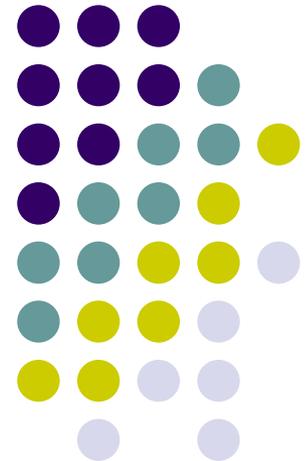


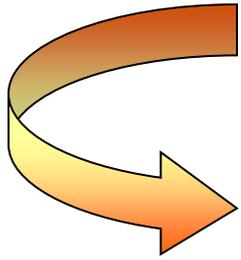
Applicazione delle nanotecnologie in campo farmaceutico

Dr.ssa Barbara Ruozi

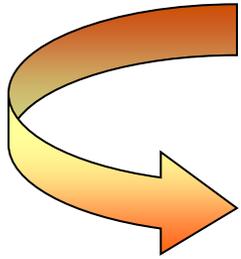
barbara.ruoz@unimore.it



Università degli studi di Modena e Reggio Emilia

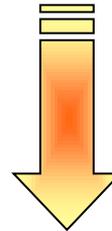


NANOSCIENZE termine utilizzato per definire lo studio dei fenomeni associati ad oggetti con dimensioni comprese tra 1 e 100 nm.



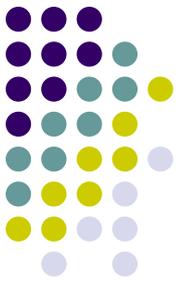
NANOTECNOLOGIA definisce la creazione, manipolazione ed applicazione di strutture nanometriche (Kawasaki and Player, Nanomedicine, vol 1, 2005).

NANOMEDICINA settore della medicina che si occupa della applicazione della **nanotecnologia** per la prevenzione e cura delle patologie. Coinvolge il monitoraggio, la riparazione, la costruzione ed il controllo di sistemi biologici umani a livello molecolare utilizzando nanodevices e nanostrutture opportunamente ingegnerizzate (From Freitas Jr., Nanomedicine, vol 1, 1999).



DRUG DELIVERY SYSTEMS

Perché utilizzare sistemi colloidali per il rilascio di farmaci?



- ✓ Stabilizzazione dei principi attivi
- ✓ Controllare-modulare il rilascio dei farmaci

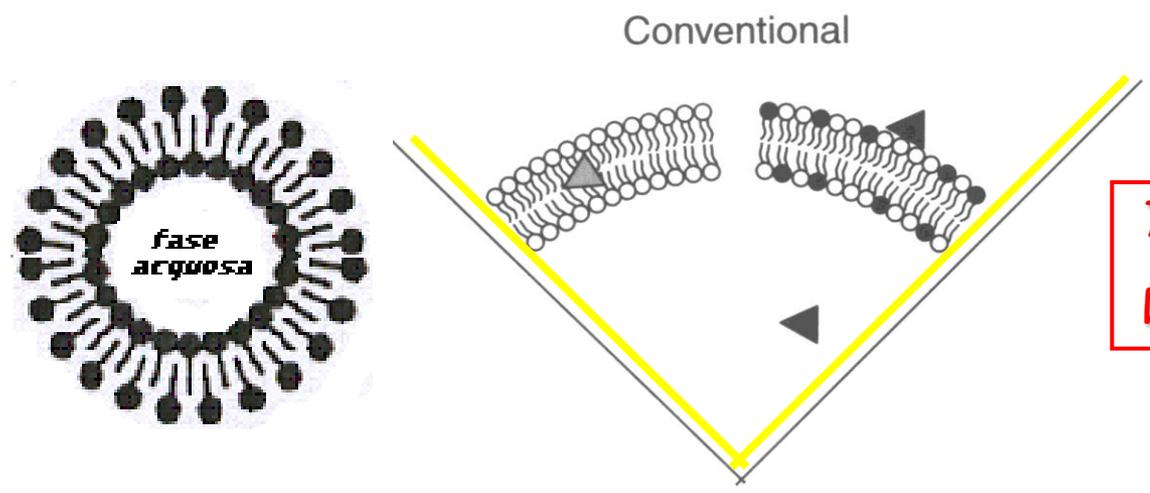
Veicolazione

- ✓ Possibilità modificare i sistemi con polimeri abili ad aumentare il tempo di permanenza in circolo, con conseguente possibilità di giungere al sito d'azione
- ✓ Possibilità di introdurre molecole ligando specifiche sulla superficie così da ottenere un riconoscimento selettivo del targeting

Direzionamento



Applicazioni dei liposomi nel direccionamento dei farmaci



Targeting macrofagico
Vaccinazione

Ta

Vaccinazione

Virosome plus HAV

The different components of the Epaxal virosome

Hepatitis A virion	Haemagglutinin	Neuraminidase	Phospholipid	Epaxal®
--------------------	----------------	---------------	--------------	----------------

Berna >8- © nothing

Virosome

Inflexal contains three different virosome types, each one of them carrying the surface antigens of one of the three currently circulating influenza strains.

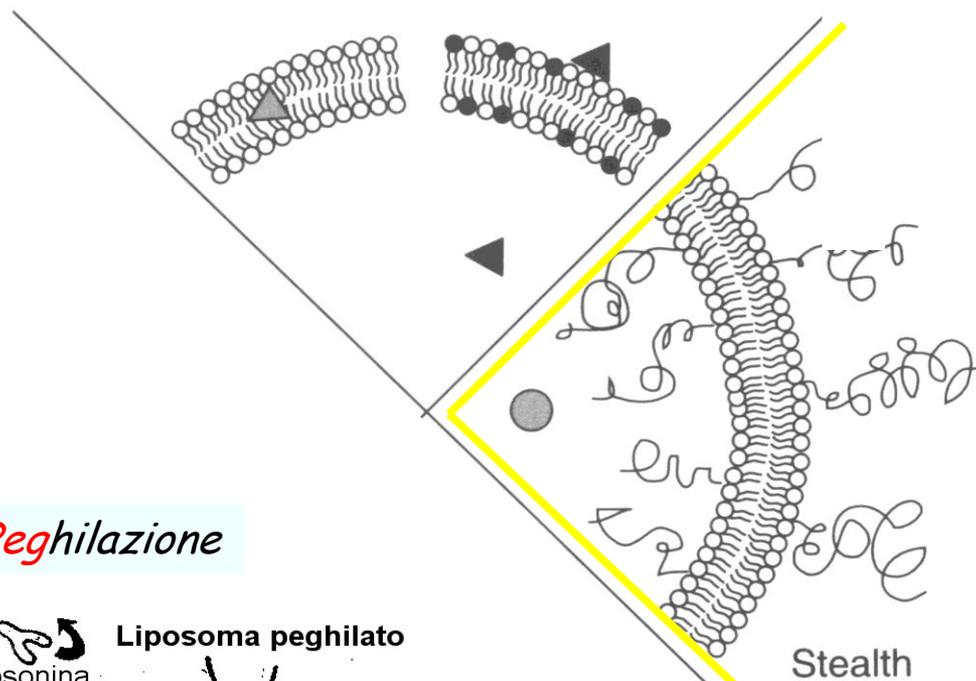
Berna >8- © nothing



mericina in
gli effetti
distrazione
eno tossici
bero con
riazione del rischio di
nefrotossicità- tromboflebiti e
anemia).



