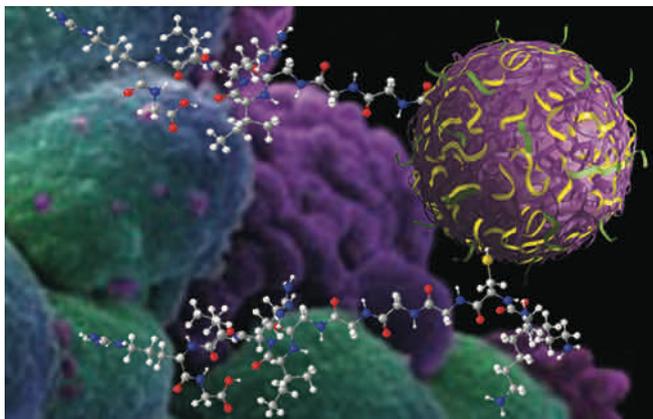


BIOCONIUGATI PER IL *DELIVERY* ATTIVO DI FARMACI

Il risultato della ricerca nell'ambito del *drug delivery* ha portato allo sviluppo di numerose formulazioni colloidali capaci di ottimizzare la veicolazione di farmaci facilmente degradabili o poco solubili e farmaci che per la loro limitata capacità di superare le barriere biologiche non sono in grado di raggiungere inalterati il sito d'azione. Più recentemente, una nuova classe di sistemi colloidali per il *drug delivery* sono stati progettati per il direccionamento attivo di farmaci. Tali sistemi sono in grado di riconoscere specifici bersagli cellulari e subcellulari ed accumularsi nel distretto d'azione dove il farmaco viene liberato.



I progressi della ricerca scientifica nel settore delle nanotecnologie hanno portato negli ultimi cinquant'anni ad un rapido sviluppo di sistemi terapeutici innovativi che da un lato consentono di ottimizzare l'impiego e la performance di farmaci e dall'altro di aprire nuove prospettive al trattamento di patologie fino ad oggi difficilmente curabili.

Attraverso la combinazione fisica o chimica di materiali con peculiari caratteristiche chimico-fisiche, biologiche e biofarmaceutiche sono stati sviluppati vari sistemi terapeutici colloidali più o meno complessi e sofisticati quali, ad esempio, sistemi polimerici solubili, liposomi, micelle e nanoparticelle lipidiche, polimeriche o inorganiche. Tali sistemi permettono di superare problemi di utilizzo di farmaci che presentano inadeguate caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche, migliorandone così il profilo terapeutico. I sistemi colloidali complessi e multifunzionali permettono infatti di ottimizzarne e personalizzare la somministrazione di farmaci in termini di dosaggio e regime di impiego, fungere da trasportatori (*carrier*) di numerose molecole di farmaco (*cargo*), sommi-

nistrare contemporaneamente farmaci diversi (*combination therapy*), somministrare farmaci poco solubili e poco stabili, superare barriere biologiche epiteliali ed endoteliali e mantenere livelli terapeutici prolungati. Inoltre, per la loro natura nanometrica, questi sistemi possono localizzarsi in alcuni tessuti particolarmente permeabili, come ad esempio i tessuti infiammati o tumorali, questi ultimi caratterizzati da un'elevata ma incompleta vascolarizzazione e da un basso drenaggio linfatico. Pertanto, tali sistemi possono accumularsi preferenzialmente in tumori solidi attraverso un processo di direccionamento definito "passivo" noto come effetto di Enhanced Permeation and Retention (EPR).

Doxil è una formulazione di liposomi PEGilati contenenti doxorubicina approvata da FDA nel 1995 per il trattamento della sindrome di Kaposy correlata all'Aids. Sebbene l'idea originaria fosse quella di avere un maggiore accumulo di doxorubicina nel tessuto tumorale attraverso l'effetto EPR, il maggiore vantaggio di questa formulazione è il migliorato profilo farmacocinetico del farmaco, con una significativa riduzione della cardiotoxicità.

Abraxane è una formulazione costituita da paclitaxel adsorbito su nanoparticelle di albumina approvata da FDA nel 2005. Per questo prodotto è stata riportata la selettività per tumori solidi attraverso un processo di accumulo multi-step. L'albumina è infatti in grado di riconoscere il recettore GP60 espresso sulle membrane delle cellule endoteliali che ne promuove la transitosi e l'accumulo nella massa tumorale attraverso il processo che coinvolge la Caveolina 1. Successivamente il sistema viene internalizzato nella cellula tumorale grazie al riconoscimento del sistema SPARC espresso sulla superficie cellulare.

Tuttavia, nonostante l'Abraxane presenti un meccanismo di veicolazione di farmaco attivo e direccionato, questa formulazione consente sostanzialmente di superare i problemi formulativi di paclitaxel, molecola poco solubile, evitando l'impiego di Cremofor EL, un eccipiente fortemente sensibilizzante. Si ritiene infatti che le molecole di paclitaxel adsorbi-

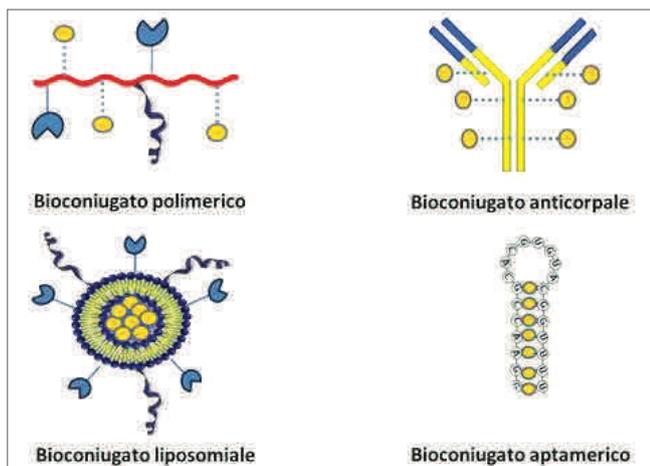


Fig. 1 - Principali sistemi colloidali bioconiugati per il drug delivery attivo

te sulla proteina vengano rilasciate nel circolo sanguigno subito dopo somministrazione.

