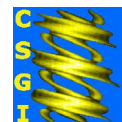




**PHARMA<sup>N</sup>ESS**  
NEUROSCIENZE



**Progetto cluster Biomedicina e Tecnologie per la Salute**

**Sottoprogetto Drug Delivery**

**Soggetti realizzatori:**

**Neuroscienze PharmaNess Scarl;**

**CSGI (Consorzio Interuniversitario dei Sistemi a Grande Interfase) –  
Università di Cagliari;**

**Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico dell'Università di Cagliari**

**ALLEGATO**

**DOCUMENTO 2.2**

Analisi tecnico/scientifica del settore di riferimento

**PARTE A**

**DELIVERY DI PEPTIDI E PROTEINE**

## 1. Introduzione

La comprensione del ruolo centrale di proteine e peptidi nella fisiologia e nella terapia di molte patologie nonché l'uso consolidato della tecnologia del DNA ricombinante ha contribuito allo sviluppo di nuove specialità medicinali a base di molecole peptidiche o peptido simili [1]. Negli ultimi venti anni, i prodotti biotecnologici sono divenuti una nuova ed estremamente importante classe di agenti terapeutici. In linea di massima attualmente 500 prodotti biofarmaceutici si trovano in diversi stadi di valutazione della sperimentazione clinica. L'acquisizione, poi, di più approfondite conoscenze riguardo al ruolo di alcuni geni in determinate patologie ha spinto le maggiori compagnie farmaceutiche a focalizzare la ricerca scientifica sui potenziali medicinali a base di proteine per il trattamento di malattie quali i tumori, i disordini autoimmuni, le infezioni, le infiammazioni e i disturbi cardiovascolari [2] e sull'ottimizzazione di terapie estremamente specifiche ed efficaci in grado di bloccare o modulare direttamente l'espressione di alcune proteine.

Nel 2004 sono stati messi in commercio più di 100 prodotti definiti New molecular entities (NME) [3-4], prodotti biotecnologici, che costituiscono circa il 25% delle nuove new drug applications (NDA). Il grande interesse di molte compagnie farmaceutiche, che dedicano la loro ricerca alla scoperta e sviluppo di proteine ricombinanti [5], ha permesso di incrementare notevolmente il numero di macromolecole NMEs in fase di sperimentazione ed è testimoniato dall'introduzione di forme alternative di delivery per l'ormone della crescita, per gli analoghi della somatostatina e dell'ormone rilasciante l'ormone luteinizzante, formulati per garantire un rilascio prolungato nel tempo del principio attivo [6-8].

Sebbene i farmaci biotecnologici si siano rivelati, oltre che un successo in termini economici, anche un importante fattore per il trattamento di numerose patologie per le quali non erano disponibili farmaci efficaci, il loro impiego terapeutico, lo sviluppo di più sofisticati sistemi di delivery e la produzione su larga scala per questa classe di agenti terapeutici rimane una sfida notevole principalmente a causa di una serie di problemi intrinseci alla struttura ed alle proprietà chimico-fisiche di questi prodotti rispetto ai farmaci convenzionali. Queste proprietà includono il peso molecolare elevato, la bassa solubilità, la necessità di meccanismi specifici per il trasporto attraverso le membrane biologiche, la suscettibilità alla degradazione enzimatica, la rapida clearance epatica e/o renale e la conseguente breve emivita circolante, curve dose/risposta talvolta insolite, l'immunogenicità con capacità di stimolare in una parte dei soggetti trattati la formazione di anticorpi neutralizzanti, la generale tendenza dei peptidi ad andare incontro ad aggregazione, adsorbimento e denaturazione.

Questa situazione ha stimolato una intensa attività di ricerca a livello internazionale con l'obiettivo di realizzare appropriati sistemi di veicolazione e rilascio (drug delivery systems). Due importanti aspetti del rilascio dei farmaci sono la via e la modalità di somministrazione. La via orale è senza dubbio la più conveniente e popolare, tuttavia ad eccezione di poche molecole cicliche con basso peso molecolare, la maggior parte delle proteine presenta attività molto bassa per via orale. Questo è principalmente dovuto alla degradazione da parte di enzimi proteolitici nel tratto gastrointestinale e alla scarsa permeabilità della mucosa intestinale nei confronti di molecole di elevato peso molecolare. Conseguentemente la maggior parte dei farmaci di natura proteica sono somministrati per via parenterale: endovenosa, intramuscolare o sottocutanea. Si tratta di una via di somministrazione scarsamente accettata dai pazienti eccetto che per le terapie salvavita. Per cercare di risolvere questo problema, si può procedere alla somministrazione usando vie alternative come quella nasale, polmonare, rettale, vaginale, transdermica ed oftalmica. Tuttavia in assenza di adeguati promotori, la biodisponibilità di proteine e peptidi attraverso queste vie è di gran lunga inferiore alla via parenterale, come conseguenza di una scarsa permeabilità e/o processi metabolici a livello del sito di assorbimento. Sebbene queste vie di somministrazione abbiano già mostrato la loro potenzialità per la somministrazione di farmaci peptidici, attualmente la ricerca è orientata soprattutto al miglioramento delle formulazioni somministrate per via parenterale.

Le proteine quindi vengono generalmente somministrate per via iniettiva e una volta entrate in circolo, la loro efficacia e durata d'azione sono principalmente definite dai parametri farmacocinetici. Poiché generalmente la rapida scomparsa dalla circolazione (clearance) limita l'efficacia delle proteine terapeutiche, in molti laboratori sono in corso ricerche rivolte a modificare il comportamento farmacocinetico delle proteine con l'obiettivo di ridurre la velocità di eliminazione per prolungarne la durata d'azione, ridurre la frequenza delle iniezioni e migliorare gli aspetti relativi alla *safety* immunotossicologica.

Per ridurre la clearance, incrementare la disponibilità sistemica, diminuire la comparsa di effetti collaterali o migliorare le modalità di somministrazione delle proteine terapeutiche, sono stati proposti approcci diversi che comprendono essenzialmente la modifica chimica delle proteine e la loro formulazione in sistemi di delivery iniettabili ed impiantabili.

In molti casi il raggiungimento del sito bersaglio è impedito da barriere biologiche, come la barriera ematoencefalica, costituita da "tight junctions" all'interno dei capillari cerebrali che eliminano i normali percorsi para o transcellulari per la diffusione di soluti dal sangue agli spazi interstiziali. Per superare questo ostacolo la ricerca è orientata verso la formulazione di sistemi vescicolari e nanoparticellari, opportunamente funzionalizzati che permettano la veicolazione del

farmaco al SNC, grazie al legame tra il farmaco proteico e un vettore endogeno e sfruttando quindi il trasporto mediato da recettore.

È possibile inoltre realizzare sistemi a rilascio controllato nel tempo con efficacia prolungata per migliorare la compliance di pazienti sottoposti a trattamenti cronici o a lungo termine.

Negli anni recenti sono stati fatti sforzi immensi per migliorare il delivery di proteine e peptidi.

La letteratura cita numerosi reviews sui vari aspetti del delivery delle proteine e dei peptidi attraverso le varie strade e usando varie strategie [9-14].

## **2. Via di somministrazione parenterale**

La vie di somministrazione parenterale più comunemente usate sono l'intravenosa (I.V.), l'intramuscolare (I.M.) e la sottocutanea (S.C). La somministrazione endovenosa garantisce la disponibilità totale sistemica e una rapida insorgenza d'azione, desiderabile per certi farmaci quali la streptochinasi. Esempi di proteine/peptidi somministrati attraverso la via parenterale sono riportati in tabella 1.

Come sopra ricordato le proteine presentano diversi limiti intrinseci. Esse infatti, hanno bassa emivita (dovuta a degradazione da parte di enzimi proteolitici, neutralizzazione attraverso anticorpi e rapida clearance renale), elevata distribuzione nei tessuti, potenziale immunogenicità e pertanto necessitano di somministrazioni frequenti. In quest'ultimo caso, oltre ad un innalzamento dei costi globali del trattamento terapeutico, il regime di dosaggio si complica con conseguente riduzione della *compliance* del paziente che porta alla riduzione dell'efficacia del trattamento.

Le strade principalmente seguite per ovviare a questi inconvenienti sono state:

1. Modificazione chimica delle macromolecole per incrementare la stabilità *in vivo* ed *in vitro* e ridurre la clearance. La peghilazione, la sostituzione di amminoacidi, la lipidizzazione reversibile sono alcune delle tecniche studiate.
2. Formulazione di sistemi di delivery di proteine e peptidi impiantabili o iniettabili per il rilascio prolungato delle macromolecole per un periodo di diversi giorni, settimane o addirittura mesi.

**Tabella 1. Esempi di Proteine e Peptidi commerciali somministrati per via Parenterale [15]**

Prodotto	Principio attivo	Categoria terapeutica/ Indicazione	Vendite 2005* (milioni di \$)	Via di somministrazione*	Dose e Regime*
Aranesp®	Darbepetin $\alpha$	Anemia	2104	I.V./S.C.	0, 045-0,5 mcg/Kg; Una volta alla settimana
Epogen®	Eritropietina	Anemia	2455	I.V./S.C.	50-100 unità/Kg E volte alla settimana
Neupogen®	Filgrastim	G-CSF umano	805	I.V. Infusione S.C. (Bolo)	5mcg/Kg/al giorno per settimane
Neulasta®	Perfilgrastim	Infezioni	1900	S.C.	6 mg per ciclo
Enbrel®	Etnercept	Artrite reumatoide	2470	I.V./S.C.	25mg. Due volte in una settimana
Rituxan®	Rituximab	Limona follicolare	1831	I.V. Infusione	375mg /m <sup>2</sup> Una volta a settimana
Avastin®	Bevacizumab	Sclerosi Multipla	1133	I.V. Infusione	5 mg/kg Una volta ogni due settimane
Herceptin®	Trastuzumab	Tumore al seno metastatico	747	I.V. Infusione	2-4 mg/kg una volta a settimana
Procrit®	Epoietin $\alpha$	Anemia	3984	I.V./S.C.	50-100 unità/Kg Due volte alla settimana
Avonex®	Interferon $\beta$ -a	Sclerosi multipla	1188	I.M.	30 mcg/ Una volta a settimana
Remicade®	Anticorpi monoclonali IgG1	Artrite reumatoide Malattia di Crohn	1729	I.V. Infusione	3-10 mg/Kg una volta in 2-4 settimane
Novolin®	Insulina umana	Diabete	1829	Iniezione S.C.	50-1000 unità al giorno; 1-3 somministrazioni al giorno
Humulin®	Insulina umana	Diabete	1004-7	Iniezione S.C.	

## 2.1 Modificazione chimica di Proteine e Peptidi terapeutici

### 2.1.1. Peghilazione

La modificazione chimica di peptidi e proteine che ha portato alla maggior parte delle soluzioni potenziali nei problemi di delivery di queste molecole è la peghilazione, processo di modificazione di una molecola, proteica o non, attraverso il legame con una o più molecole di polietilenglicole. I polietilenglicoli (PEG) sono polimeri semplici, altamente solubili in acqua, non tossici, privi di potere immunogeno ed antigenico, facilmente rimovibili dall'organismo. I PEG inoltre sono approvati dalla FDA per la somministrazione umana per *os*, iniezione e applicazione topica [16].