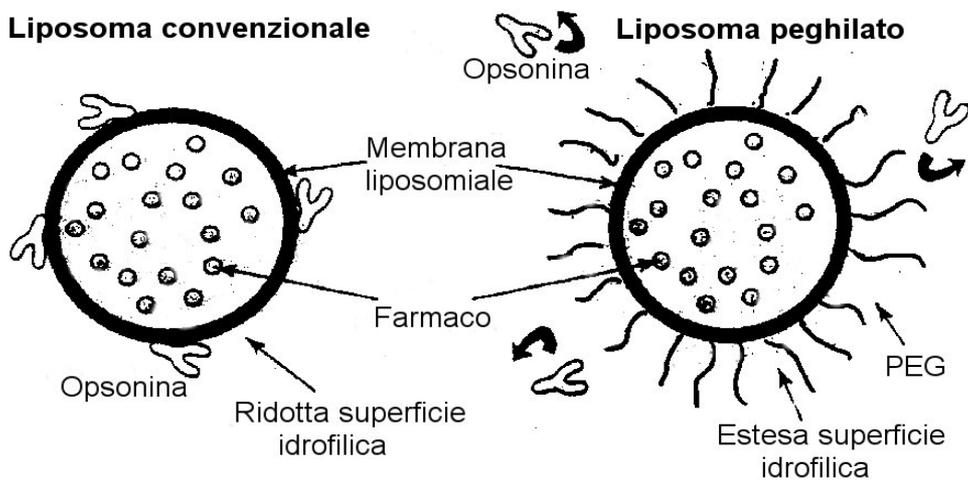
Conventional



Effetto della Peghilazione

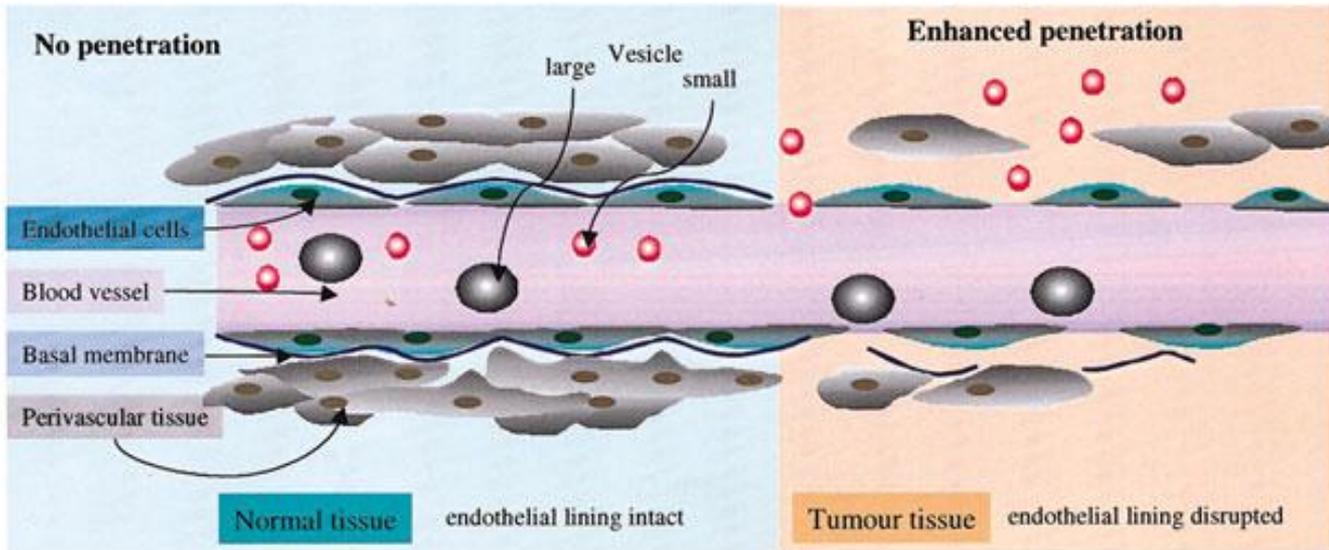
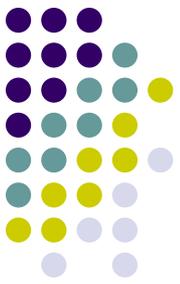
Liposoma convenzionale

Liposoma peghilato



Stealth

Stabilizzazione-Targeting passivo

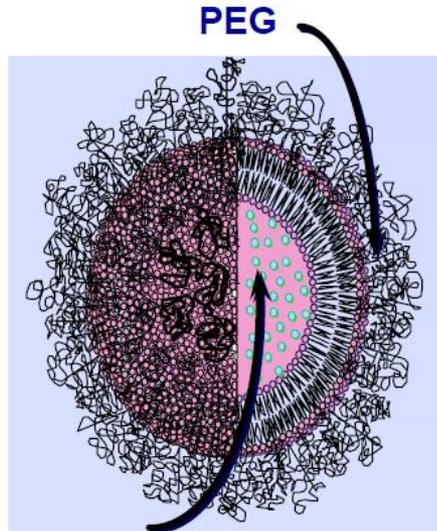
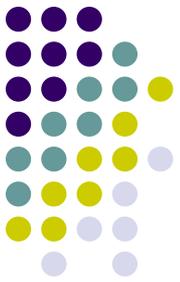


*Enhanced
Permeability
Retention
effect*

TUMORE:

- *NEOANGIOGENESI*
- *DISCONTINUITA' DELL'ENDOTELIO*
- *PERMEABILITA' MODIFICATA (VPF E BRADIKININA)*
- *MANCANZA DRENAGGIO LINFATICO*

Doxil[®] -Caelyx[™] (1995)