L'inserimento di agenti direzionanti nelle strutture colloidali attraverso tecniche di bioconiugazione chimica e fisica permette di ottenere prodotti ibridi multifunzionali con peculiari caratteristiche biofarmaceutiche di sito-specificità che consentono la veicolazione e il rilascio di farmaci in modo spazialmente e temporalmente controllato nei distretti target. In Fig. 1 sono riportati alcuni esempi di bioconiugati colloidali per il delivery attivo di farmaci.

L'efficacia di questi sistemi dipende da numerose variabili correlate sia alla natura chimico-fisica del bioconiugato che all'espressione delle funzioni bersaglio (*target* o *biomarker*) a livello cellulare o subcellulare. Per quanto riguarda l'espressione cellulare delle funzioni bersaglio, al fine di ottenere un'elevata selettività ed efficienza di direzionamento è necessaria un'espressione cellulo-specifica del *biomarker* con bassa eterogeneità e con un'elevata densità di espressione. La mancanza di questi requisiti rende il bioconiugato inefficace in termini di selettività, mentre possono prevalere meccanismi di direzionamento passivo. Nel caso di immuno-liposomi direzionati a cellule metastatiche del tumore al seno ERBB2 positive, ad esempio, è stato dimostrato che è necessaria una densità recettoriale di 10^5 ERBB2 per avere un reale vantaggio rispetto ai liposomi non direzionati.

I principali ambiti di applicazione di bioconiugati per il direzionamento attivo sono il sistema nervoso centrale (*brain delivery*) e i tessuti tumorali. Il sistema nervoso centrale è un organo difficilmente penetrabile soprattutto nel caso di macromolecole biotech, quali oligonucleotidi e proteine, mentre nel caso delle cellule tumorali il basso indice terapeutico che caratterizza molti farmaci antitumorali rende particolarmente interessante il poter accumulare selettivamente i farmaci in questi tessuti.

Agenti direzionanti

Nel corso degli anni sono stati utilizzati numerosi agenti direzionati, come ad esempio anticorpi, frammenti anticorpali, altre proteine e peptidi, oligonucleotidi come gli aptameri, oligosaccaridi e zuccheri semplici, e piccole molecole organiche sintetiche e naturali come metaboliti e vitamine. In Tab. 1 sono riportati solo alcuni esempi dei molti agenti direzionanti utilizzati nella preparazione di bioconiugati per il *drug delivery* attivo.

Gli anticorpi monoclonali rappresentano una delle prime e più importanti classi di agenti direzionanti, costituita da anticorpi interi e loro frammenti. Gli anticorpi interi sono più utilizzati nella preparazione di immunoconiugati definiti come *antibody drug conjugates* (ADC) in cui un numero limitato di molecole di farmaco o di radionuclide è legato alla proteina attraverso un piccolo *linker*. Nella preparazione di sistemi più complessi vengono invece utilizzati più spesso frammenti anticorpi che non contengono la frazione effettrice Fc ma mantengono la frazione anticorpale variabile per il riconoscimento antigenico, quali $F(ab')_2$ (circa 110 kDa), Fab' (circa 55 kDa) e scF_v (circa 28 kDa). Frammenti di anticorpi sono oggi facilmente ottenibili attraverso ingegneria genetica e *cleavage* enzimatica. Rispetto all'anticorpo intero presentano i vantaggi di avere una dimensione ridotta, essere meno immunogenici, più stabili, di più facile produzione e manipolazione. Frammenti di anticorpi sono stati utilizzati nella preparazione di sistemi per il rilascio di farmaci nel trattamento di numerosi tumori.

Direzionante	Bersaglio cellulare	Bersaglio terapeutico
Peptidi		
RGD	Molecole di adesione cellulare $\alpha_v\beta_3$ integrine	Cellule endoteliali vascolari di tumori solidi
NGR	Amminopeptidasi	Cellule endoteliali vascolari di tumori solidi
Metaboliti		
Acido folico	Recettore folato	Cellule tumorali
Purine	Recettori di membrana	SNC
Proteine		
Transferrina	Recettore transferrina	Cellule tumorali, SNC
Insulina	Recettore insulina	SNC
Zuccheri		
Galattosio, mannosio, lattosio, glucosio	Asialoglicoproteine di membrana	Epatociti
Peptidi		
GE11	Recettore di membrana	Cellule carcinoma colon-rettale
preS1	Recettore di membrana	Cellule epatocarcinoma
Altri		
Alendronato	Idrossiapatite	Matrice ossea
Acido gambogico	Recettore di transferrina	Tumore, SNC
Anticorpi		
Anti-VEGF	Recettore del fattore di crescita dell'endotelio vascolare	Endotelio tumorale
scFv anti- transferrina	Recettore transferrina	SNC
Brentuximab	CD30	Linfoma Hodgkin
Gemtuzumab	CD33	Mieloma linfatico acuto
Trastuzumab	Her2	Tumore al seno
Inotuzumab	CD22	Linfoma Non-Hodgkin
Aptameri	vari	vari
Polimeri		
Acido ialuronico	CD44	Linfociti

Tab. 1 - Alcuni esempi di agenti direzionanti utilizzati nella preparazione di bioconiugati per il *drug delivery* attivo

Agenti direzionanti non anticorpali presentano spesso il vantaggio di essere facilmente sviluppabili e ottenibili con una produzione poco costosa e facili da manipolare. Tuttavia, risultano spesso meno selettivi dei direzionanti anticorpali. Arginina-glicina-acido aspartico (RGD), acido folico e transferrina, ad esempio, possono legarsi ad alcuni tessuti *non-target*. In alcuni casi, come ad esempio nel caso dell'acido folico, agenti direzionanti che fanno parte della dieta o sono metaboliti abbondanti nei fluidi fisiologici possono competere nel riconoscimento del *target*.