Il processo di peghilazione più comune di una proteina consiste nell'attivazione del PEG con gruppi funzionali appropriati per la reazione con i gruppi terminali -NH, -SH, -COOH delle proteine [17]. Sono sufficienti PEG di PM di 40 50 KDaltons per ridurre l'escrezione renale, aumentare i tempi di circolazione e ridurre la degradazione del farmaco proteico.

La peghilazione può essere quindi un metodo per aumentare la durata d'azione delle proteine e peptidi nell'organismo da alcuni minuti ad ore o giorni a seconda delle molecole di PEG utilizzate.

La dimensione, il peso, la forma ed il tipo di legame utilizzato per connettere il PEG alle molecole determinano l'impatto della peghilazione [18] su

- Ritardato assorbimento
- Ridotto volume di distribuzione
- Riduzione degradazione proteolitica
- Incremento del tempo di circolazione
- Lenta clearance renale

Fra i primi farmaci approvati nel lontano 1990 ricordiamo il PEGaspargase per la leucemia e il PEGademase per l'immunodeficienza severa combinata.

Attualmente sono commercializzati diversi prodotti a base di proteine peghilate, mentre alcuni di essi sono in fase avanzata di sviluppo. Alcuni dei prodotti commercializzati sono elencati in tabella 2.

**Tabella 2. Esempi di alcuni prodotti commerciali a base di proteine e peptidi peghilati[15]**

Nome commerciale	Principio attivo	Indicazione	Via e frequenza di somministrazione
Pegasis®	Peginterferon- $\alpha$ 2a	Cirrosi in seguito ad epatite	S.C. una volta alla settimana
PEG-Intron®	Peginterferon- $\alpha$ 2b	Epatite C cronica <i>studi clinici per cancro, sclerosi multipla, HIV/AIDS</i>	S.C. una volta alla settimana
Somavert®	Pegvisomant	Acromegalia	S.C. una volta al giorno
Neulasta®	Pegfilgstrim	Infezione da neutropenia febbrile	S.C. una volta per ciclo di chemioterapia
Adagen®	Pegademase bovina	Sindrome da immunodeficienza severa combinata	I.M. una volta alla settimana
Oncaspar®	PEG-L-asparaginase	Leucemia acuta linfoblastica	I.M. o I.V. una volta ogni 2 settimane
Aranesp®	PEG-darpoietin- $\alpha$	Anemia	I.V. o S.C. una volta alla settimana
Pegaptanib, Macugen™ (con oligonucleotidi)	PEG-anti- VEGF aptamero	Degenerazione maculare	Non riportata

Diversi studi preclinici hanno mostrato il miglioramento della stabilità *in vitro* ed *in vivo* così come una prolungata emivita *in vivo* di derivati proteici peghilati. In particolare, un derivato ramificato del PEG4000 con l'interferone  $\alpha$ 2b (IFN- $\alpha$ 2b) ha migliorato sia la resistenza alla degradazione sia la stabilità termica dell'IFN- $\alpha$ 2b [19]. L'emivita plasmatica è aumentata di 330 volte, mentre il tempo di permanenza è superiore di 708 volte rispetto all'IFN- $\alpha$ 2b non peghilato.

Il processo di peghilazione dell'Octreotide al N-terminale mediante la succinimidilbutirraldeide-mPEG produce un coniugato che è biologicamente attivo e resistente all'acilazione ad opera del PLGA. Questo prodotto pertanto viene considerato un valido candidato per la formulazione della somatostatina in microsfele [20].

In un altro studio la peghilazione della superossido dismutasi con un PEG di PM 72000 ha aumentato di 450 volte l'emivita in vivo del farmaco [21].

L'Interferone alfa-2a (Roferon®) di Hoffman- La Roche è stato approvato dalla FDA nel 1984 per l'uso nell'epatite C cronica e nella leucemia a cellule capellute mediante somministrazioni sottocutanee da ripetersi 3 volte alla settimana per un periodo di 11-12 mesi [15]. Nel 2002 è stata lanciata una seconda generazione di interferone coniugato con catene di PEG ramificato (PM 43 KDaltons) noto come Pegasis® (Interferone alfa-2a peghilato) che ha mostrato migliori caratteristiche nel trattamento dell'epatite C rispetto all'interferone non modificato utilizzato fino a quella data. In alcuni modelli animali il processo di peghilazione dell'interferone ha infatti portato all'incremento dell'attività contro il virus superiore da 12 a 135

volte e ad un'efficacia di ben 18 volte superiore nei confronti delle cellule tumorali. La dose di somministrazione dell'interferone peghilato è di 180 mcg una volta alla settimana per 48-52 settimane. È da sottolineare l'aumento dell'emivita del'interferone che nel Pegasis<sup>®</sup> è di 80 ore contro le 5 del Roferon A<sup>®</sup>

Il Pegasis<sup>®</sup> ha mostrato un'efficacia clinica di gran lunga superiore al Roferon A<sup>®</sup> come conseguenza del rilascio controllato del farmaco che determina livelli sistemici costanti di interferon alfa-2a. Un ulteriore vantaggio è il miglioramento della *compliance* del paziente per effetto di una sola somministrazione alla settimana contro le tre del Roferon A<sup>®</sup>.

Queste migliori performances hanno portato ad un'impennata delle vendite dal 2002 al 2003 di circa il 1450% e le vendite del Pegasis<sup>®</sup> nel 2005 negli USA sono state pari a 620 milioni di dollari.

### 2.1.2 Sostituzione di amminoacidi

Un altro approccio per migliorare le prestazioni delle proteine è dato dalla sostituzione di uno o alcuni amminoacidi della struttura primaria della proteina terapeutica con altri amminoacidi che non alterano l'attività biologica della molecola.

La sostituzione amminoacidica è stata applicata con successo all'insulina: la tabella 3 mostra alcuni esempi di sostituzioni amminoacidiche che possono essere condotte su questa molecola e gli effetti che ne derivano.

**Tabella 3. Sostituzioni amminoacidiche nell'insulina e farmacodinamica**

Tipo di Insulina	Insorgenza d'azione (h)	Durata (h)	Posizione A-21	Posizione B-28	Posizione B-29	Posizione B31-32
Regolare	0,5	2-4	Asparagine	Prolina	Lisina	
LysPro	0,25	0,5-1,5	Asparagine	Lisina	Prolina	
Aspart	0,25	0,5-1,5	Asparagine	Ac.Aspartico	Lisina	
Glargine	2-4	24	Glycine	Prolina	Lisina	Arginina-Arginina

Come si vede dalla tabella, a seconda del sito di sostituzione, si può ottenere un'insulina ad azione rapida o lenta. L'insulina Glargine, prodotta dall'Aventis, è un analogo ricombinante dell'insulina con un'azione che si protrae per 24 ore [22]. È caratterizzata dal fatto che nella catena A in posizione 21 l'asparagina è stata sostituita con la glicina, mentre al C-terminale della catena B sono state introdotte due molecole di arginina. Il Glargine è caratterizzato da bassa



solubilità a pH fisiologico, mentre è solubile a pH 4. Dopo iniezione sottocutanea, l'insulina in soluzione precipita e produce un profilo di rilascio relativamente costante per 24 h [23].

### 2.1.3 Lipidizzazione

È un efficace accorgimento per incrementare la stabilità e prolungare l'emivita dei peptidi attraverso il legame ammidico tra il gruppo carbossilico di un acido grasso ed il gruppo amminico del residuo N-terminale del peptide. Tale modifica spesso però compromette la bioattività perchè può causare un'alterazione della conformazione che riduce l'affinità del peptide per il recettore.

Tuttavia, l'octreotide è stato modificato usando una tecnica di lipidizzazione acquosa reversibile per il miglioramento dell'effetto farmacologico e per aumentare l'emivita plasmatica, per un maggiore potenziale terapeutico nel trattamento dei tumori al fegato [24].

Diverse altre proteine come l'analogo della somatostatina [25-26], la desmopressina [27], la calcitonina di salmone [28] sono stati lipidizzati per migliorare la loro emivita biologica.

## 2.2 Delivery controllato

Per migliorare l'efficacia delle proteine e superare i problemi di *compliance* del paziente, si dovrebbero utilizzare sistemi iniettabili o impiantabili che garantiscano il rilascio prolungato delle proteine terapeutiche per periodi variabili da una settimana fino a diversi mesi. Nonostante siano stati sviluppati numerosi sistemi di delivery controllato per il rilascio prolungato di molecole bioattive, vi sono ancora alcuni importanti problemi da risolvere. Un sistema ideale di delivery dovrebbe non solo proteggere la proteina dalla degradazione *in vivo*, ma controllarne anche la velocità di rilascio in modo che possa essere adattato per ogni singolo farmaco e ogni particolare applicazione.

I sistemi a rilascio prolungato sono progettati per estendere gli effetti del farmaco e quindi permettere di avere vantaggi quali:

- riduzione della frequenza di dosaggio
- eliminazione o riduzione degli effetti indesiderati
- riduzione della tossicità locale e del dolore al momento dell'iniezione
- aumento della *compliance* del paziente
- minori costi rispetto alla formulazione convenzionale.

Lo sviluppo di questi sistemi a rilascio modificato per il delivery di proteine e peptidi richiede il superamento di ulteriori problemi. Infatti il sistema, in questi casi, deve garantire:

- il mantenimento dell'integrità del farmaco durante le fasi di produzione e conservazione per preservarne stabilità e bioattività,
- elevata incorporazione del farmaco
- scelta di polimeri sicuri e non tossici
- controllo del grado di rilascio del farmaco senza “burst effect” o effetto “dose dumping” [29].

Alcuni degli approcci per il rilascio controllato delle proteine attraverso la via parenterale includono iniezioni di depot polimerici [30-31], iniezioni oleose, liposomi, nanoparticelle [32] ed impianti [33].

### **2.2.1. Sistemi iniettabili depot**

Fra i vari approcci per il delivery parenterale di macromolecole, i sistemi depot iniettabili (che comprendono microsfele, nanosfele, liposomi, soluzioni/gel polimerici) sono quelli che hanno avuto il maggior successo dal punto di vista commerciale.

Alcuni di questi prodotti parenterali commercializzati sono formulazioni polimeriche di microsfele che possono essere iniettate per via intramuscolare e sottocutanea per avere effetti sistemici oppure in un sito specifico dell'organismo per un trattamento localizzato.

Le microsfele sono sistemi polimerici rigidi, con dimensioni micrometriche (3-800  $\mu\text{m}$ ). Le tecniche usate per la loro preparazione variano in funzione degli obiettivi che si intende raggiungere e si basano sia su processi chimico-fisici sia meccanici che sulla combinazione dei due. Tra i processi chimico-fisici sono compresi la coacervazione di fase, la polimerizzazione interfacciale, la reticolazione in sospensione, mentre tra quelli meccanici i più comuni sono lo spray drying e il letto fluido [34-37].