Doxorubicin

Il sistema evade la cattura macrofagica



Rimane in circolo per tempi lunghi



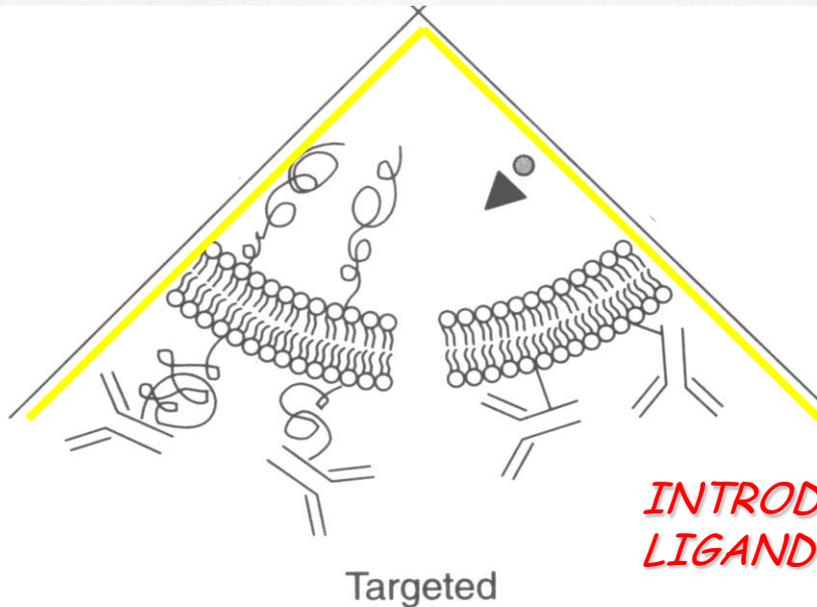
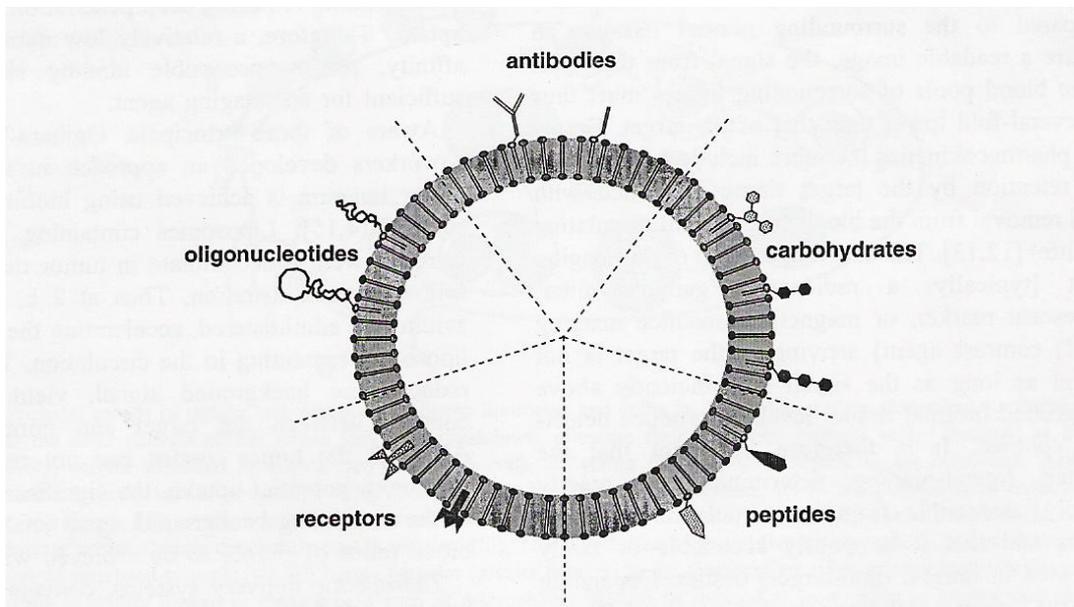
Il farmaco è protetto fino al target dove viene ceduto



Il farmaco si concentra nel tumore

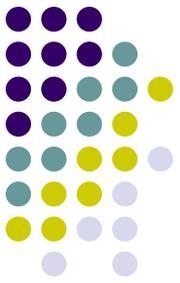
Agent	Anthracycline	Membrane Constituents	Size	Mononuclear Phagocyte System (MPS)
CAELYX [™] / Doxil [®] (PLD)	Doxorubicin	Cholesterol, saturated phosphatidylcholine, polyethylene glycol	85 nm	Avoids MPS

Il Doxil[®] contiene una soluzione di doxorubicina incapsulata in liposomi Stealth[®] composti da MPEG-DSPE, HSPC e CHOL. Molto efficace nel sarcoma di Kaposi, tumore al polmone, tumore mammario metastatico e vari altri tipi di carcinoma con pochissimi sintomi di cardiotossicità