Immunoconiugati

Le consolidate tecnologie di ingegnerizzazione anticorpale, ibridoma e *phage-display* consentono oggi di ottenere anticorpi monoclonali (MoAb) ad elevata specificità e affinità di legame verso antigeni selezionati.

In breve tempo, numerosi MoAb sono entrati come tali in terapia e un elevato numero di queste molecole proteiche sono in fase avanzata di studi clinici per il trattamento di numerose patologie. Trastuzumab (anti-ERBB2, Herceptin) o rituximab (anti-CD20, Rituxan), ad esempio, hanno un'intrinseca citotossicità in quanto interferiscono con molecole che stimolano la proliferazione cellulare. La combinazione con farmaci antitumorali rappresenta una strategia per ottenere una sinergia tra l'azione selettiva e citotossica dell'anticorpo e dei chemioterapici.

Gli immuno-bioconiugati rappresentano una delle classi di nuovi farmaci più interessanti e innovative per il trattamento di una grande varietà di patologie, in particolare per la cura di varie forme tumorali. La tecnologia della immunoconiugazione permette di migliorare significativamente il profilo terapeutico di farmaci antitumorali. In particolare, farmaci molto potenti con un basso indice terapeutico, quali auristatine, maritansine e calicheamicine, sono ottimi candidati per la produzione di immuno-bioconiugati. Alla classe degli immuno-bioconiugati appartengono immunoconiugati semplici in cui l'agente terapeutico e/o diagnostico è direttamente legato all'anticorpo, come nel caso di immunoradionuclidi, immuno-farmaci, immunotossine, immunoderivati e immunoconiugati più complessi in cui l'anticorpo è legato a trasportatori colloidali.

Il riconoscimento anticorpo-antigene è, in alcuni casi, seguito dall'internalizzazione del bioconiugato attraverso un processo clatrina-dipendente. La velocità di internalizzazione dipende dalla struttura del bioconiugato, ma alcuni studi hanno dimostrato che spesso è più rapida rispetto all'anticorpo non coniugato.

Nello sviluppo di immunoconiugati vengono utilizzati anticorpi monoclonali (MoAb) interi ingegnerizzati, principalmente umanizzati o chimerici, e loro frammenti che non contengono la frazione effettrice Fc.

Uno dei vantaggi dell'uso di MoAb interi è l'elevata stabilità, la prolungata permanenza in circolo e l'elevata affinità dovuta alla cooperatività dei due siti di riconoscimento antigenico, mentre il farmaco può essere convenientemente coniugato alla frazione Fc. D'altra parte, la frazione Fc può interferire con l'efficacia del bioconiugato in quanto può legarsi ai recettori per questa frazione presenti su cellule come i macrofagi con conseguente captazione ed eliminazione da parte del fegato e della milza. Rispetto ai MoAb, i frammenti $F(ab')_2$, Fab' and scF_v (*single-chain variable*) hanno il vantaggio, di avere un ridotto potenziale immunogenico dovuto alla mancanza della frazione proteica effettrice Fc. I frammenti $F(ab')_2$ hanno due regioni di riconoscimento anticorpale tra loro legate attraverso un ponte disolfuro la cui riduzione porta alla formazione di due frammenti Fab' con funzioni tioliche che possono essere utilizzate come siti di legame di farmaci.

I frammenti scF_v sono particolarmente interessanti perché facilmente identificabili attraverso la tecnologia *phage-display*, sono facilmente ottenibili per fermentazione da *Escherichia coli* e posseggono una bassa immunogenicità. Sono tuttavia meno stabili degli anticorpi interi e vengono rapidamente eliminati dal circolo.

Normalmente gli immuno-bioconiugati semplici ottenuti con anticorpi interi contengono da 1 a 8 molecole di farmaco, che può essere legato alla frazione proteica dell'anticorpo attraverso un legame idrolizzabile o meno frequentemente attraverso un legame stabile. Spesso il farmaco è legato attraverso semplici metodiche chimiche ai numerosi residui lisinici esposti sulla superficie dell'anticorpo o a cisteine rese disponibili dopo riduzione. Un MoAb IgG contiene circa 100 lisine e 8 cisteine impegnate in legami intracatena. Pertanto, il processo di bioconiugazione può portare a prodotti altamente eterogenei in termini di rapporto farmaco/anticorpo, di distribuzione del farmaco nella struttura proteica e di attività biologica. Di conseguenza, i bioconiugati possono contenere popolazioni di prodotti con diverse caratteristiche chimico-fisiche, profili farmacocinetici, proprietà biofarmaceutiche, immunoreattività ed efficacia terapeutica.

Il legame di un elevato numero di molecole di farmaco all'anticorpo può portare a prodotti poco solubili che tendono ad aggregare oppure al mascheramento dei siti variabili dell'anticorpo deputati al riconoscimento antigenico. Oltre al numero di molecole di farmaco legato all'anticorpo, anche il sito di legame è un elemento importante per l'attività e la performance terapeutica del bioconiugato. È riportato che il legame alla catena leggera, così come il legame a siti proteici non esposti al solvente, producono bioconiugati più stabili.

Recentemente sono state sviluppate nuove metodiche chimiche ed enzimatiche per la coniugazione selettiva di farmaci all'anticorpo in grado di produrre immuno-bioconiugati con composizione omogenea e struttura definita.

Tra le metodiche enzimatiche, Sanofi-Genzyme ha sviluppato una procedura di *glycoengineering* che prevede l'introduzione nella frazione Fc dell'anticorpo residui di acido sialico attraverso galattosil e sialil transferasi. Innate Pharma e Rinat Pfizer hanno sviluppato metodiche basate sull'uso di transglutaminasi per legare selettivamente farmaci a funzioni guanidiniche introdotte artificialmente nella struttura anticorpale. Redwood Bioscience utilizza un processo enzimatico attraverso il quale cisteine inserite geneticamente nella sequenza consenso CXPXR vengono trasformate in formilglicine, successivamente utilizzate per la coniugazione di farmaci.