La scelta del procedimento da impiegare dipende da diversi fattori, che modulano anche il rilascio della proteina dal sistema [38], e che comprendono:

- tipo di polimero
- proprietà chimico-fisiche della proteina o del peptide
- interazione del polimero con la proteina
- concentrazione della proteina.

Uno dei problemi nella formulazione di microsfele veicolanti proteine è il mantenimento della stabilità della proteina durante la fabbricazione e la conservazione. Le proteine incapsulate nelle microsfele infatti sono suscettibili di denaturazione, degradazione, aggregazione e ossidazione[39]. Un ulteriore svantaggio di queste formulazioni è lo scarso potere di loading.

Anche se il primo rapporto di rilascio prolungato di una proteina microincapsulata risale a più di 20 anni fa, l'instabilità della proteina in queste forme farmaceutiche ne ha prevenuto il loro uso clinico. Ai progressi nella stabilizzazione delle proteine, comunque, ha fatto seguito lo sviluppo di forme di rilascio prolungato di diverse proteine terapeutiche [5]. In particolare, il Lupron Depot® (leuprolide acetato) è stato il primo depot introdotto sul mercato.

Nel 2000 sono state messe in commercio le prime formulazioni di microsfele a rilascio prolungato di ormone della crescita ricombinante (rhGH). Una singola iniezione di questa formulazione garantisce elevate concentrazioni plasmatiche di rhGH per periodi superiori a un mese [30]. Diverse altre tecnologie di incapsulazione brevettate come il ProLease®[40], PolyShell®[41] e tecnologie dei fluidi supercritici [42-44] sono state utilizzate per produrre microsfele biodegradabili.

Oltre alle microsfele sono stati sviluppati altri sistemi per l'impianto sottocutaneo. In particolare, l'Astra Zeneca ha sviluppato lo Zoladex®, sistema matriciale biodegradabile a base di polilattide-co-glicolide (PLGA) per il rilascio prolungato (28 giorni) di goserelin acetato. Il dispositivo, di forma cilindrica con 1 mm di diametro, è dispensato all'interno di una siringa specializzata per l'iniezione sottocutanea [45].

Altri sistemi depot, che offrono alcuni vantaggi rispetto alle microsfele, utilizzano soluzioni capaci di formare in situ gel o depot polimerici. Un esempio di questi sistemi è dato dall'Atrigel®, dispositivo realizzato utilizzando polimeri biodegradabili dissolti in solventi organici biocompatibili quali il N-metil-2-pirrolidone [46], che dopo iniezione intramuscolare forma un sistema a rilascio prolungato. Questa tecnologia è stata usata per l'Eligard™, un prodotto per iniezione sottocutanea contenente leuprolide acetato, progettato per garantire il rilascio prolungato del farmaco per un periodo superiore a un mese.

Il sistema Saber™ è realizzato utilizzando il Saccarosio Acetato Isobutirato (SAIB) [47]. Dopo l'iniezione il solvente diffonde dal SAIB incrementandone la viscosità che controlla il rilascio della proteina dal gel.

Ascentra™ [48] è una tecnologia depot realizzata con polimeri termosensibili che utilizza il sistema di drug delivery MacroMed's ReGel®[49]. Il ReGel®, copolimero biodegradabile a tre blocchi formato da PLGA e PEG, è particolarmente adatto alla realizzazione di sistemi di veicolazione e rilascio delle proteine in quanto formulato utilizzando esclusivamente acqua. Immediatamente dopo l'iniezione ed in risposta alla temperatura corporea si forma un depot di gel insolubile, che rimane nel sito d'iniezione per 4 settimane. Il rilascio prolungato del farmaco incorporato è controllato dal suo processo di diffusione dal gel e dal grado di erosione del gel stesso. La biodegradazione del ReGel®, incomincia subito dopo l'esposizione all'ambiente

acquoso con i blocchi di PLGA che si degradano idroliticamente in lattato e glicolato, eliminati attraverso le normali vie metaboliche, mentre i blocchi di PEG sono escreti per via renale. La degradazione può avvenire in un periodo programmato variabile da 1 a 6 settimane.

ReGel® è stato studiato per il delivery di diverse proteine quali hGH, interleukina-2 e l'insulina [11]. Alcuni di questi sistemi depot usati in clinica sono elencati in tabella 4.

**Tabella 4. Esempi di prodotti commerciali depot parenterali**

Prodotto	Macromolecola	Casa farmaceutica	Via di somministrazione/ tecnologia
Lupron Depot®	Leuprolide acetato	TAP Pharmaceutical Products Inc	S.C./ Microsfere
Sandostatin LAR Depot®	Octreotide acetato	Novartis	I.M. / Microsfere
Trelstar™ Depot	Triptorelin pamoato	Pharmacia e Upjohn	I.M. / Microsfere
Nutropin®	Somatropin	Genentech	S.C. / Microsfere
Eligard®	Leuprolide acetato	Sanofi-Synthlabo Inc	S.C./Soluzione formante gel
Viadur®	Leuprolide acetato	Alza corporation	S.C./Impianto
Zoladex®	Goserelin acetato	AstraZeneca	S.C./Matrice, Impianto

Molti dei polimeri usati nel delivery di proteine per sistemi depot iniettabili sono biocompatibili e biodegradabili, con il conseguente vantaggio di essere degradati in molecole biologicamente accettabili, eliminate dall'organismo attraverso le comuni vie di metabolizzazione [50-52].

Fra i polimeri più studiati possiamo citare:

- Polilattidi (PLA)
- Poliglicolide (PLG)
- Poli(lattide-co-glicolide) (PLGA)
- Polianidridi
- Policianoacrilati
- Policaprolattone

Fra tutti i polimeri elencati sopra il PLA ed il PLGA ed i loro copolimeri sono quelli più riportati in letteratura. Tuttavia, è bene ricordare che è stato anche riportato che il PLGA può dare origine a reazioni di acilazione che dipendono dalla struttura primaria del peptide [53].

Sono in fase di studio avanzato altri polimeri biodegradabili per la possibile applicazione nel delivery delle proteine e peptidi, come riportato in tabella 5.

**Tabella 5. Esempi di polimeri in fase di studio per il delivery di proteine e peptidi [15]**

Polimero	Macromolecole	Note bibliografiche
Poli(lattide-co-glicolide) (PLGA)	Ormone della crescita, albumina serica	[30]
	bovina, TNF, Octreotide acetato, Somatostatina, Insulina, Leuprolide acetate	[33, 54-57]
		[58]
Polialchilcianoacrilato	Insulina, dalargin	[32,59-61]
Policaprolattone	Ormone della crescita	[62-64]
Polianidride	Insulina, Interleuchina 2	[65-66]

### 2.2.2 Sistemi impiantabili

Questi dispositivi, inseriti sottocute mediante piccoli interventi chirurgici, sono sistemi ideali per il rilascio controllato di farmaci per periodi superiori ai sei mesi. Si tratta in genere di sistemi *reservoir*.

La tecnologia d'impianto DUROS<sup>®</sup> dell'Alza è utilizzata nel sistema Viadur<sup>®</sup> contenente leupride acetato per il trattamento del tumore prostatico. Il Viadur<sup>®</sup> è un sistema osmotico che si è rivelato efficace nel ridurre i livelli di testosterone per un periodo di 12 mesi [67-69].

### 2.2.3 Sistemi lipidici per il delivery di proteine

Per la veicolazione delle proteine e dei peptidi è possibile utilizzare anche dei sistemi carrier realizzati con materiale lipidico a diversa polarità. Possiamo quindi comprendere in queste tipologie di delivery diversi sistemi colloidali quali in particolare liposomi, sistemi vescicolari fosfolipidici, e nanoparticelle lipidiche solide o SLN.

#### ***Sistemi vescicolari***

I liposomi, vescicole fosfolipidiche, sono stati largamente studiati per la veicolazione di diverse molecole per la loro capacità di veicolare farmaci con caratteristiche chimico-fisiche diverse, regolandone la velocità di cessione e per la proprietà di modificare la farmacocinetica dei farmaci veicolati. Inoltre hanno la capacità di proteggere il loro contenuto dall'azione

denaturante di enzimi e ambienti degradanti. Modificando opportunamente i liposomi è possibile realizzare dei sistemi a lunga circolazione: i liposomi stericamente stabilizzati, noti anche come liposomi stealth. Questi sono formulati legando covalentemente ai fosfolipidi polimeri idrofili a lunga catena come i PEG, in modo da formare un rivestimento superficiale che impedisca l'opsonizzazione e la successiva eliminazione dal circolo ematico ad opera del RES.

Esiste anche la possibilità di realizzare un targeting attivo, direzionando specificamente il liposoma verso il sito bersaglio manipolandone le caratteristiche superficiali, legandovi ad esempio idonei anticorpi o frammenti di essi per ottenere gli immunoliposomi che sfruttano l'interazione specifica tra l'anticorpo e il suo antigene espresso in superficie da un particolare tipo di cellula.

Le formulazioni liposomiali a lunga circolazione sono state studiate come sistemi di drug delivery e la letteratura suggerisce che tali formulazioni possano essere utilizzate anche per il prolungamento del tempo di circolazione di proteine e peptidi mediante coniugazione alla superficie dei liposomi. L'incremento dell'emivita può variare tra 2 e 150 volte e dipende dal rapporto proteina/lipide, dalle dimensioni liposomiali e dalla composizione lipidica dei liposomi [70].

Il limite della veicolazione in liposomi convenzionali è dato dalla scarsa capacità di loading di macromolecole idrosolubili. Per ovviare a questi problemi sono stati sviluppati sistemi di delivery multivescicolari come il DepoFoam™ (Skye Pharma) costituito da microscopiche particelle sferiche contenenti centinaia di cavità acquose multiple, non concentriche che incapsulano il farmaco idrofilo. Le singole cavità sono separate da membrane a doppio strato lipidico formate da lipidi sintetici analoghi a quelli naturali che consentono di ottenere un carrier biocompatibile e biodegradabile.

La velocità di rilascio del farmaco dalla formulazione DepoFoam™ è controllata dalla composizione lipidica, da quella acquosa e dai parametri di fabbricazione[71]. Le particelle DepoFoam™ sono costituite essenzialmente di soluzione acquosa di farmaco (oltre il 90% della formulazione) mentre la componente lipidica costituisce solo il 10 % della formulazione, dando luogo ad un alto "factor loading" di farmaco. Il DepoFoam™ è un sistema versatile, capace di fornire sia attività sistemica che locale ed è somministrabile attraverso svariate vie oltre a quella parenterale.

Formulazioni DepoFoam™ di proteine quali insulina, di peptidi come leuprolide, encefaline ed octreotide sono stati già sviluppati e caratterizzati. I dati mostrano che queste formulazioni hanno un'elevata efficienza di incapsulazione, basso contenuto di farmaco libero in

sospensione, solo minime modificazioni chimiche causate dal processo di formulazione, range dimensionale delle particelle molto ristretto, morfologia sferica [72].