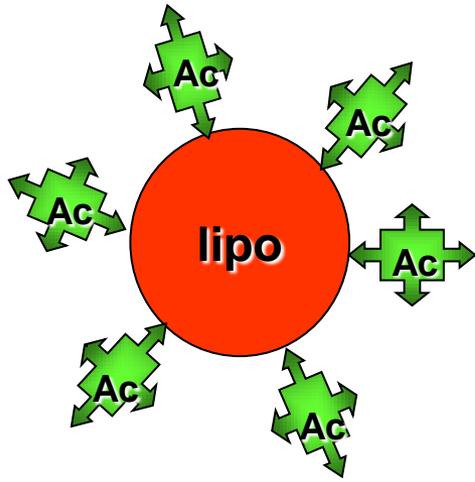


**INTRODUZIONE DI MOLECOLE
LIGANDO SPECIFICHE**

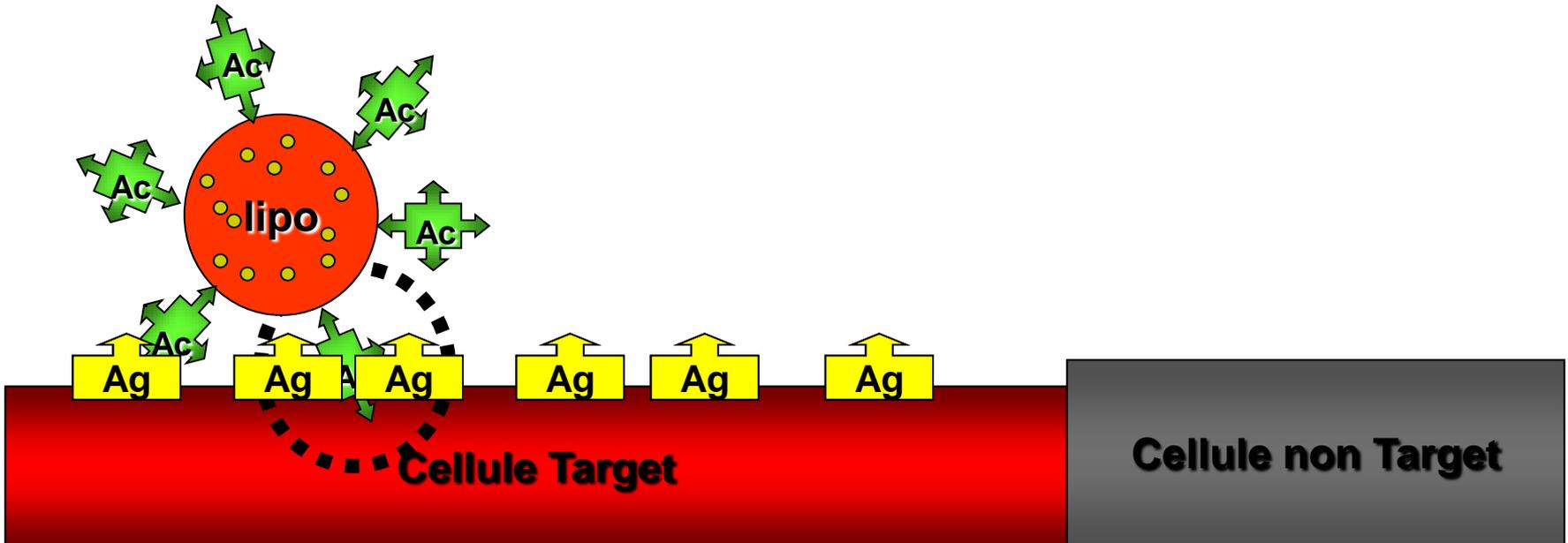
**Targeting attivo organo/cellula
specifico**



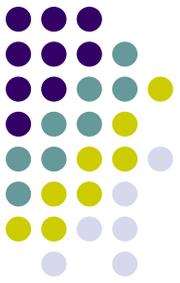
Immunoliposomi



- 1 Circolazione nel torrente circolatorio
 - 2 Direzione Antigeno-Anticorpo
 - 3 Specificità di legame
 - 4 Liberazione del farmaco
- Attività Farmacologica



Formulazioni liposomiali in commercio (al 2008)



Doxil®/Caelyx® Market (1995) -----Doxorubicina

Daunoxome® Market (1996)----- Dunorubicina

Myocet® Market -----Doxorubicina

Ambisome® Market (1997) -----Amfotericina

Propofol® Market(1989)-----Deprivan

LeishmaniaAmphotec® Market (1997)--Amfotericina

Depocyt ® Market (1999)----- Citarabina

Visudyne ® Market(2000) -----Verteporfina

DepoDur ® Market (2004)----- Morfina Solfato

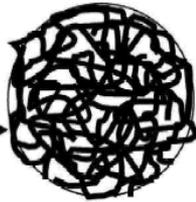
Inflexal V Berna® Market(1997)-Virosome influenza vaccine

Epaxal Berna ® Market -----Virosome hepatitis vaccine

Nanoparticelle polimeriche

Nanosphere

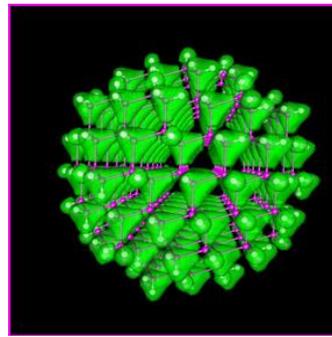
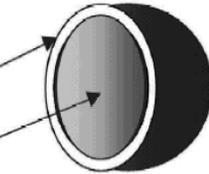
Polymeric matrix



Nanocapsule

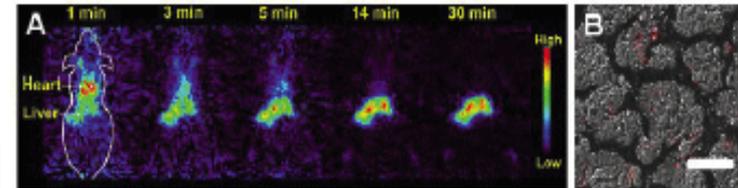
Polymeric membrane

Oily or aqueous core



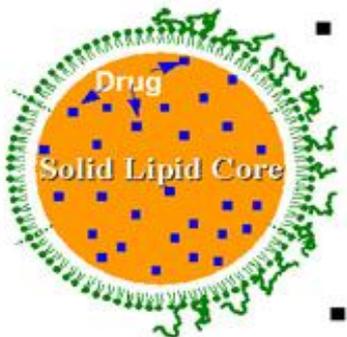
Nanocristalli
(Quantum dots)

Probes fluorescentii chiamati "quantum dots" (QDs). I quantum dots semiconduttori sono nanocristalli o nanoparticelle delle dimensioni di 1-10 nm con uniche proprietà fotochimiche e fotofisiche non disponibili con le normali proteine fluorescenti o con probes organici. Efficacemente stimolati, possono emettere luce a diversa lunghezza d'onda, rendendoli adatti per un in vivo imaging a livello molecolare e cellulare, ma anche per l'intero corpo dell'animale.



Sistemi Nanoparticellari

Solid Lipid Nanoparticles (SLN)



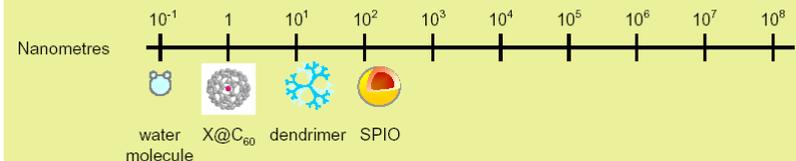
Solid Lipid nanoparticle

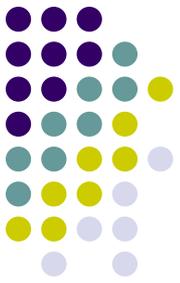
Np **SUPERPARAMAGNETICHE** costituite da un cuore di ossido di ferro (magnetite Fe_3O_4) ricoperte da polimeri come destrano che operano un mutamento del campo magnetico a livello del tessuto che le ha captate (dignosi per differenza di contrasto)

Nanocristalli (Np superparamagnetiche)