Per quanto riguarda le vie chimiche di coniugazione selettiva, Sutro Biopharma Ambrx ha sviluppato una procedura di ingegneria genetica che prevede l'introduzione di aminoacidi non naturali nella struttura anticorpale seguita dalla coniugazione del farmaco attraverso *click-chemistry*. Una metodica messa a punto dal National Cancer Institute prevede il legame di farmaci a funzioni selenolo-cisteiniche introdotte in anticorpi ingegnerizzati.

Altre tecnologie messe a punto da UCL Cancer Institute e PolyTherics prevedono processi di riduzione selettiva di ponti disolfuro e coniugazione ai gruppi tiolici neo-formati.

Ad oggi vi sono numerosi immuno-bioconiugati in avanzata fase di studio clinico per il trattamento di varie forme tumorali, che si differenziano per i vari elementi che li compongono, specificità dell'anticorpo, tipo di linker e tipo di farmaco.



Radioimmunocongiugati

I radioimmunocongiugati vengono ottenuti per complessazione di anticorpi con radionuclidi ad emissione di radiazione ad alta energia come ad esempio beta emettitori, ^{131}I iodio e ^{90}T ritrio, o alfa emettitori, ^{213}B ismuto e ^{211}A statina. Tali biocongiugati sono utilizzati principalmente per patologie ematopoietiche, quali linfoma o leucemia acuta mieloide, mentre sono risultati poco efficaci nel trattamento di tumori solidi.

GSK e Bayer Schering Pharma AG/Spectrum Pharmaceuticals hanno sviluppato rispettivamente due radioimmunocongiugati, Bexxar e Zevalin[®], approvati per il trattamento del linfoma non-Hodgkin. Entrambi i radioimmunocongiugati sono prodotti con anticorpi murinici monoclonali verso i recettori linfocitari CD20.

Bexxar (Tositumab) è un radioimmunocongiugato di ^{131}I approvato nei primi anni del 2000 per il trattamento del linfoma non-Hodgkin in pazienti CD20-positivi con recidive o refrattari alla terapia con Rituximab. GSK ha però interrotto la produzione di questo prodotto nel 2014 perché non è risultato competitivo con altre forme di trattamento terapeutico. Infatti Bexxar può essere utilizzato per un solo ciclo di trattamento e non è stato definito un chiaro profilo di efficacia e sicurezza. Tra i principali effetti collaterali vi sono manifestazioni allergiche gravi anche letali dovute alla natura murinica dell'anticorpo.

Zevalin (ibritumomab) è un radioimmunocongiugato di ^{90}Y con un diverso profilo farmacocinetico e attività rispetto a Bexxar ma che presenta problematiche di impiego molto simili.

Altri radio-immunocongiugati a base di ^{177}Lu e ^{211}At sono attualmente in fase di sviluppo per il trattamento del cancro al colon.

Anticorpo-farmaco

Tra gli immunocongiugati anticorpo-farmaco entrati nel mercato vi sono Adcetris[®], Kadcyla[®] e Mylotarg[®] sviluppati rispettivamente da Seattle Genetics, Genentech e Wyeth/Pfizer.

Adcetris[®] (brentuximab vedotin) è utilizzato nel linfoma Hodgkin e nel linfoma anaplastico (*systemic anaplastic large cell lymphoma*, ALCL). Questo immunocongiugato è stato ottenuto coniugando monometil auristatina E (MMAE), un inibitore della polimerizzazione del microtubulo, a MoAb anti-CD30 (cAC10). Il farmaco viene legato all'anticorpo attraverso un legame dipeptidico sensibile all'idrolisi da parte di catepsine, enzimi altamente espressi sia nella matrice extracellulare tumorale che a livello lisosomiale. La coniugazione del farmaco avviene a livello dei ponti disolfuro delle cisteine nelle catene pesanti e leggere degli anticorpi che vengono ridotti senza alterare la biospecificità dell'anticorpo. Sebbene il processo chimico consenta di ottenere un prodotto omogeneo con un elevato grado di caricamento di farmaco, 8 molecole di MMAE per cAC10 selettivamente legate a cisteine ridotte, vari studi hanno dimostrato che la massima efficacia terapeutica è ottenuta con 4 molecole di farmaco per molecola di anticorpo mentre il prodotto con 2 molecole di farmaco è inefficace. Inoltre studi condotti con molecole di anticorpi mutate hanno dimostrato che ai fini dell'efficacia terapeutica è più importante il numero di molecole di farmaco caricate piuttosto che il sito in cui sono legate.

Kadcyla[®], sviluppato da Genentech, è un immunocongiugato del trastuzumab (Herceptin), un anticorpo monoclonale anti-HER2 utilizzato per il cancro metastatico al seno. Trastuzumab è stato il primo anticorpo utilizzato come tale nella terapia antitumorale ed è stato approvato da FDA nel 1998. In Kadcyla[®], la mertansina (DM1), un inibitore della tubu-

lina con potente attività citotossica, è legata alle lisine del trastuzumab attraverso succinimidil-4-*N*-maleimidometil)cicloesano-1-carbossilato. Questo consente di ottenere un prodotto omogeneo costituito da 2 a 8 molecole di farmaco per molecola di anticorpo.

Mylotarg[®] (gemtuzumab ozogamicin) prodotto da Wyeth/Pfizer è stato approvato nel 2000 per il trattamento della leucemia mieloide acuta. Gli studi clinici post-approvazione hanno però dimostrato una scarsa efficacia terapeutica e l'insorgenza di vari effetti collaterali che hanno indotto l'azienda ad interrompere la produzione. Come nel caso di Kadcyla, il farmaco viene coniugato all'anticorpo a livello dei residui lisinici. Tuttavia, contrariamente a Kadcyla[®], Mylotarg[®] è un prodotto altamente eterogeneo in cui il 50% delle molecole proteiche contengono da 4 a 6 molecole di farmaco e il 50% delle molecole di anticorpo non è coniugato con il farmaco. Nel caso di Mylotarg[®], il farmaco è coniugato all'anticorpo attraverso un legame idrazonico idrolizzabile in maniera pH dipendente. Sebbene da un lato tale legame garantisca il rilascio del farmaco in forma attiva dall'altro può essere la ragione della mancata efficacia del prodotto. Infatti, la corretta cinetica di rilascio del farmaco rappresenta un elemento chiave per l'efficacia terapeutica del biocongiugato.