Come potenziali carriers di proteine e peptidi sono state valutate anche delle microvescicole concentriche multilamellari denominate Spherulites™ aventi diametro compreso tra 0,1 e 10 µm. Le Spherulites™ presentano una struttura interna costituita di doppi strati sferici concentrici di acqua e molecole anfifiliche. Sono altamente stabili quando somministrate per via orale o iniettabile e possono essere fabbricate su scala industriale in maniera altamente riproducibile. Tale tecnologia è utilizzata anche nel mercato cosmetico e veterinario.

Nelle applicazioni farmaceutiche, le Spherulites sono state utilizzate per il delivery di vaccini, proteine e peptidi [73-76].

### ***Solid lipid nanoparticles (SLN)***

Questi sistemi presentano caratteristiche in comune sia con i liposomi che con le classiche nanoparticelle polimeriche. Le SLN sono infatti delle nanoparticelle costituite da lipidi solidi a temperatura ambiente.

I principali vantaggi delle SLN sono:

- possibilità di controllare la velocità di rilascio del farmaco e il direccionamento al sito d'azione;
- aumento della stabilità dei principi attivi;
- possibilità di incorporare sia farmaci idrofili che idrofobi;
- ridotta tossicità del carrier sia per la loro composizione che per la produzione priva di solventi organici;
- possibilità di passare facilmente alla produzione industriale su larga scala;
- facilità di liofilizzazione e sterilizzazione; quindi alta stabilità durante l'immagazzinamento.

Le SLN sono generalmente ottenute partendo semplicemente da lipidi solidi, tensioattivi e acqua. I lipidi più utilizzati sono i trigliceridi, i gliceridi parziali, gli acidi grassi, gli steroidi e le cere. Questo significa che è possibile preparare questi vettori colloidali mediante l'utilizzo di lipidi fisiologici riducendo il rischio di fenomeni di tossicità acuta o cronica.

Esistono diverse tecniche di preparazione delle SLN: alcune sono simili a quelle utilizzate per la preparazione delle classiche nanoparticelle polimeriche (nanoprecipitazione, emulsione semplice o doppia, diffusione/evaporazione del solvente), altre sono specifiche per le SLN (omogenizzazione a caldo o a freddo, fusione dei lipidi). Le SLN prodotte secondo la tecnologia Nanovector vengono ottenute da microemulsioni preparate a caldo.

L'obiettivo delle attuali linee di ricerca è quello di ottimizzare le principali tecniche di ottenimento delle SLN in modo da ottenere particelle di piccole dimensioni, le più omogenee possibili. Messa a punto la tecnica si può cercare di preparare delle particelle cariche positivamente, inserendo nella matrice lipidica lipidi cationici, in analogia con i liposomi. Le SLN cationiche presentano, infatti, diverse possibilità applicative, la più importante delle quali è sicuramente la terapia genica: il DNA, grazie alla sua carica negativa, dovrebbe potersi adsorbire sulla superficie delle SLN, come accade per i liposomi cationici. Rispetto ai liposomi, però, essendo le SLN dei sistemi a matrice si potrebbe cercare di inserire il DNA all'interno della matrice lipidica in modo da rendere l'interazione più stabile, quindi aumentare l'efficienza di transfezione del vettore.

Le SLN possono essere direzionate anche verso la barriera ematoencefalica e quindi utilizzate per il delivery di farmaci ai distretti cerebrali. Inoltre, come con i liposomi, si possono preparare SLN stericamente stabilizzate (SLN stealth) utilizzabili soprattutto per le somministrazioni per via endovenosa [77-79].

Alternativamente si potrebbero utilizzare le SLN per la veicolazione e il direccionamento di farmaci peptidici o proteici, anche di origine biotecnologica. Il problema principale per l'utilizzo in terapia delle proteine ricombinanti è, infatti, la loro biodisponibilità: il caricamento su vettori quali le SLN potrebbe risolvere tale problema. Ulteriori modifiche della superficie delle SLN, come l'inserimento del colesterolo, dell'acido ialuronico o della stearylammina, potrebbero venire sfruttate per ottimizzare il caricamento delle proteine o l'efficienza di transfezione del DNA.

Le SLN sono quindi vettori con grandi possibilità applicative, dal caricamento dei farmaci classici alla veicolazione di prodotti di origine biotecnologica, come il DNA o le proteine ricombinanti.

Per poter realizzare delle SLN veicolanti proteine devono essere affrontati diversi problemi di tipo tecnologico formulativo. In particolare i fattori che controllano l'incorporazione del farmaco sono principalmente [80]:

- solubilità del farmaco nella fase lipidica
- caratteristiche chimico fisiche della matrice lipidica solida
- polimorfismo del materiale lipidico.

Le molecole idrofobe possono essere incorporate facilmente in queste strutture lipidiche, mentre la natura idrofila di proteine e peptidi rende difficile il loro inserimento nella matrice lipofila delle SLN [81-82]. È necessario quindi sviluppare nuove metodiche di preparazione che



permettano la veicolazione anche di macromolecole idrofile ed anfipatiche, ad esempio favorendo la formazione di una struttura cristallina lipidica con delle imperfezioni e cavità che possano essere utilizzate come sede per l'intrappolamento del composto attivo.

Alternativamente si potrebbe sfruttare la miscela fisica di SLN e proteine che porterebbe all'adsorbimento delle macromolecole sulla superficie delle nanoparticelle [82].

La preparazione di questi sistemi richiede inoltre un'accurata conoscenza delle interazioni tra proteine e nanoparticelle, strettamente correlate al tipo di polimero utilizzato per la loro stabilizzazione [83].

Solo in questo modo sarà possibile realizzare sistemi ben tollerati per un rilascio controllato delle macromolecole proteiche.

### **2.3 Sistemi "Injection pen".**

Tutti i sistemi fin qui analizzati hanno in comune la necessità di essere somministrati con un'iniezione intramuscolare, endovenosa o sottocutanea. Non essendo questa via di somministrazione generalmente molto gradita dai pazienti, la ricerca si è orientata verso l'individuazione di nuove formulazioni per migliorare la compliance

Le principali ricerche si sono orientate soprattutto verso nuovi sistemi per la somministrazione sottocutanea di insulina e il risultato è stato l'arrivo in commercio dei cosiddetti sistemi "autoinjectors and injection pen" monodose o multidose. Questi sistemi hanno il merito di aver reso più facile la somministrazione di insulina anche in età pediatrica, di garantire l'accuratezza del dosaggio e ridurre sia il rischio di contaminazione che gli errori di somministrazione.

Attualmente nuovi studi sono volti all'applicazione di tali sistemi anche nella cura di altre malattie croniche quali l'artrite o la terapia ormone-sostitutiva.

Questi sistemi, molto simili ad una penna, sono costituiti da un alloggiamento per il deposito del farmaco (insulina), da un sistema di dosaggio, da un pulsante per il rilascio del farmaco e da un ago. Una volta inserito l'ago sotto cute, per effetto della pressione sul pulsante viene rilasciata la quantità di insulina prestabilita. Tali sistemi, complici anche i "pen designers", sono ben accetti al paziente favorendo pertanto la *compliance* e ormai più della metà dei pazienti diabetici Europei usa tali sistemi per la somministrazione di insulina [84].

### **3. Delivery orale di proteine**

Il grande traguardo da raggiungere nel delivery di proteine e peptidi è rappresentato dalla somministrazione per via orale, senza dubbio la via più conveniente e popolare. Pertanto

nell'ultima decade sono andate in crescendo le ricerche mirate a sviluppare strategie alternative e/o adatte ad incrementare la biodisponibilità orale delle proteine [85]. Tuttavia, la somministrazione orale di queste macromolecole terapeutiche è notoriamente limitata, come riportato in precedenza, dal loro elevato peso molecolare e dall'idrofilia, dalla loro suscettibilità a reazioni di degradazione per le condizioni di pH del tratto gastrointestinale (GI) e per l'attacco di enzimi proteolitici.

Per cercare di ridurre la degradazione enzimatica e promuovere l'assorbimento è possibile adottare diverse strategie che da sole e/o in combinazione permettano di incrementare la biodisponibilità sistemica:

- Tecniche volte a proteggere dall'azione degli enzimi o ad inibire gli enzimi stessi
- Modificazioni chimico-fisiche
- Uso di promotori di assorbimento
- Sistemi mucoadesivi
- Carriers colloidali

### ***Enzimi inibitori e tecniche di protezione dagli enzimi***

Gli inibitori enzimatici come l'aprotinina (inibitore di tripsina/chimotripsina), amastatina, bestatina, (inibitori delle aminopeptidasi) sono stati oggetto di numerosi studi che hanno evidenziato la loro efficacia nel preservare le molecole proteiche dal venire a contatto con il sistema enzimatico. Tuttavia questo approccio ha una limitata accettabilità pratica e commerciale in quanto la prolungata inattivazione enzimatica può provocare un incremento dell'attività enzimatica di ritorno, con effetti collaterali severi come intossicazione sistemica, disturbi nella digestione delle proteine alimentari, ipertrofia ed iperplasia del pancreas.

Inibitori enzimatici più deboli come l'acido etilendiaminotetracetico (EDTA), il Sodio Deossicolato (SDA) e la bacitracina sono stati utilizzati con successo per inibire la degradazione del LHRH nell'intestino tenue e ansa posteriore [86].

Una strategia alternativa più promettente è lo sviluppo di sistemi di "drug delivery" capaci di rilasciare il farmaco direttamente nella mucosa in determinati distretti dell'intestino: l'inibizione dell'enzima dovrebbe coincidere con la presenza del farmaco nel sito d'assorbimento.

Negli anni recenti, per generare tali tipi di sistemi, la ricerca si è focalizzata sulla immobilizzazione covalente di inibitori di proteasi su polimeri mucoadesivi usati come matrici carriers dei farmaci [87-89]. L'onnipresenza degli enzimi nel sistema gastroenterico non impedisce comunque assolutamente l'applicabilità della strategia dell'inibizione degli enzimi.

### ***Modificazioni chimiche***

Per garantire una maggiore resistenza delle proteine e dei peptidi nei confronti della degradazione enzimatica, è possibile sintetizzare dei profarmaci, modificando chimicamente le varie molecole mediante l'introduzione di gruppi N-alchilici, idrossilici, fenolici e tiolici in modo da favorire la permeabilità di membrana ed il profilo farmacocinetico [90]

In letteratura sono riportati diversi esempi di modificazioni chimiche diverse che hanno migliorato le prestazioni orali di varie molecole quali metaencefaline, leuencefaline, vasopressina ed insulina [91-98]. In particolare ricordiamo che la Nobex ha prodotto un coniugato dell'insulina con PEG e acidi grassi, attualmente in fase II di sperimentazione clinica negli USA, che ha mostrato un rapido assorbimento con una concentrazione massima dell'insulina entro i 30 minuti post-dose e buona riproducibilità della linearità dose-risposta

Infine è opportuno ricordare che è possibile modificare solo poche macromolecole che non subiscono alterazione dell'attività biologica in seguito all'introduzione di nuovi gruppi funzionali e che esistono comunque problemi legati alla purificazione del prodotto finito ed ai costi della sintesi del prodotto su larga scala.