Magnetic resonance imaging

- Superparamagnetic nanocrystals (**dark** contrast effect in images)
 - Superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles (50-500 nm) – *on the market* Lumirem® and Endorem™, Advanced Magnetics Inc, USA
 - Ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) nanoparticles (<50nm) – *clin. investigation* Supravist™, Schering AG, Germany Sinerem®, Guerbet SA, France
- Paramagnetic nanoparticles (**bright** contrast) – *development phase*
 - Several nanoparticles under development, e.g. X@C₆₀, Gd-conjugated dendrimers Trimetaspheres™, Luna Innovations Inc, USA Gadomer-17, Schering AG, Germany

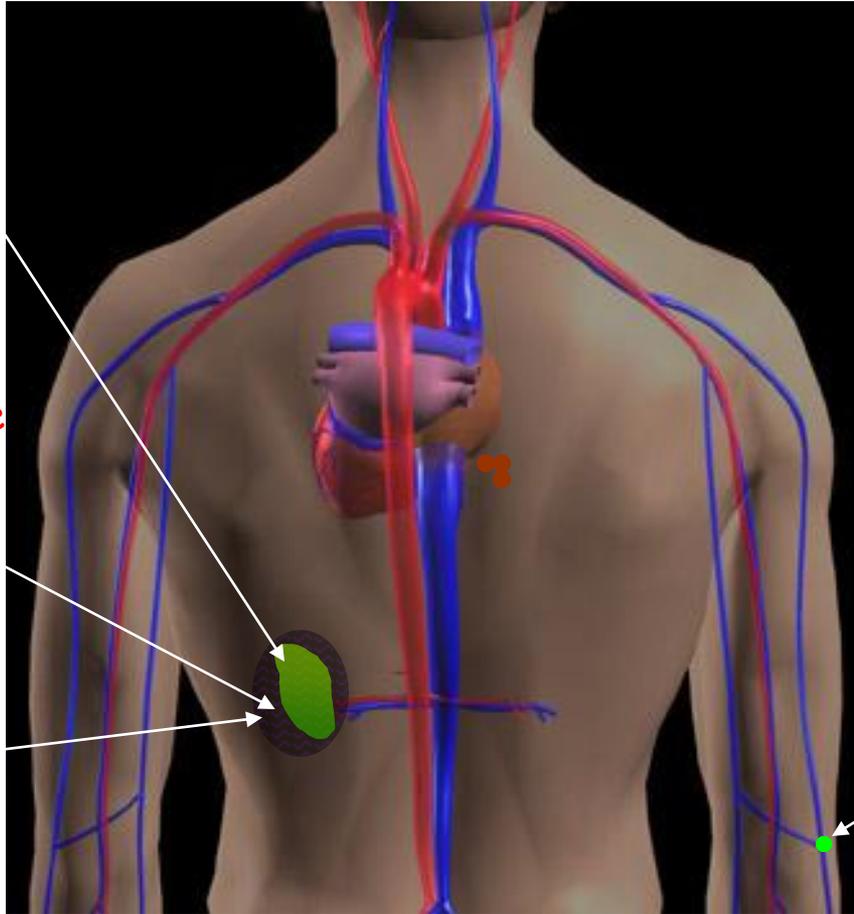




Solid tumor

2. Apply magnetic field to concentrate particles

Modulate field to release drug from particles

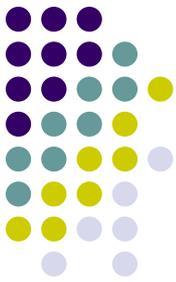


Other options for targeting:
1. Coating NpM with antibodies to target tumor

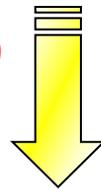
Inject NpM IV,
NpM will circulate through the blood stream

Nanoparticulate systems

Drug nanocrystals	Preclinical	Polymers and surfactants covering nanocrystal surfaces are required to provide stabilization against aggregation	Amphotericin B Etoposide, camptothecin, paclitaxel
Polymer-based nanoparticles	Preclinical	Polyester degrades by hydrolysis to produce acid metabolites that in excess may not be desirable	Tamoxifen Cyclosporin-A Theophylline
Lipid-based nanoparticles	Preclinical	Enzymatic degradation in vivo can lead to production of undesirable metabolites such as stearic acid	Doxorubicin Camptothecin
Nanogels	Preclinical	Some polymers used may not yet be tested/used in humans	Oligonucleotides
Albumin nanoparticles	Marketed In vitro	Validation of lack of immune reactivity maybe required	Paclitaxel DNA and antisense oligonucleotides



Abraxane® (gennaio 2005)



100 mg paclitaxel
900 mg albumina

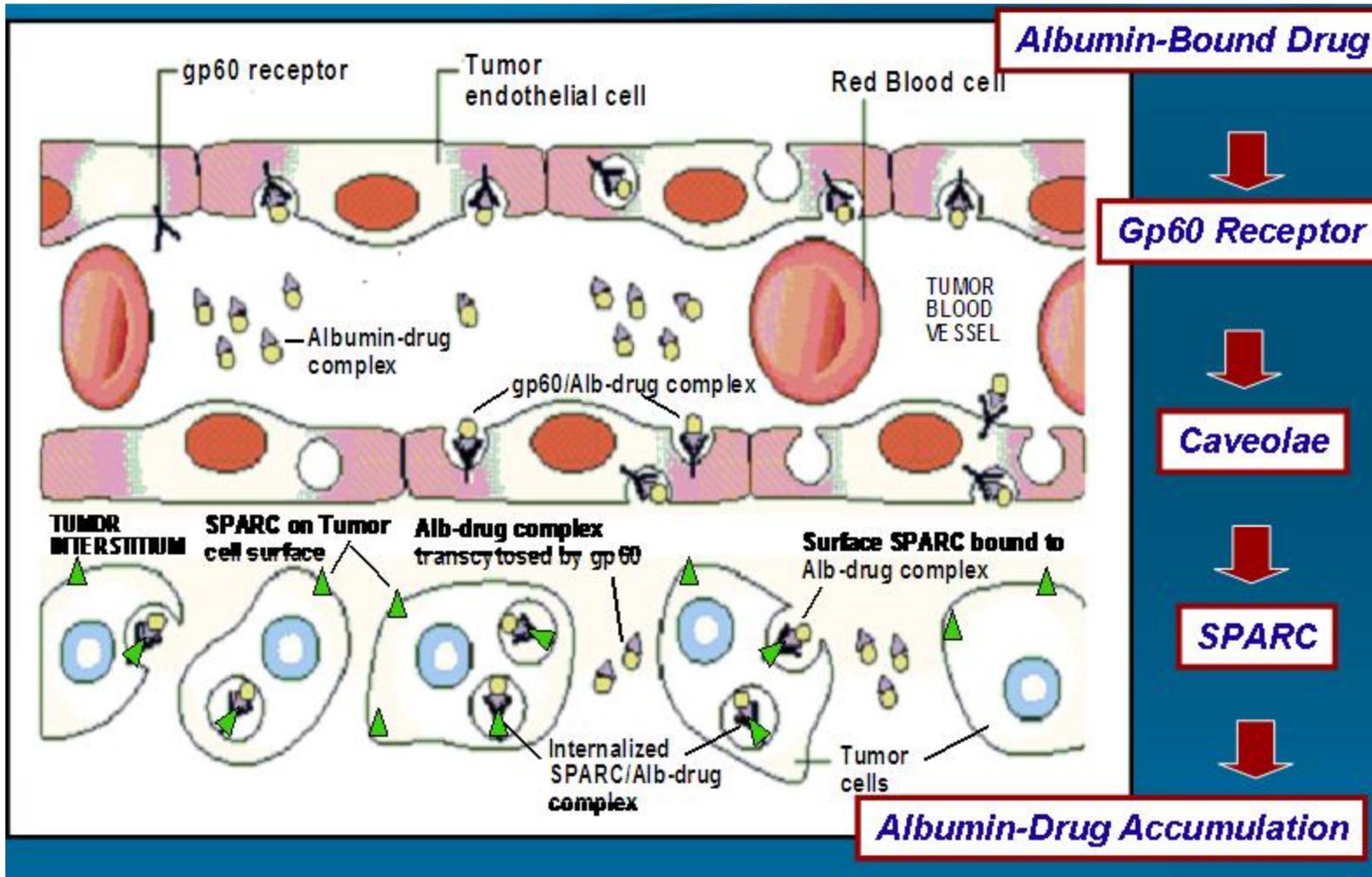
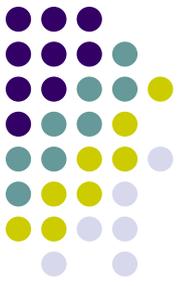