Immunotossine

Le immunotossine sono biocongiugati di anticorpi internalizzanti con tossine di origine batterica, fungina e vegetale che inattivano la sintesi di proteine o i segnali di trasduzione. Le tossine più usate sono la ricina, la tossina difterica o l'esotossina da *pseudomonas*.

Ontak (denileukin diftotox) è una proteina di fusione simile ad una immunotossina ottenuta dalla fusione di interleuchina (IL)-2-tossina difterica ed è stata approvata per uso clinico sebbene non abbia dimostrato un'elevata efficacia, mentre gli effetti collaterali, quali edema, ipotensione, ipoalbuminemia e aumento di transaminasi epatiche, sono piuttosto importanti.

Immunoliposomi

Rispetto ai radioimmunocongiugati, immunocongiugati anticorpo-farmaci e immunotossine dove l'agente diagnostico e/o terapeutico è direttamente coniugato all'anticorpo per via chimica o enzimatica o per fusione, gli immunoliposomi sono sistemi vescicolari di tipo *reservoir* che contengono un'elevata quantità di molecole di farmaco (decine di migliaia) e alla cui superficie vengono legate direttamente o attraverso un *linker* polimerico o attraverso *post-insertion* MoAb o frammenti anticorpali. Oltre alla capacità di trasportare elevate quantità di farmaco al sito d'azione, gli immunoliposomi presentano un'elevata avidità per il *target* e *up-take* cellulare dovuti alla presenza sulla superficie di numerose molecole direzionanti. Dall'altro lato le grandi dimensioni (usualmente oltre 100 nm) prevengono la localizzazione passiva nel tessuto tumorale mentre facilitano l'eliminazione attraverso il sistema del reticolo endoteliale. Quest'ultimo problema è stato in parte risolto con la preparazione di liposomi *stealth*, ovvero liposomi rivestiti con PEG. Come gli altri immunocongiugati, gli immunoliposomi possono essere internalizzati e rilasciare il farmaco nell'endosoma oppure rilasciare il farmaco nella matrice extracellulare.

Aptameri-farmaci

Gli aptameri, noti anche come anticorpi chimici, sono molecole oligonucleotidiche in grado di riconoscere e legare con grande selettività un'ampia varietà di *biomarkers*. Rispetto ad altri agenti direzionati, gli

aptameri hanno un profilo di azione unico che li rende particolarmente interessanti per la veicolazione selettiva di farmaci di diversa natura e di piccole molecole organiche od oligonucleotidi, per la chemioterapia, la *gene therapy*, l'immunoterapia, la terapia fotodinamica e la terapia fototermica, principalmente nel trattamento del cancro.

Tra i vantaggi degli aptameri vi sono:

- 1) possibilità di selezione *in vitro* dell'aptamero attraverso la tecnologia Selex per ogni tipo di *target* senza le limitazioni tipiche dei protocolli che implicano l'uso di cellule o animali. Questo consente di ottenere agenti direzionati anche verso *target* non immunogenici o tossici;
- 2) possibilità di sintesi con alta riproducibilità, purezza e quantità;
- 3) possibilità di modifica chimica della struttura per coniugare farmaci o trasportatori di farmaci, come ad esempio polimeri, liposomi e nanoparticelle;
- 4) stabilità e rinaturazione reversibile dopo denaturazione termica.

La preparazione di bioconiugati aptamero-farmaco o aptamero-*carrier* colloidale può essere condotta con tecniche di coniugazione fisica o chimica. Un tipico esempio di coniugazione non covalente aptamero-farmaco è dato da aptameri-doxorubicina. Per la sua capacità di intercalarsi nel DNA, doxorubicina può intercalarsi nella struttura dell'aptamero per essere selettivamente veicolata nelle cellule tumorali. In questo modo sono stati ad esempio ottenuti complessi direzionati a cellule prostatiche LNCaP. Allo scopo di aumentare il carico di farmaco nella struttura dell'aptamero sono stati preparati derivati detti *nanotrains* in grado di intercalare un elevato numero di molecole di doxorubicina.

Sebbene il legame non-covalente sia una procedura di coniugazione aptamero-farmaco semplice ed efficiente, il rilascio del farmaco dal complesso è spesso poco predicibile e avviene facilmente prima di raggiungere la cellula bersaglio. Per superare questo problema è possibile produrre bioconiugati in cui il farmaco viene covalentemente legato all'aptamero attraverso un legame scindibile per via chimica, come ad esempio legami esterei, ammidici, idrazonici o disolfuro. Comunque, il numero di molecole di farmaco che in questo caso possono essere legate all'aptamero è limitato e il basso peso molecolare del complesso ne facilita la rapida eliminazione dal circolo.

Bioconiugati covalenti aptameri-siRNA (*small interfering RNA*) sono stati ottenuti attraverso diverse semplici tecnologie chimiche. Vista la simile natura chimica dell'aptamero e siRNA, questi bioconiugati vengono usualmente definiti come chimere. Vari studi hanno dimostrato come le chimere aptamero-siRNA direzionate alle cellule cancerose sono caratterizzate da un efficiente riconoscimento del *target* ed elevato silenziamento dell'mRNA con una significativa efficacia terapeutica. Per ottenere derivati chimerici più semplici e più efficaci il numero di sequenze dell'aptamero può essere ridotto senza sostanziale perdita di efficienza di riconoscimento del *target*. Inoltre, l'ulteriore coniugazione di PEG 20 kDa al siRNA ne prolunga la permanenza in circolo.