### ***Piccole molecole carriers***

Sono state descritte in letteratura diverse piccole molecole carrier capaci di legarsi al principio attivo mediante deboli interazioni, in genere di natura elettrostatica, che portano alla formazione di complessi che fungono sia da profarmaco che da promotore dell'assorbimento. Dopo l'assorbimento il complesso viene scisso e il farmaco viene liberato nella sua forma attiva [99].

Il sodio-N-[8(2-idrossibenzoil)amino] caprilato (SNAC) e altre piccole molecole simili sono state sviluppate da Emisphere Technologies, Inc. Lo SNAC incrementa di 10 volte la permeabilità dell'insulina nelle cellule CaCo-2 e sembra avere un ruolo molto importante nella protezione dell'insulina stessa dagli enzimi proteolitici. La capacità dello SNAC di promuovere l'assorbimento in seguito a somministrazione per via orale è stato studiato utilizzando come farmaco modello l'eparina [100].

Approcci simili, basati sulla tecnologia Emisphere® sono stati applicati anche ad altri prodotti biofarmaceutici quali calcitonina, paratiroide, rhGH [101].

### ***Promotori di assorbimento***

I promotori d'assorbimento comprendono varie classi di molecole che hanno in comune la capacità di favorire la penetrazione e/o il trasporto delle molecole attraverso le membrane

biologiche [102]. Molte di queste sostanze, come i sali biliari, agiscono alterando la fluidità delle mucose e delle membrane [103-104].

L'effetto di diversi promotori di assorbimento è stato studiato per insulina e desmopressina [105-106].

Anche le microemulsioni sono state studiate come promotori di assorbimento per la veicolazione della ciclosporina, peptide atipico dotato di una buona stabilità proteolitica ma con scarso assorbimento in seguito a somministrazione orale. Il Neoral<sup>®</sup>, microemulsione incorporante la ciclosporina, ha permesso di aumentare significativamente la biodisponibilità orale del farmaco rispetto ad una sua soluzione alcolica [107-109].

Hydroance<sup>™</sup> [110], un brevetto tecnologico della Lipocine Inc., è stata sviluppata per promuovere l'assorbimento orale di piccole molecole polari e macromolecole. Studi preclinici nei ratti hanno mostrato un aumento nell'assorbimento orale di eparina a basso peso molecolare (LMWH) quando formulato con Hydroance<sup>™</sup> rispetto all'eparina nativa, con livelli ematici di eparina superiori di ben 25 volte.

Anche alcune sostanze polimeriche possono fungere da promotori per la loro capacità di alterare l'integrità delle tight junctions in seguito a chelazione degli ioni Ca<sup>++</sup>, determinando quindi un incremento della biodisponibilità di molte macromolecole [111-112].

I polimeri tiolici o tiomeri come l'acido poliacrilico-cisteina o il chitosano-4-tio-butilamidina (Chitosan-TBA) in combinazione con il glutatione ridotto (GSH) hanno aumentato l'uptake dal tratto GI di macromolecole idrofile [113]. Questa attività sarebbe dovuta alla presenza del gruppo tiolico che è in grado di inibire la tirosina fosfatasi, responsabile della chiusura delle tight junctions [114].

L'impiego dei promotori d'assorbimento nel delivery delle macromolecole è tuttavia limitato a causa dei rischi connessi alle modificazioni della funzionalità delle membrane biologiche da essi prodotti, che potrebbero permettere un incremento dell'assorbimento anche di sostanze tossiche non endogene e determinare effetti localizzati come l'irritazione della mucosa, cambiamenti nella struttura intestinale e interferenze nei meccanismi regolari digestivi.

### ***Sistemi Bioadesivi o mucoadesivi.***

Con il termine bioadesione si intende l'instaurarsi per un periodo di tempo prolungato di un intimo contatto tra un preparato farmaceutico ed un substrato biologico attraverso la formazione di legami chimici e fisici tra le due superfici. Si parla di mucoadesione quando l'interazione bioadesiva viene ad instaurarsi tra la forma farmaceutica ed il muco che riveste gran parte dei tessuti.

Per la formulazione di sistemi mucoadesivi si utilizzano polimeri idrofili (carbopol, pectine, alginati, derivati semisintetici della cellulosa) caratterizzati da favorevoli proprietà per la veicolazione delle molecole biologicamente attive.

I risultati ottenuti negli ultimi dieci anni per la somministrazione orale sono stati però piuttosto deludenti. Le difficoltà incontrate sono soprattutto dovute alle peculiarità del muco del tratto GI. Ciononostante, la ricerca in quest'area ha posto in luce le potenzialità dell'acido poliacrilico quale potente inibitore degli enzimi proteolitici. C'è anche un'evidenza crescente che l'interazione tra i vari tipi di polimeri bio(mucoadesivi) e le cellule epiteliali ha una diretta influenza sulla permeabilità degli epitelii mucosali [115].

Anche in questo campo, sono stati condotti numerosi studi per la veicolazione dell'insulina utilizzando *patches* intestinali a base di Carbopol 934® [116] o sistemi microparticellari di acido polimetacrilico reticolato e PEG che permettono effetti ipoglicemici prolungati nel ratto. L'assorbimento è favorito dalle proprietà di complessazione pH-dipendenti, l'inibizione degli enzimi e dalle proprietà mucoadesive del polimero[117].

Per superare i problemi relativi alle caratteristiche del muco del tratto GI e per permettere una adesione durevole e più lunga all'interno del lume GI, la bioadesione probabilmente potrebbe essere realizzata usando molecole capaci di legarsi specificamente alla superficie cellulare con interazioni ligando-recettore [118-120].

### ***Sistemi carriers particellari***

I carriers colloidali come microparticelle, nanoparticelle, liposomi e SLN vengono considerate un approccio interessante per il delivery di proteine e peptidi, fondamentalmente per l'assorbimento attraverso la via endocitica intracellulare e per l'immunizzazione della mucosa orale.

La letteratura mette in evidenza che particelle di diametro inferiore ai 100 nm hanno un elevato uptake (da 10 a 150 volte più grande) rispetto alle particelle più grandi e pertanto esse sono state largamente studiate per il delivery orale di peptidi [121-123]. Due decenni di ricerche hanno dimostrato che l'uptake delle nanoparticelle nei tessuti GI è una realtà ed il delivery orale di proteine, peptidi, polipeptidi e nucleotidi associati ad un carrier colloidale può diventare fattibile purchè si rispettino alcune condizioni. Le proprietà delle nanoparticelle, quali dimensioni, carica di superficie e idrofobicità, ne influenzano l'assorbimento intestinale. Le nanoparticelle più piccole mostrano un uptake superiore rispetto a quelle di maggiori dimensioni attraverso la via follicolare associata agli epitelii e gli enterociti [124].

Nanoparticelle formate da nuovi copolimeri a catene pendenti, aventi uno scheletro idrofobico di polistirene e catene laterali idrofile poliviniliche, sono state usate come carrier per farmaci peptidici [125].

L'insulina caricata in particelle di polialchilcianoacrilato è in grado di ridurre i livelli ematici di glucosio del 50-60% dopo singola somministrazione orale, mentre altre macromolecole come LHRH,  $\beta$  galattoside, il toxoide difterico orale e l'ovoalbumina, hanno mostrato un aumentato uptake nel tratto GI [126].

Nanoparticelle biodegradabili di poli(isobutilcianoacrilato) con dimensioni di circa 100 nm sono state usate per la veicolazione dell'insulina con un'efficienza di incorporazione di circa l'80%[127]. Il rilascio dal polimero è pH dipendente: è minimo in ambiente acido e aumenta all'aumentare del pH.

Microparticelle preparate con polimeri biodegradabili e biocompatibili, PLGA o PLG, sono utili per la veicolazione di molecole antigeniche e quindi adatte per la realizzazione di vaccini in singola dose[128].

Inoltre, sono stati studiati diversi sistemi realizzati con polimeri biodegradabili quali PLGA, polianidridi, polimetil metacrilato, polialchilcianoacrilati, alginato e destrano, in cui il rilascio del farmaco è controllato dalla degradazione del polimero[129].

### ***Liposomi e sistemi lipidici***

I liposomi sono sistemi vescicolari adatti per la veicolazione di molecole idrofile, lipofile ed anfipatiche. Le molecole incorporate sono fisicamente separate dall'ambiente circostante finché il liposoma rimane intatto, e dunque possono essere sfruttati per proteggere le molecole da eventuali processi di degradazione enzimatica prima che possano raggiungere il sito desiderato.

Sono stati condotti numerosi tentativi di applicare i liposomi per la preparazione di una forma orale dell'insulina [130-131]. L'efficacia del sistema dipende dalla composizione lipidica, dalla carica superficiale e dallo stato fisico del doppio strato fosfolipidico.

L'incapsulazione del rh-EGF in liposomi multivescicolari rappresenta una nuova strategia per lo sviluppo di un sistema orale di delivery nel trattamento dell'ulcera peptica [132]. Per risolvere il problema relativo all'instabilità dei fosfolipidi, è possibile ricorrere alla liofilizzazione (proliposomi) per preservare l'integrità delle vescicole per tempi molto lunghi, dando origine ad un prodotto industriale stabile [133].

### ***Direzionamento specifico***

Il colon offre una valida alternativa all'assorbimento intestinale per il suo contenuto inferiore in enzimi e per il lungo tempo di residenza, ma ha lo svantaggio di avere una minore quantità di fluido disponibile per la dissoluzione.

Il direzionamento specifico nel tratto GI è vantaggioso per peptidi pH sensibili ed è generalmente realizzato utilizzando polimeri pH sensibili come gli idrogels di destrano, azopolimeri, carbopols e poli(metilacrilic- $\gamma$ - etilenglicole) [134]. Questi polimeri hanno una gelificazione pH dipendente: si trovano allo stato di gel in ambiente acido, mentre fluidificano in ambiente alcalino consentendo così di proteggere proteine e peptidi dall'idrolisi acida [135-136.]

## **4. Delivery polmonare di proteine e peptidi**

La via polmonare offre una via alternativa e di potenzialità superiore alla via orale per il delivery di proteine e peptidi, esemplificata dal sistema di delivery dell'insulina per inalazione, l'Exubra<sup>®</sup>, recentemente approvato.

Il principale vantaggio della via polmonare è rappresentato dall'elevata area superficiale alveolare e dalla fittissima rete di vasi sanguigni. Grazie alla sottile membrana alveolare è quindi possibile l'assorbimento anche di macromolecole. Inoltre con questa via, si evita il metabolismo di primo passaggio epatico, si ha un'insorgenza d'azione più rapida e una biodisponibilità più elevata [137]. Applicazioni terapeutiche a lungo termine, come nel diabete mellito, sclerosi multipla, terapia del dolore, disturbi cardiovascolari e anafilassi, sono i principali target per il delivery polmonare.