Paclitaxel 6 mg/ml
Cremophor 537 mg/ml
Ethanol 396 mg/ml

Abraxane è indicato nel trattamento del cancro metastatico della mammella in pazienti in cui il trattamento iniziale per la malattia metastatica non è più efficace e per le quali la terapia standard, contenente un'antraciclina (un tipo di medicinale antitumorale), è controindicata. Il termine "metastatico" indica che il tumore si è diffuso ad altre parti del corpo.

Np di albumina contenenti paclitaxel (antitumorale): le nanoparticelle di albumina attraversano l'endotelio verso l'area interstiziale del tessuto tumorato per transitosi.

E' facilmente somministrato via iv. Abraxane non contiene solventi tossici ed ha dimostrato un tasso di risposta clinica migliore del doppio rispetto a Taxol in uno studio randomizzato condotto su 460 pazienti.



Abraxane utilizza il trasporto attraverso specifici recettori sovraespressi sull'endotelio del vaso tumorato; è la via naturale con la quale le cellule tumorate ottengono energia e nutrimento per la loro rapida crescita. L'albumina è un carrier naturale di nutrienti idrofobici, vitamine e steroidi e regola il passaggio di una discreta quantità di molecole dal sangue ai tessuti. L'albumina tende ad accumularsi in aree infiammate e in molti tumori.

Liposomes
Benham, Gregoridis

**Antibodies and their
Conjugates**

**Viruses as
viral vectors for**

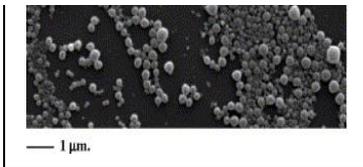


200

Ruozzi et al

Table 1
Currently available targeted cancer treatments using antibodies [13,14]

Generic name	Trade name	Manufacturer, year approved	Target and indication
Rituximab	Rituxan®	IDEC Pharmaceuticals, 1997	Anti-CD20 antibody or relapsed/refractory CD-20 positive B-cell non-Hodgkin's lymphoma and low-grade or follicular-type lymphoma
Trastuzumab	Herceptin®	Genentech, 1998	Blocks HER2 receptor for HER-2 positive metastatic breast cancer
Gemtuzumabozogamicin	Mylotarg®	Wyeth Pharmaceuticals, 2000	Anti-CD33 antibody for relapsed/refractory acute myelogenous leukemia
Alemtuzumab	Campath®	Berlex Laboratories, 2001	Anti-CD52 antibody for B-cell chronic lymphocytic leukemia
Ibritumomab tiuxetan	Zevalin®	IDEC Pharmaceuticals, 2002	Anti-CD20 antibody for Rituximab-failed non-Hodgkins lymphoma
Gefitinib	Iressa	AstraZeneca, 2003	Blocks epidermal growth factor receptors and tyrosine kinase activity for advanced non-small cell lung cancer

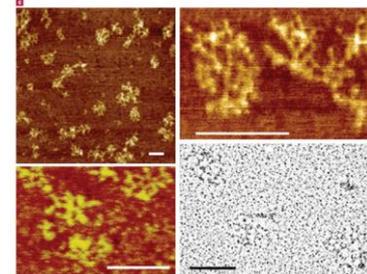
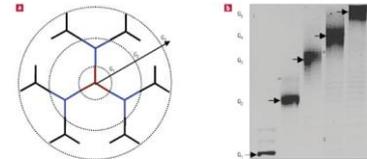


Costantino et al., J. Contoll. Rel. 2005

conjugates

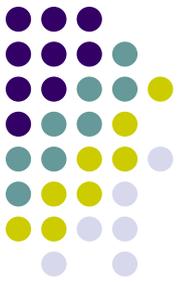


Polymer-drug conjugates



Yougen et al., Nat. Mat. 2004

Coniugati farmaco-polimero



N-(2-idrossipropil) metacrilammide (HPMA), Poliaminoacidi sintetici, Polisaccaridi, Polietilenglicole