Un'altra strategia impiegata per legare siRNA ad aptameri prevede la modifica di entrambi con molecole di biotina e quindi il loro assemblaggio in presenza di streptavidina, una proteina che riconosce e lega biotina con alta affinità. Sebbene tale tecnica porti a complessi attivi, streptavidina è una molecola altamente immunogenica e il suo uso clinico presenta molte difficoltà.

Infine, aptameri sono stati anche coniugati a nanoparticelle di silice, liposomi, polimeri sia per la veicolazione di farmaci che a scopo diagnostico.

Sistemi polimerici

L'uso di polimeri per la preparazione di sistemi colloidali per il *drug delivery* è iniziato con le scoperte di Robert Langer e del premio Nobel Judah Folkman che, negli anni Settanta, hanno dimostrato come con tali materiali fosse possibile ottenere sistemi in grado di rilasciare farmaci in modo spazialmente e temporalmente controllato, ovvero in siti specifici dell'organismo con cinetiche di liberazione del farmaco predeterminate. I bioconiugati polimerici rappresentano oggi una delle classi più varie ed affascinanti dello sviluppo farmaceutico, con ampie prospettive di sviluppo per l'ottenimento di sistemi innovativi per la veicolazione attiva e selettiva di farmaci. I bioconiugati polimerici consentono di coniugare in un'unica macromolecola numerose unità di farmaci e combinare farmaci con diversa attività. Inoltre, i bioconiugati polimerici consentono di migliorare il profilo biofarmaceutico e farmacocinetico di farmaci, superare problemi di solubilità e stabilità di farmaci, favorire la localizzazione di farmaci attraverso meccanismi passivi in tumori solidi.

Opaxio (paclitaxel poliglumex) è un bioconiugato polimerico sviluppato da Cell Therapeutics per il trattamento del tumore non-microcitoma del polmone e del tumore dell'ovaio. In Opaxio il farmaco poco solubile paclitaxel è stato coniugato al polimero solubile poliglutammino attraverso un legame idrolizzabile. Studi hanno dimostrato che questo bioconiugato, di per sé inattivo, si accumula passivamente nella massa tumorale solida dove rilascia il farmaco.

Polimeri solubili multivalenti sono stati utilizzati sulla base dello schema sviluppato da Helmut Ringsdorf negli anni Ottanta, per coniugare in una stessa macromolecola, oltre a farmaci, elementi con diverse funzioni: agenti direzionanti e modulatori delle caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche del sistema terapeutico. Sulla base di questo concetto sono state proposte diverse piattaforme di sviluppo che differiscono per tipo di elementi inseriti nella macrostruttura molecolare e architetture, offrendo la possibilità di progettare sistemi per diversi tipi di impieghi terapeutici.

In Tab. 2 sono riportate le principali classi di polimeri utilizzati per la preparazione di bioconiugati per il direzionamento passivo ed attivo. Tali materiali possono essere naturali, semisintetici o sintetici, con diversa composizione chimica, dimensione, stabilità solubilità, struttura (lineare, ramificata o dendritica in Fig. 2) e capacità di disperdersi in soluzione

Poliesteri	Polieteri	Poliacrilili	Polipeptidi	Polisaccaridi	Poliammidi
Polilattidi	Polossameri	Polimetacrilati	Poliglutammino	Destrano	Poliammidoammine
Polilattidi-co-glicolidi	PEG	Poliacrilammidi	Poliaspartico	Eparina	
Policaprolattoni		Poliacrilati	Polilisine	Chitosano	

Tab. 2 - Principali classi di polimeri utilizzati per la preparazione di bioconiugati

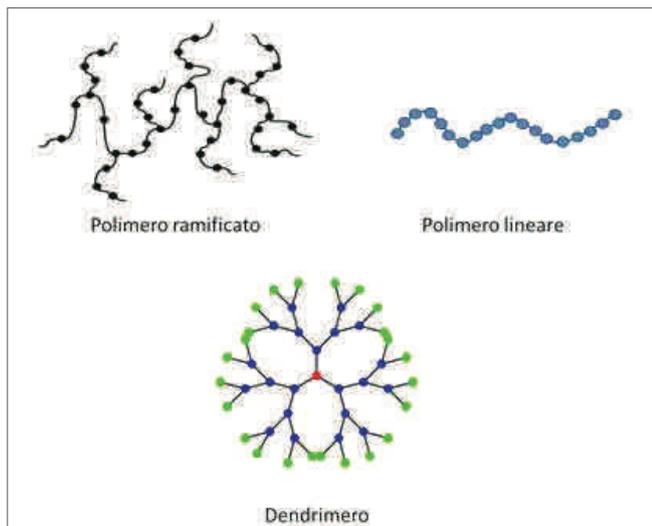


Fig. 2 - Strutture di polimeri

come singoli unimeri o autoassemblarsi formando sistemi colloidali di tipo nanoparticellare o micellare.

Le caratteristiche principali dei polimeri per la preparazione di bioconjugati polimerici sono:

- multivalenza per consentire la coniugazione delle altre funzioni molecolari (farmaci, agenti direzionanti, modulatori chimico-fisici e biofarmaceutici);
- solubilità;
- biocompatibilità sistemica e locale;
- inerzia biologica;
- eliminabilità.

Per essere eliminato un polimero deve avere un peso molecolare non troppo elevato, oppure deve essere preliminarmente degradato in frammenti. In generale, i polisaccaridi, ampiamente usati nella veicolazione di farmaci, hanno un'intrinseca affinità per le cellule epatiche e per questo tendono ad accumularsi rapidamente e massivamente nel fegato, rendendo il loro impiego complicato. L'acido ialuronico è un polimero della matrice extracellulare ubiquitario coinvolto in numerosi processi biologici, come ad esempio nella proliferazione cellulare. Poiché l'acido ialuronico è in grado di riconoscere selettivamente il recettore di membrana CD44 espresso in numerose cellule tumorali, ha di per sé interessanti caratteristiche direzionanti. Tuttavia la sua attività biologica a livello tumorale, come ad esempio l'effetto metastatico dovuto alla sua azione sulla mobilità cellulare, può rappresentare un limite al suo impiego.