È stato stimato che la biodisponibilità delle proteine per il delivery polmonare negli animali si attesti in un range compreso tra il 10% a oltre il 50 % a seconda della proteina [138].

Il meccanismo primario coinvolto nel delivery sistemico di molecole terapeutiche via polmonare è simile a quello della via orale, le particelle inalate sono depositate negli spazi alveolari e sono assorbite attraverso le sottili membrane nel circolo venoso. Grazie però alla grande area di superficie capillare e al più elevato turnover sanguigno l'assorbimento nei polmoni è molto più rapido. Il problema principale nel delivery polmonare è quello di garantire il rilascio completo allo spazio alveolare: le particelle inalate infatti sono in gran parte depositate nel canale tracheale con conseguente riduzione dell'efficacia.

L'ipotesi di delivery dell'insulina direttamente per via polmonare è stato avanzato nel 1925. Nello sviluppare Exubera<sup>®</sup>, Pfizer e Aventis hanno collaborato con Nektar Therapeutic. Exubera<sup>®</sup>, ha un'azione rapida ed è composta da una fine polvere di insulina che è stata sviluppata usando la tecnologia brevettata della Nektar Therapeutic. A parte il beneficio della

somministrazione al bisogno, l'insulina inalatoria entra in circolo molto più rapidamente che dopo iniezione sottocutanea. I livelli di glucosio incominciano a scendere dopo 10 -20 minuti, l'effetto massimo è esercitato dopo 2 ore dall'inalazione e permane per circa sei ore. Exubera<sup>®</sup> è un sistema costituito da piccole particelle di 1-3 µm di farmaco amorfo in una matrice tamponata a base di zuccheri, ottenute tramite un processo di spray drying. Grazie alle loro dimensioni le particelle inalate sono trasportate fino ai polmoni e rapidamente condotte nel torrente circolatorio, con conseguente ottimizzazione della dose somministrata. La FDA ha approvato Exubera<sup>®</sup> per l'uso umano nel gennaio 2006. Oltre 2000 pazienti stanno sperimentando Exubera<sup>®</sup> nei trials clinici mondiali, alcuni da un periodo di 5 anni.

Tuttavia sono state manifestate preoccupazioni circa la sicurezza delle preparazioni inalabili. Sembrerebbe infatti che Exubera<sup>®</sup> possa compromettere la capacità del polmone o danneggiare il tessuto polmonare se somministrata per lunghi periodi. Nei trials clinici la frequenza e il tipo di effetti collaterali sono simili sia nei gruppi trattati con Exubera<sup>®</sup> che nei controlli [139-140].

Presso il dipartimento di Ingegneria chimica del MIT è stato sviluppato un nuovo tipo di aerosol per inalazione, caratterizzato dall'utilizzo di particelle a bassa densità e grandi dimensioni. Questa tecnologia ha permesso una più alta efficienza di delivery di agenti terapeutici nella circolazione sistemica. Particelle di densità inferiore ai 0,4 g/cm<sup>3</sup> e di diametro medio superiore ai 5µm sono ispirate profondamente nei polmoni e sfuggono ai normali meccanismi di clearance naturale fino a che le particelle non hanno rilasciato il loro carico terapeutico [141]. Questa tecnologia, brevettata da Alkermes Inc. è stata denominata Air e viene attualmente studiata per il delivery di macromolecole come l'insulina e l'ormone umano della crescita.

Le PulmoSpheres<sup>®</sup>, microparticelle lipidiche porose, sono state allestite per il delivery polmonare di immunoglobuline (IgG) umane: somministrate nel tratto respiratorio superiore ed inferiore del topo provocano una risposta immunitaria locale e sistemica [142].

Oltre all'insulina, sono stati condotti studi sul delivery polmonare dell'ormone della crescita umano e del LHRH [143-144]. L'hGH ha mostrato una scarsa biodisponibilità per via orale (< 0,01%) e per via nasale se utilizzato in soluzione (< 1%). La sua veicolazione in liposomi di dipalmitoilfosfatidilcolina, in forma di polvere anidra somministrata per inalazione, permette di realizzare una biodisponibilità sistemica del 45%. La natura dei lipidi usati, le dimensioni, la carica e il rapporto farmaco/lipide sono i parametri primari dell'ottimizzazione per un efficiente delivery dei farmaci da sistemi liposomiali [145]. I lipidi utilizzati nel delivery



polmonare liposomiale sono fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, sfingomieline, fosfatidilinositolo, fosfatidilserina, fosfatidilglicerolo [146].

I liposomi sono stati utilizzati anche per la veicolazione di enzimi ossidanti come le catalasi e le superossido dismutasi [147]. I liposomi possono essere utilizzati in forma anidra come polvere secca per inalazioni o in forma di dispersione liquida per il delivery nasale.

## **5. Somministrazione transdermica**

Numerose ricerche si sono orientate verso l'individuazione di potenziali tecniche per la somministrazione di proteine e peptidi di provata efficacia terapeutica per vie diverse da quella orale e parenterale. Tra queste la via transdermica offre il vantaggio di bypassare la degradazione a livello GI, il metabolismo epatico di primo passaggio e permette di aumentare la *compliance* del paziente. Inoltre la pelle è priva di enzimi proteolitici responsabili della degradazione delle macromolecole proteiche.

Grazie a questi vantaggi la pelle rappresenta un sito ideale per l'applicazione di peptidi e proteine importanti. Tuttavia per veicolare un farmaco attraverso la pelle intatta, è necessario sviluppare tecnologie che facilitino la permeazione transdermica di molecole che presentano caratteristiche chimico-fisiche inadatte al superamento della barriera cutanea.

Numerose strategie sono state sviluppate per superare in modo reversibile la funzione barriera svolta principalmente dallo strato corneo. Tra queste possiamo ricordare l'uso di promotori di assorbimento cutaneo, l'impiego di carrier vescicolari (liposomi, transfersomi, etosomi, niosomi) e altri carrier colloidali. Grande interesse è stato poi rivolto al superamento della barriera cutanea mediante mezzi fisici quali l'applicazione di corrente elettrica (ionoforesi, elettroporazione) e di ultrasuoni a bassa frequenza (sonoforesi).

L'abrasione meccanica e i promotori chimici possono aumentare la penetrazione dei farmaci, ma possono irritare la pelle e i loro effetti non sono facilmente controllabili e regolabili [148].

Risultati particolarmente interessanti per il delivery transdermico di macromolecole sono stati ottenuti utilizzando iontoforesi, elettroporazione, sonoforesi e microporazione che utilizza microaghi capaci di penetrare solo nello strato corneo, ma non di raggiungere le terminazioni nervose .

Transpharma [149,150] e Alza [151,152] hanno usato diverse tecnologie di microporazione per il delivery transdermico di peptidi e proteine, vaccini e vari farmaci per il trattamento del dolore. I risultati iniziali sono stati incoraggianti, hanno aiutato a prestare maggiore attenzione sulle potenzialità della tecnologia transdermica.

Una lista delle macromolecole e delle tecnologie studiate sono riportate in tabella 6.

**Tabella 6. Esempi di tecnologie studiate per il delivery di proteine e peptidi**

Tecnologia	Macromolecole
Iontoforesi	LHRH analoghi [153], Calcitonina [154], Vapreotide [155], Triptorelin [156] Altri [157,158]
Elettroporazione	Paratiroide [159], Calcitonina di Salmone[160], LHRH [161]
Sonoforesi	LHRH [162], poli-l-lisina [163], Interferone [164], Insulina [164], Eritropoietina [164]
Microporazione	Insulina, [165,166], Desmopressina [167]

## Bibliografia:

- 1 Torchillin, V.P. and Lukyanov, A. N. (2003) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **8**, 259-266
- 2 Holmer, A.F. (2004) *Pharmaceutical Research end Manufactureres of America Wasington D.C*
- 3 Walsh, G. (2005) *Trends Biotechnol.*, **23**, 553-558.
- 4 Staff W. (2006) Pharmaceutical Business Review online, 18 Jan, Accessed at <http://www.pharmaceutlcal-business-review.com/article-feature.asp>. Accessed on 30 Mar, 2006.
- 5 Das, R.C. (2000) *Am. Biotechnol. Lab.*, **18**,24-25.
- 6 Hansen; Hartmann, L.; Bisgaard, B.; Mineo, T.; Jorgensen, H. and Holst, P.N. (2000) *Am. J Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**, E1010- 1018
- 7 Berghe, G.V.D.; Wouters, P.; Weekers, F., Mohan, S.; Baxter, R.C.; Veldhuis, J.D.; Bowers, C.Y. and Bouillon, R. (1999) *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **84**,1311-1323.
- 8 Cales, P; Masliah,C., Bernard, B., Garnier, P.P, Silvain, C.; Szostak. Talbodec, N.; Bronowicki, J.P.; Ribard, D., Botta- Fridlund, D.; Hillon, P; Besseghir, K. and Lebrech, D. (2001) *N. Engl. J Med.*, **344**, 23-28
- 9 Brown, L.R. (2005) *Expert Opin Drug Deliv*, **2**, 29-42.
- 10 Hamman, J.H., Enslin, G.M. and Kotze, A.F. (2005) *Biodrugs*, **19**, 165-177.
- 11 Shi, Y. and Li, L.C. (2005) *Expert Opin Drug Deliv.*, **2**, 1039- 1058
- 12 Mahato, R.I., Narang, A S, Thoma, L. and Miller, DD. (2003) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **20**,153-214.
- 13 Shah, R.B.; Ahsan, F. and Khan, M.A. (2002) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **19**, 135-169
- 14 Shanta Kumar,T.R.; Soppimath, K. and Nachaegari S.K.; *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2006 Aug; **7**(4): 261-76.
- 15 FDA Product Label at FDA  
<http://www.accwssdafda.gov/scripts/cder/dugssatfda/index.cfm> Accessed on March 30,2006
- 16 Harris, J.M. and Chess, R.B. (2003) *Nat. Rev. Drug discov.*, **2**, 214-221
- 17 Kozlowsky, A. and Harris, J.M. (2201) *J. Control Release*, **22**, 405-417
- 18 Harris, J.M, Martin, N.E, and Modi, M (2001) *Clin. Pharmacokinet*, **40**, 539-551
- 19 Jose, R.; Vivian, S.; Reynier, B.; Raymersey, A. and Eugenio,H. (2005) *Pharm Res*, **22**, 1375-1378
- 20 Dong, N.H.; Kang, L.C. and Deluca, P.P. (2005) *Pharm Res*, **22**, 743-749
- 21 Veronese, F.M. (2001) *Biomaterials*, **22**(5), 405-417
- 22 Gilles, P.S.; Figgitt, D.P. and Lamb, H.M. (2000) *Drugs*, **59**, 253-60
- 23 Luzio, S. D.; Beck, P. and Owens, D.R. (2003) *Horm. Metabolism. Res.*, **35**, 434-438
- 24 Yuan, L.; Wang J. and Shen, W.C. (1999) *Pharm Res*, **22**, 220-227
- 25 Dasguputa, P.; Singh, A.T. and Mukherjee, R.(2002) *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 29-36
- 26 Dasguputa, P.; Singh, A.T. and Mukherjee, R. (1999) *Pharm. Res.* **16**, 1047-1053
- 27 Wang, J., Shen D. and Shen,W.C. (2003) *Pharm Res*, **16**, 1674-1679
- 28 Wang, J., Chow, D.; Heiati, H. and Shen, W.C. (2003) *J.Control Release*, **88**, 369-380
- 29 Wang, J., Wang, B.A. and Schwendam,S.P (2002) *J.Control Release* **82**, 289-307
- 30 Johnson, O.L.; Cleland, J.L, Lee, H.J., Charnis, M.; Duenas,E.; Jaworowciz,W.; Shepard, D.; Shahzaman, A; Jones, A. J. S. and Putney, S.D.I. (1996) *Nat Med*, **2**, 795-799
- 31 Luan, X.S. and Bodmeier, R. (2006) *J Control Release* **110**, 266-272
- 32 Watnasirichaikul, S; Rades, T.;Tucker,I.G. and Davies, N.M (2002), *J. Pharm. Pharmacologic*, **54**, 473-480
- 33 Eliaz,R.E. and Kost, J. (2000) *J.Biomed Nater Res*, **50**, 388-396
- 34 Murthy,N.; Xu, M; Schuck, S.; Kunisawa, J.; Shastri,N. e Frechet, J.M.J (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4995-5000