Modello di Ringsdorf (1975)

polymer

N=C(N)C=O

drug

polymer

N=C(O)C=C(O)C=O

drug

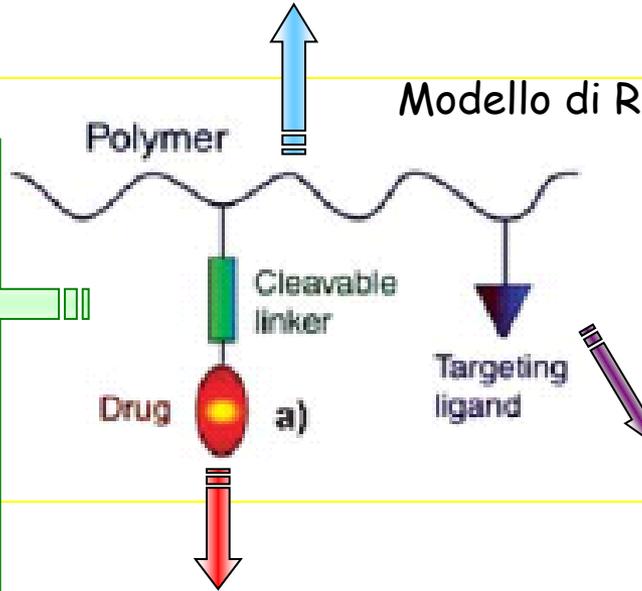
Fig. 7. The hydrazone and *N*-cis-aconyl spacer.

pH sensibili

oligopeptidici

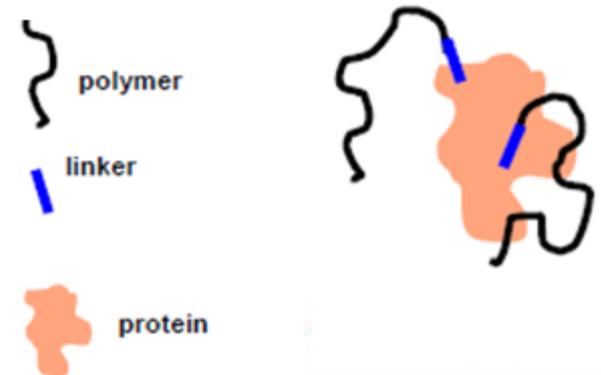
Release of mitomycin C (MMC) by hydrolysis of PHEG-tripeptide or tetrapeptide-MMC conjugates by tritosomes at pH 5.5 after 3 h

Tripeptide spacers	MMC release (%)	Tetrapeptide spacer	MMC release (%)
Gly-Phe-Leu	2.4	Gly-Gly-Phe-Leu	3.1
Gly-Gly-Leu	2.5	Gly-Phe-Leu-Gly	57.7
Gly-Phe-Phe	2.7	Gly-Phe-Ala-Leu	74.6
Gly-Phe-Gly	7.1	Ala-Leu-Ala-Leu	81.0



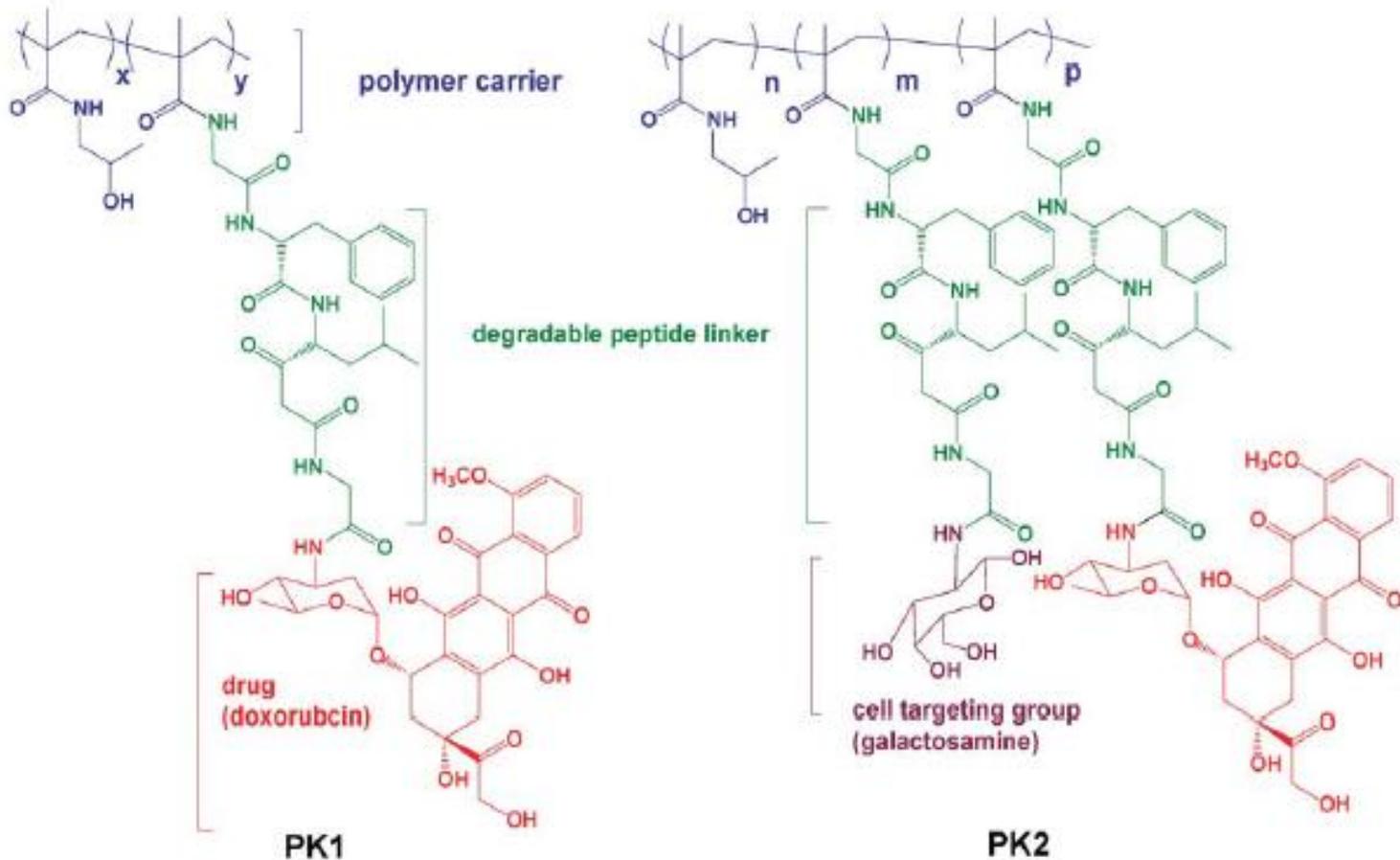
Molecola Ligando Specifica

Principio Attivo



Coniugati proteina-polimero

Coniugati farmaco-polimero



PK1 ha mostrato minor tossicità rispetto alla doxorubicina libera con discreta attività nel cancro alla mammella ed al polmone (effetto EPR)

PK2 ha mostrato minor tossicità rispetto alla doxorubicina libera e direzionamento specifico al fegato, via recettore per le asialoglicoproteine (targeting attivo). Utilizzato nel carcinoma epatico