Per quanto riguarda le modifiche alla struttura polimerica con modulatori delle caratteristiche chimico-fisiche e biofarmaceutiche, al *backbone* vengono spesso coniugate molecole che aumentano la solubilità della struttura macromolecolare in modo da bilanciare l'idrofobicità impartita dal legame di molte molecole di farmaco. Altri modulatori sono molecole che rispondono a stimoli endogeni o esogeni microambientali che inducono variazioni di struttura in funzione del pH o della temperatura e promotori della permeabilità cellulare.

Un aspetto particolarmente rilevante nella costruzione dei bioconjugati polimerici è la modalità di coniugazione del farmaco al *backbone* polimerico. Usualmente il bioconjugato è un profarmaco macromolecolare inattivo

che deve rilasciare il farmaco per svolgere la sua azione terapeutica. Pertanto il farmaco viene coniugato direttamente o attraverso selezionati *linker* attraverso legami idrolizzabili. In questo senso sono state sviluppate numerose strategie di coniugazione attraverso semplici legami amidici ed esterei con diverse cinetiche di rilascio del farmaco.

Legami disolfuro sono stati proposti sulla base dell'evidenza che il potere riducente intracellulare è maggiore di quello extracellulare per la presenza dell'elevata concentrazione di glutazione che consente il rapido rilascio del farmaco. Particolarmente interessanti sono i legami pH sensibili, come i legami acetalici e idrazonici che vengono scissi in condizioni acide. Questo tipo di coniugazione viene in particolare utilizzato per il rilascio del farmaco nella massa tumorale in cui il pH è debolmente acido (pH≈6,5) e nella cellula a livello lisosomiale (pH≈4,5).

Nella tecnologia PDEPT (*Polymer Directed Enzyme Prodrug Therapy*), legami più complessi ma altamente specifici sono realizzati con l'impiego di brevi sequenze peptidiche riconosciute selettivamente da enzimi, come ad esempio la sequenza Gly-Phe-Leu-Gly selettivamente riconosciuta e idrolizzata da catepsina B nel compartimento lisosomiale.

Idrossipropil-metacrilammide (HPMA) è stato uno dei primi polimeri utilizzati per la realizzazione di bioconjugati per il direccionamento attivo di farmaci attraverso la tecnologia PDEPT. Questo polimero non degradabile è stato funzionalizzato con vari agenti direzionanti tra cui con MoAb, Fab', lectine, galattosio, acido folico per il direccionamento a diversi tipi di cellule tumorali, mentre i chemioterapici sono stati coniugati al *backbone* polimerico con peptidi degradabili per via enzimatica.

Nonostante la loro tossicità, le polietilenimine sono state ampiamente utilizzate per la veicolazione di farmaci oligonucleotidici con cui si possono facilmente associare con legami di carica. Con lo stesso principio sono stati preparati bioconjugati di polietilenimina con aptameri e siRNA.

Polimeri auto-aggreganti, quali PEG-PLGA, PEG-PLA, Pluorinic, PEG-PE e PEG-PCL, sono stati derivatizzati con diversi agenti direzionanti, come ad esempio acido folico, RGD, zuccheri (galattosio, mannosio, glucosio, lattosio), aptameri e anticorpi per la veicolazione di farmaci antitumorali. Tra i polimeri polisaccaridici, numerosi studi sono stati condotti con acido ialuronico a basso peso molecolare che è di per sé direzionato a cellule linfatiche CD44+, ma anche con polimeri inerti, quali destrano, chitosano e pullulano. Con quest'ultimo in particolare sono stati preparati bioconjugati pullulano modificato con alendronato alle metastasi ossee del tumore al seno, che si manifestano con grande frequenza negli stadi avanzati della patologia, e pullulano modificato con acido folico direzionato a cellule tumorali che sovraesprimono questo recettore.

Bioconjugati polimerici vs bioconjugati-liposomiali

Come riportato sopra, le piattaforme tecnologiche oggi disponibili consentono di progettare vari tipi di bioconjugati colloidali per il direccionamento attivo di farmaci, che differiscono per materiali, struttura supramolecolare, dimensione, forma, quantità e modalità di caricamento del farmaco, modalità di coniugazione del direzionante ecc. La fase di progettazione sulla base di un'analisi preliminare degli elementi fondamentali del sistema, anche attraverso una valutazione *in silico*, rappresenta un punto chiave per l'ottenimento del prodotto con le caratteristiche richieste. Tuttavia, la complessità di questi sistemi rende complicato un esaustivo esame di tutte le variabili che possono influenzare l'efficacia terapeutica del prodotto finale. Ad esempio, è difficile conoscere a prio-

ri con buona approssimazione il grado di derivatizzazione ottimale per il direzionamento, la quantità di farmaco che deve essere caricata nel sistema e la cinetica con cui viene rilasciato nel sito d'azione. Inoltre il profilo biofarmaceutico del prodotto finale è determinato dall'insieme delle caratteristiche chimico-fisiche dei singoli moduli che compongono il sistema supramolecolare. Pertanto, la progettazione di un bioconjugato per il *drug delivery* è generalmente basata su dati sperimentali di letteratura con un approccio empirico.

Sulla base di queste considerazioni, è possibile concludere che è difficile prevedere il sistema più efficiente tra le varie piattaforme proposte. È inoltre complicato confrontare sistemi strutturalmente molto diversi tra loro per raccogliere informazioni sull'effetto che i singoli elementi strutturali possono avere sulla performance dei diversi prodotti. Invece, studi comparativi possono essere svolti per esaminare a valle la diversa performance terapeutica in modelli *in vivo*.