- 35 Silvio L.D.; Courtney-Harris, R.G. and Downes, S. (1994) *J. Mat. Sci. Mater Med.*, **5**, 819-823
- 36 Giunchedi,P.; Conti,B.; Genta, I.; Conte,U. and Puglisi,G.; (2001) *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **27**, 745-750
- 37 Yeo, S; Lim,G.; Debenedetti,P.G. and Bernestein, H. (2004) *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 341-346
- 38 Varde, N.K. and Pack, D.W.(2004) *Expert Opin. Biol. Ther.*, **4**, 35-51
- 39 Fu, K; Klibanov, A.M. and Langer,R (2000) *Nat Biotechnol*, **18**, 24-25
- 40 Jones, A.J; Putney S.; Johnson, O.L. and Cleland, J.L. (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* **28**(1), 71-84
- 41 Yeo, Y. and Park, K. (2004) *J. Control Release*,**100**, 379-388
- 42 Whitaker, M.J.; Hao J. and Davies O.R. (2005) *J.Control Release* **101**, 85-92
- 43 Howdle, S.M. Watson, M.S. and Witaker, M.J (2001) *Chem. Commum.*,**1**, 109-110
- 44 Elvassore, N.; Bertucco, A. and Caliceti, P.(2001) *Ind. Eng. Chem. Res.*, **40**, 795-800
- 45 Peeling, W.B. (1989) *Urology*,**33**, 45-52
- 46 Perez Marrero,R. and Tyler, R.C. (2004) *Expert Opin. Pharmacother.*,**5**, 447-457.
- 47 Okumu, L.N. Fielder, P.J.;Dybidal, N.; Sane,S. and Clelnad, J.L. *Biomaterials*, **23**, 4353-4358
- 48 Ascentra™(2004) at Macromed Inc. Macromed Product Oppurtunity [http//www.macromed.com/Ascentra/2007/Ian2004v6.pdf](http://www.macromed.com/Ascentra/2007/Ian2004v6.pdf)
- 49 Zentner,G.M.; Rathi, R.; Shih,C.;Merea J.C.; Seo, M. H., Oh, H; Rhee, B.G.; Mestecky, J.; Moldoveanu, Z.; Morgan, M. and Weiman, S.(2001) *J. Control Release*,**72**, 203-215.
- 50 Chasin, M and Langer,R (Eds), (1990) in *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker,New York
- 51 Chasin, M., Domb,A., Ron, E.; Mathiowitz, E., Leong, K.; Laurencin,C., Brem, H.; Crossman, S. and Langer, R.,(1990) in *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (M.Chasin and Langer eds) [Marcel Dekker,New York pp.43-71
- 52 Lews, D. H.; (1990) *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, New York pp 71-121
- 53 Larry,B. (2005) *Exp. Opin. Drug Del.* **2**, 1-14
- 54 Zhu, G.Z.; Mallery, S.R.; Schwendman, S.P. (2000) *Nat. Biotechnolog.* , **18**, 52-57
- 55 Lam, X. M., Duenas E.T.; Daugherty.A.L.; Levin N. and Cleland, J.L. (2000) *J. Control Release*, **67**, 285-293
- 56 Blanco Prieto, M.J.; Besseghir,K.; Zerbe,O.; Andris, D., Orsolini, P.; Heigmgartner, F.; Merkle, H.P.and Garner,B. (2000) *J. Control Release* **67**, 19-28
- 57 Frangione-Beebe,M.; Rose, R.T; Kaumaya, P.T.P. and Schwendeman, S.P.(2001) *J. Microencapsul.* **18**, 663-676.
- 58 Costantino,L.; Gandolfi, F.; Tosi,G.; Rivasi, F.; Vandelli, M.A. and Forni, F.J.(2005) *J. Control Release* **108**, 84-96
- 59 Murthy, S.B.; Thanoo, B.C.; Wei, Q. and De Luca, P.P (2005) *Int J. Pharm*, **297**, 50-61
- 60 Kreuther, J.; Ränge, P.; Petrov, V.; Hamm,S.; Gelperina, S.E.;Engelhardt, B.; Alyautdin,R.; Brjesen, H.V. and Beglev, D.J.( 2003) *Pharm Res.*, **20**, 409-416
- 61 Watnasirichaikul,S.; Davies N.M; Rades, T. and Tucker, I.G.(2000) *Pharm Res*, **17**, 684-689
- 62 Goodwin, C. J.; Braden, M.; Downes, S. and Marshall, N.J. (1988)*j. Bio. Med Mater Res*, **40**, 204-213
- 63 Rai, B.; Teoh, S.H.; Hutmacher, D.W.; Cao, T. and Ho, K.H.; (2005) *Biomaterials*, **26**, 3739-3748
- 64 Coombes, A.G. Rizzi, S.C.; Williamson, M.; Barralet, J.E.; Downes, S. and Wallace,W.A. (2004) *Biomaterials* **25**, 315-325.
- 65 Kubek,M.J.; Liang, D; Byrd, K.E. And Domb, A.J. (1988) *Brain Res*, **809**, 189-197

- 66 Hsu,W; Lesniak, M.S., Tyler,B and Brem,H. (2005) *J. Neurocol*, **74**, 135-140
- 67 Bentz, H. (2002), *Protein and drug delivery: Scientific advances enabling novel approaches and improved products* IBC meeting 26-27 September Boston.
- 68 Fowler, J.E.; Flanagan, M; Gleason, D.M. and AI, E (2000) *Urology*, **55**, 639-642
- 69 Fowler, J.E.; Flanagan, M; Gleason, D.M. and AI, E (2000) *J.Urology* **164**, 730-734
- 70 Maruyama, K.; Mory, A.; Bhadra, S.; Subbiah, M.T. and Huang, L. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 246-252.
- 71 Mantripagada, S. (2002) *Prog. Lipid. Res.*, **41**, 392-406
- 72 Ye, Q.; Asherman, J.; Stevenson, M.; Brownson, E; and Katre N.V.(2000) *J.Control Release* **64**, 155-156
- 73 Moingeon, P.; Taisne, C.D. and Almond, J. (2002) *Br. Med. Bull.* **62**, 29-44
- 74 Mignet, N. Brown, A.; Degert, C.; Delord, B.; Roux, D.; Helene, C.; Laversane, R. and Francors, J.; *Nucleic Acid Res.*, **28**, 3134-3142
- 75 Gaubert , S. and Laverasaner, R.(2002) *E. Biofarm Rev.*, Spring
- 76 Moingeon, P.; Taisne, C.D. and Almond, J. (2002) *Br. Med Bull.* **62**, 29-44
- 77 Müller, R.H.; Mehnert W.; Lucks J.S.; et al. (1995). *Eur J Pharm Biopharm*, **41**: 62-69
- 78 C.Bocca et al., (1998) *Int. J. Pharm.* **175**, 185-193
- 79 G.P.Zara et al. (2002) *J.Drug Targeting* **10**, pp 327-335
- 80 Mehnert W. et al. (2001) *Adv Drug Deliv Rev* **47**, 165-196
- 81 Muller et al. (2002) *Int. J Pharm.* **242** 121-128
- 82 Hu et al. (2004) *Int. J Pharm.* **273**, 29-35
- 83 Goppert T.M.; Muller H. (2005) *Eur. J Pharm Biopharm.* **60** (3) 361-72
- 84 [http://www.greystoneassociates.org/Pen\\_Injectors.htm](http://www.greystoneassociates.org/Pen_Injectors.htm)
- 85 Smith P. L.; Wall, D.A.; Gochoco,C.H. and Wilson,G.(1992) *Adv.Drug. Delive.Rev*, **8**, 253-290
- 86 Wen, J.Y.; Ledger, R.; McLeod,B.J; Davies, N.M.; Butt, A.G. and Tucker, I.G.(2002) *Life Sci.* **71**, 3019-3030
- 87 Bernkop-Schnurch, A. and Gockel, N.C. (1997) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **23**, 773-740
- 88 Bernkop-Schnurch, W.; Schwarz, G.H. and Kratzel, M. (1997) *J. Control Release*, **47**, 113-121
- 89 Bernkop-Schnurch, A.; Kirchmayer, G.H.; and Kratzel,M. (1999) *J.Drug target*, **7**, 55-63
- 90 Oliyai, J. end Stella, V. (1993) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, **32**, 521-544
- 91 James, M.; Balkovec.; Black, R.M.; Hammond, M.L.; Heck, J.V.; Zambias,R.A.; Abruzzo, G ; Bartizal, K.; Kropp, H.; Trainor, C. and AI, E (1992) *J Med Chem* , **35**, 194-148
- 92 Rasmussen G.J., Bundgaard, H. (1991). *Int J Pharm*, **76**, 113-122
- 93 Bundgaard, H and Rasmussen, G.J. (1991) *Pharm Res* , **8**, 313-322
- 94 Lam, K.S. L.; Wat, M. S.; Choi, K.L.; Ip, T.P.; Pang, R.W.C. and Kumana, C.R. (1996) *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 379-385
- 95 Zaoral, M. ; Blaha, I ; Budesinsky, M.; Machova, A. and Slaninova, J. (2000) *J. Pept. Sci.* , **6**, 123-129
- 96 Asada, H.; Douen, M ; Waki, M.; Adachi, S ; Fujita, T ; Yamamolo, A, and Muranishi, S.J. (1995) *J. Pharm. Sci.*, **84**, 682-687
- 97 Kim, S. K.; Kim, K.; Lee, S.; Park, K.; Park, J H.; Kwon, I.C. ; Choi, K ; Kim, C.Y. and Byun,Y. (2005) *J. Pharm. Biomed Anal.*, **39**, 861-870
- 98 Kim, S ; Lee, H ; Lee, S ; Kim, S K\_; Lee, Y.K.; Chung, B H ; Moon, H. T. and Byun, Y (2005) *Drug Dev. Res.*; **64**, 129-135
- 99 Lee, S.; Lee, J ; Lee, DY.; Kim, S.K.; Lee, Y and Byun, Y (2005) *Diabetologia*, **48**, 405-411,
- 100 Welt, F.G. P. ; Woods, T.C. and Edelman, E. R. (2001) *Circulation*, **104**, 3121-3124
- 101 Dmitry, M.; Robert, A.; Huai-Ziten, W.; Elizabeth, F.; Heather, T. and Isabel, G. (2005) *Curr. Drug Deliv.*, **2**, 191-197