Table 2 | **Polymer–drug conjugates**

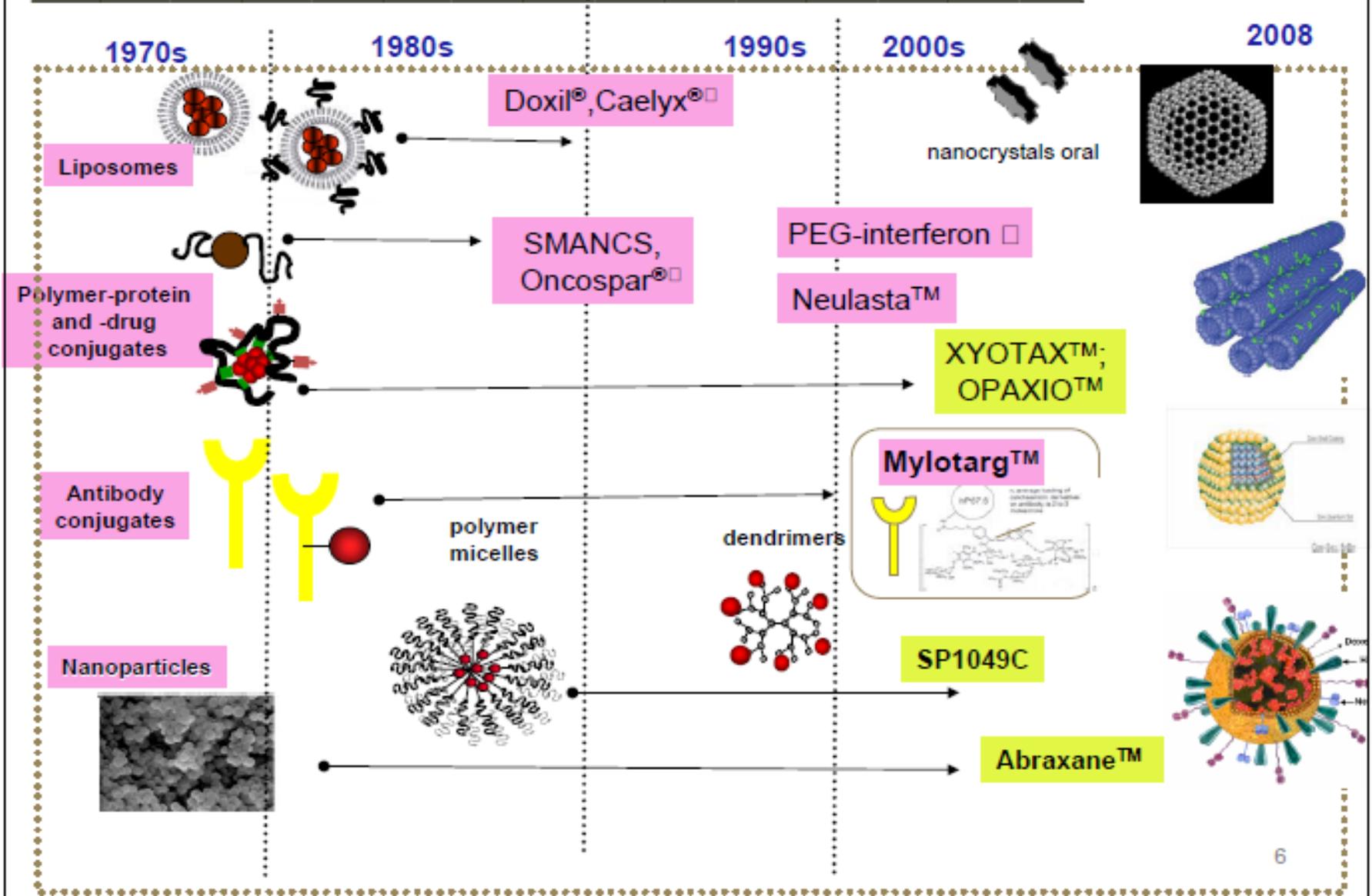
Compound	Name	Status	Indication	Refs
Polyglutamate–paclitaxel	CT-2103; Xyotax	Phase III	Various cancers, particularly non-small-cell lung cancer; ovarian cancer as a single agent or in combination therapy	107–111



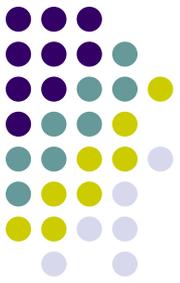
Table 1 Polymer–protein conjugates in clinical use or development					
Compound	Name	Status	Indication	Refs	
HPMA copolymer	SMANCS	Zinostatin Stimalmer	Market	Hepatocellular carcinoma	38,39
HPMA copolymer galactosaminyl	PEG–L-asparaginase	Oncaspar	Market	Acute lymphoblastic leukaemia	47
HPMA copolymer	PEG–GCSF	Neulasta	Market	Prevention of neutropaenia associated with cancer chemotherapy	58
HPMA copolymer	PEG–IFN α 2a	PEG-asys	Market	Hepatitis B and C	61
HPMA copolymer platinate			Phase I/II	Melanoma, chronic myeloid leukaemia and renal-cell carcinoma	
Dextran–d	PEG–IFN α 2b	PEG-Intron	Market	Hepatitis C	62
Modified d			Phase I/II	Melanoma, multiple myeloma and renal-cell carcinoma	
PEG–camp	PEG–arginine deiminase	ADI-PEG20	Phase I	Hepatocellular carcinoma	52
DACH, diam	PEG–glutaminase combined with a glutamine anti-metabolite 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON)	PEG–PGA and DON	Phase I/II	Various cancers	137
	PEG–D-amino acid oxidase (DAO) combined with the substrate DAO, D-proline	PEG–DAO and DAO, D-proline	Preclinical		138

GCSF, granulocyte colony-stimulating factor; IFN α , interferon- α ; PEG, polyethyleneglycol; SMANCS, styrene maleic anhydride-neocarzinostatin.

Evolution of Nanomedicines - drug targeting and controlled release



DRUG DELIVERY MARKET (dati 2008)



- ❖ Più di 200 Companies attive nel campo della nanomedicina
- ❖ Il mercato legato alla nanomedicina valeva circa 6.8 miliardi di dollari nel 2005. Considerando la rapida crescita del settore, si stima varrà circa 12 miliardo di dollari nel 2012.
- ❖ Più del 70% degli investimenti è nel drug delivery. Al 2008 c'erano sul mercato 23 formulazioni colloidali (in nanoscala) per il rilascio di farmaci.
- ❖ La nanotecnologia applicata agli agenti di contrasto vale circa 12 milioni di dollari.