J.L., Ferrari L., Beccaro M., Benedetti L. Novel vaginal delivery systems for calcitonin. II. Preparation and characterization of HYAFF® microspheres containing calcitonin. *Int. J. Pharm.*, 144 (1) (1996), pp. 19-26.