Uno studio comparativo fra bioconjugati strutturalmente diversi tra loro è stato condotto utilizzando pullulano funzionalizzato con acido folico per il direzionamento a cellule tumorali e covalentemente coniugato con doxorubicina attraverso un legame acido-sensibile e liposomi PEGilati funzionalizzati sulla superficie con acido folico e caricati con doxorubicina (Doxil folato), Fig. 3.

Lo studio *in vitro* ha dimostrato che il sistema liposomiale ha una spiccata selettività per le cellule tumorali, contrariamente al prodotto polimerico che è risultato poco selettivo. Studi *in vivo* condotti con modelli animali in cui era stato impiantato un tumore sovraesprimente il recettore dell'acido folico hanno invece dimostrato che i due bioconjugati hanno un profilo di efficacia e tossicità che dipendono dal protocollo di somministrazione. Nel caso di somministrazione singola i liposomi sono risultati molto più efficaci del bioconjugato polimerico. Nel caso invece di somministrazioni multiple, l'elevata tossicità dei liposomi ne impedisce l'impiego mentre il bioconjugato polimerico è risultato avere un'eccezionale attività antitumorale.

Direzionamento al sistema nervoso centrale

Tra gli agenti direzionanti al sistema nervoso centrale (SNC) vi sono numerose molecole e macromolecole con diversa complessità strutturale e composizione chimica come ad esempio zuccheri, purine, amminoacidi, e proteine.

Transferrina e scF_v, anti recettore della transferrina, sono stati largamente utilizzati per trasportare sistemi colloidali al SNC attraverso un processo attivo di transitosi. Grazie alla tecnologia di *phage-display* sono stati sviluppati anche piccoli ligandi peptidici di 7-12 aminoacidi che legano selettivamente il recettore di transferrina.

Insulina è un altro polipeptide utilizzato come agente direzionante per *drug delivery* al SNC. Tuttavia, come nel caso della transferrina, per ottenere una concentrazione terapeutica di farmaco è necessaria una elevata quantità di direzionante che risulta essere tossica. Pertanto, in alternativa ad insulina può essere usato un MoAb che riconosce il recettore di insulina. Questo anticorpo è stato utilizzato per la preparazione di immunoliposomi sia per il *gene delivery* che per il *drug delivery*.

I recettori megalinici (glicoproteina 330) LRP1 and LRP2 sono stati utilizzati come bersaglio per il *delivery* al SNC in modo analogo ad insulina e transferrina. Agenti *targeting* per questi recettori includono numerose molecole con singolari diversità e complessità strutturali. BioMarin Pharmaceuticals Inc. ha sviluppato NeuroTrans™, una tecnologia basta

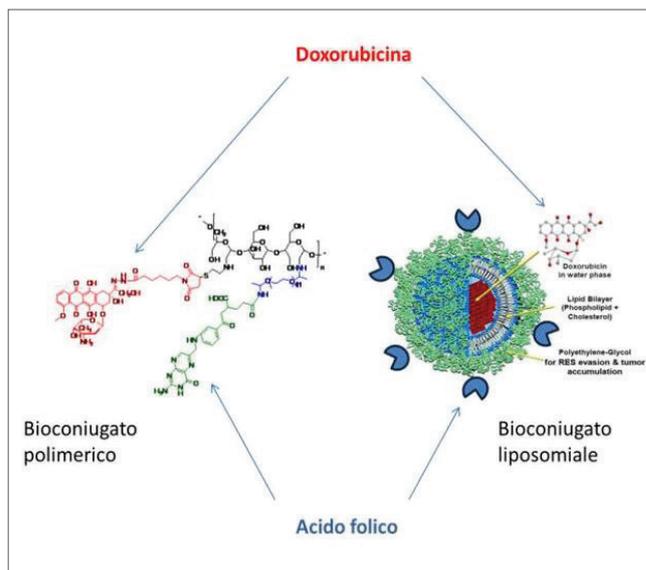


Fig. 3 - Bioconjugato polimerico acido folico-pullulano-doxorubicina e immunoconjugato acido folico-liposoma PEGilato-doxorubicina

sull'uso di melanotransferrina per veicolare selettivamente farmaci al SNC attraverso i recettori LRP. Con questa tecnologia sono stati sviluppati sistemi colloidali per veicolare doxorubicina a tumori cerebrali ed enzimi per terapie sostitutive. BioMarin ha sviluppato anche sistemi di *delivery* selettivo basati sull'uso dell'agente direzionante RAP, una proteina di 39 kDa *chaperone* che induce il *foldig* e *trafficking* dei recettori per LDL.

Conclusioni

La tecnologia della bioconiugazione consente oggi di ottenere nuovi sistemi complessi supramolecolari multifunzionali per il direzionamento attivo di farmaci. Tali bioconjugati trovano particolare impiego per veicolare farmaci a tessuti ed organi poco raggiungibili dai farmaci, come il sistema nervoso centrale, e per il *delivery* di molecole con un basso indice terapeutico che può portare ad un'elevata tossicità sistemica. Tuttavia, sebbene l'uso dei bioconjugati per il direzionamento attivo di farmaci presenti evidenti vantaggi rispetto alle forme farmaceutiche tradizionali, a causa della complessità strutturale lo sviluppo di prodotti efficienti richiede una attenta e complessa progettazione e caratterizzazione. Pertanto, la sfida tecnologica che l'industria farmaceutica è chiamata a raccogliere per poter proporre sistemi terapeutici innovativi è lo sviluppo di prodotti non solo efficaci ma anche semplici e ben caratterizzati facilmente ottenibili a livello industriale con costi contenuti.

Bioconjugates in Drugs Active Delivery

To date, an arsenal of colloidal formulations have been developed to deliver fragile and poorly soluble drugs, as well as therapeutics with limited ability to cross the biological barriers and reach the disease site. More recently, colloidal drug delivery systems have been harnessed with targeting agents to yield active recognition of specific cellular or subcellular targets and accumulate in the disease site where the drug is released.