- 102 Sharma, P. ; Chawla, H.P.S. and Panchagnula, R.; (1999) *Drugs Future*, **24**, 1221-1240
- 103 Morishita, M.; Morishita, I.; Takayama, A and AI, E (1993) *Bio. Pharm Bull*, **16**,68-72
- 104 Shao, Z.; Li, Y.; Chermak, T. and Mitra, A.K. (1994) *Pharm Res*, **11**,1174-1379.
- 105 Utoguchi, N.; Watanabe, Y.; Shida, T. and Matsumoto, M. (1948) *Pharm Res*,**15**, 870-876.
- 106 Aungst, B.J. ; Saitoh, H.; Blomquist, D.L., and AI, E (1998) *Int J Pharm.*, **169**, 221-228,
- 107 Drewe, J; Meier, R.; Vonderscher, J. ; Kiss, D.; Posanski, U.; Kissel, T. and Gyr, K. (1992) *Br. J Clin, Pharmacol.*, **34**, 60-64.
- 108 Ritschel, W.A. (1996) *Clin. Transplant*, **10**, 364-373
- 109 Dunn, S.; Cooney, G.; Sommerauer, J.; Lindsay, C.; Mediarmid, S ; Wong, R L , Chang, C T , Smith, H.T. and Choc, M.G. (1997) *Transplantation*, **63**, 1762-1767
- 110 Hydroance TM, at Lipocine's HydroanceTM Technology [http://www. Lipocine.com/home/content/view/41/212/](http://www.Lipocine.com/home/content/view/41/212/) accessed on March 30, 2006
- 111 Thanou, M.; Florea, B.I. ; Langemeyer, M.W.E ; Verhoef, J.C. and Junginger, H.E. (2000) *Pharm Res*, **17**, 27-31
- 112 Smith, J.; Wood, E. and Dornish, M. (2004) *Pharm. Res*, **21**, 43-49
- 113 Bernkop-Schnurch, A.; Kast, C.E and Guggi, D. (2003) *J Control. Release*, **93**,95-103
- 114 Bernkop-Schnurch, A.; Krauland, A.H. and Leitner, V.M. (2004) *Eur J Pharm. Biopharm* , **58**, 253-263
- 115 Henrik, L.; Lueßen, J.; Coos, V.; Gerrit B ; Claus M L ; Boer, A. G. and Junginger, H. J. (1995) *Pharm Res.*, **12**, 1293-1298
- 116 Whitehead, K.; Shen, Z. and Mitragotri, S. (2004) *J. Control Release*, **98**, 37-45.
- 117 Morishita, M.; Goto, F. ; Nakamura, K.; Lowman, M.A.; Takayama, K.and Peppas, N.A. (2006) *J. Control Release*, **110**, 587-594
- 118 Lehr, C. M. (1994) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*, **11**, 119-160
- 119 Thanou, M ; Verhoef, J.C. and Junginger, H.E, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev*, **52**, 117-126
- 120 LueBen, H.L. Rentel, C.O ; Kotze, A.F. ; Lehr, C.M. ; Bohr, A.G.D.; Verhoef, L.C. and Junginger, H JE. (1997) *J. Control Release*, **45**, 15- 23.
- 121 Sakuma, S.; Hayashi, M. and Akashi, M. (2001) *Adv Drug Deliv. Rev.*, **47**, 21-37
- 122 Kreuter, J. (1991) *Adv. Drug Deliv. Rev* , **7**, 71-86
- 123 Couvreur, P. and Puisieux, F. (1993) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **10**, 141-162. `
- 124 Yung, T.; Kamm,W. Breitenbach,A, Kaiserlin,E; Xiao,J.X. and Kissel T. (2000) *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 147-160
- 125 Sakuma, S ; Suzuki, N ; Kikuchi, H ; Hiwatari, K.; Arikawa, K ; Kishida, A. and Akashi, M (1997) *Int. J. Pharm.* **149**, 93-106.
- 126 Kumar, M.N.V.R (2000) *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **3**, 234-258
- 127 Radwan, M A. (2001) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **27**, 981-989
- 128 Hagan, D.T.O.; Singh, M. and Gupta, R. K. (1998) *Adv. Drug Del. Rev.*, **32**, 225-246,
- 129 Choi, S; Baudys. M and Kirn, S W (2004) *Pharm Res.*, **21**, 827831
- 130 Dapergolas, G. and Gregoriadis, G (1976) *Lancet II*, **2**, 824-827
- 131 Iwanaga, K ; Ono, S. ; Narioka, K.; Kakemi M.; Morimoto, K.; Yamashita, S.; Namba, Y. and Oku, N. (1999) *J. Pharm. Sci.*, **88**, 248-252
- 132 Li, H ; .An, J H ; Park, J.S. and Han, K. (2005) *Arch. Pharm. Res.* , **28**, 988-994
- 133 Song, K H , Chung, S..J and Shim, C.K. (2005) *J. Control Release*, **106**, 298-308.
- 134 Kim, J.; Nayak, S. and Lyon, L A. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9588-9592
- 135 Zhang, X ; Wu, D and Chu, C. C.; (2004) *Biomaterials*, **19**, 4719-4730.
- 136 Kim, M.R and Park, T.G. (2002) *J. Control. Release*, **80**, 69-77
- 137 Courieer, H M ; Butz, N. and Vandamme, F (2002) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*, **19**, 425-498.
- 138 Morimoto, K , Uehara, Y ; Iwanaga, K and Kakemi, M (2000) *Pharm. Acta Helv*, **74**, 411-415

- 139 White, S.; Bennett, D.B.; Cheu, S.; Conley, P, W ; Guzek, D.B.; Gray, S.; Foward, J.; Malcolmson, R.; Parker, J. M.; Roberts, P.; Sadrzadeh, N.; Schumacher, J.D ; Seshadri, S.; Sluggett, G.W.; Stevenson, C.L. and Harper, N.J.(2005) *Diabetes Technol Ther*, **7**, 896-906
- 140 Nektar, (2005) at Pulmonary Delivery of Macromolecules *Nektar Therapeutics* <http://www.nektar.com/pdf/Pfizer-case.pdf> Accessed on March 30, 2006
- 141 Edwards, D.A; Hanes, J.; Caponetti,G. ; Hrkach, J., Ben-Jebria, A.; Eskew, M.L.; Mintzes, J.; Deaver, D.; Lotan, N. and Langer, R. *Science*, **276**, 1868-1871.
- 142 Bot, A.I; Tarara, T.E.; Smith, D.J.; Bot, S.R.; Woods, C.M. and Weers, J.G. (2000) *Pharm. Res.* **17**, 275-283
- 143 Bosquillon, C. ; Preat, V. and Vanbever, R. (2004) *J. Control Release*, **96**,233-244
- 144 Byron, P.R. and Patton, J.S. (1994) *J. Aerosol Med*, **7**, 49-75.
- 145 Margalit, R. (1995) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **12**, 233-261
- 146 Evora, C ; Soriano, I.; Rogers, R.A.; Shakesheff, K.M.; Hanes, J. and Langer, R. (1998) *J. Control Release*, **51**, 43-152
- 147 Padmanabhan, R.V. ; Gudapaty, R.; Liener, I.E.; Schwartz, B.A. and Hoidal, J.R.(1985) *Am. Rev. Respir. Dis. ,* **132**, 164-167
- 148 Hadgraft,I (1999) *Int. J. Pharm.*, 184, 1-6
- 149 Levin, G.; Gershonowitz, A.; Sacks, H.; Stern, M.; Sherman, A.; Rudaev, S.; Zivin, I. and Phillip, M. (2005) *Pharm. Res*, **22**, 550-555
- 150 Avrahami, Z and Sohn, Z, (2003) U.S Patent., Patent No. 6, 611, 706
- 151 Trautman, J. C.; Cormier, M.J.N.; Kim, H.L, and Zuck, M.G .(2000) LC S Patent No 6,0831,196
- 152 Dohner, J. W.; Bura, S.A. and Ford, R.E. (2001) U S Patent, Patent No 6,238,700.
- 153 Smyth, H.D.C. ; Becket, C. and Mehta, S. (2002) *J. Pharm. Sci.* , **91**, 1296-1307
- 154 Nakamura, K. ; Katagai, K. ; Mori, K.; Fiigo, N.; Sato, S. and Yamamoto, K. (2001) *Int J Pharm* , **218**, 93-102
- 155 Schhuetz, Y.B. Naik, A.; Guy,.R.H, Vauridel E. and Kalia,Y.N. (2005) *Pharm. Res.* **22**,1305-1312
- 156 Schhuetz, Y.B. Naik, A.; Guy, R.H, Vauridel E. and Kalia,Y.N. (2005) *J. Phar. Sci.* **94**,2175-2182
- 157 Abla,N. Naik,A.;Guy,R.H and Kalia,Y.N. (2005) *J Control Release*, **108**,319-330
- 158 Abla,N. Naik,A.;Guy,R.H and Kalia,Y.N (2005) *Pharm Res*, **22**, 2069-2078
- 159 Medi, B.M. and Singh, J. (2003) *Int J.Pharm*, **263**, 25-33.,
- 160 Chang, S.L. Hofmann,G.A.; Zahang. L.; Deftos, L.J. and Banga A.K, (2000) *J. Control Release*, **66**, 127-133
- 161 Bommannan, D. B. Tamada, J.; Leung. L. and Potts, R.O.(1995) *Pharm. Res.*, **11**, 1809-1914
- 162 Tezel, A.; Sens, A. and Mitragori, S. (2003) *J.Pharm Sci*, **92**, 381-393
- 163 Weimann, L.J. and Wu, J. (2002) *Ultrasound Med Biol.*, **28**, 113-119
- 164 Boucaud, A; Garrigue,M.A.; Macher, L.; Vaillant, L. and Patat, F. (2002) *J. Control Release*, **81**, 113-119
- 165 Mcallister, D.V. Wang, P.M. Davis, S.P.; Park,J.H.; Canatella, P.J.; Allen, M.G. and Prausnitz, M.R.(2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 13755-13760
- 166 Martanto,W.; Davis,S.P.; Holiday, N.R. ; Wang.J.; Gill, H.S. and Prausnitz, M.R.(2004) *Pharm. Res.*, **21**, 947-952
- 167 Cormier, M.; Johnson, B., Ameri, M; Nyam, K.; Libiran, L; Zhang, D.D. and Daddona, P. (2004) *J. Control Release*, **97**, 503-51