

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE E TECNOLOGIE CHIMICHE  
INDIRIZZO IN SCIENZE FARMACEUTICHE ( XXII CICLO)



## SVILUPPO DI SISTEMI NANOPARTICELLARI CONTENENTI IDROSSIPROPIL- $\beta$ -CICLODESTRINA PER IL RILASCIO COLON- SPECIFICO DI FARMACI

**Tutor:**

**Prof. PAOLO GIUNCHEDI**

**Coordinatore:**

**Prof. GIUSEPPE PAGLIETTI**

**Dottorando**

**Dott. Gianpiera Spada**

**Anno 2009**

## UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie chimiche; Indirizzo in scienze farmaceutiche ( XXII ciclo)

### SVILUPPO DI SISTEMI NANOPARTICELLARI CONTENENTI IDROSSIPROPIL- $\beta$ -CICLODESTRINA PER IL RILASCIO COLON-SPECIFICO DI FARMACI

#### ABSTRACT

Diclofenac Sodium (DS) was chosen as model drug for colonic drug delivery because of its large use against the Arthritis rheumatoid therapy, that determines an increment of pain during the early morning. This aspect drove this study to the preparation of colon specific formulations able to guarantee the absorption of the drug several hours after the oral administration.

Nanoparticles hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP) based containing DS were prepared. The efficacy of HP as gastroresistant polymer was evaluated. Comparison between gastroresistant properties of HP and the characteristics of gastroresistant polymer Eudragit L100<sup>®</sup> was done. Moreover synergic effects obtained by the mix of those two excipients were evaluated.

The second part of the work was based on the study of HP capability to favorite colon specific delivery of DS from Solid Lipid Nanoparticles. Two kinds of SLN loaded with DS were produced: a series of formulations containing both HP and lipid, a second series composed exclusively by the lipid.

The third chapter is based on the development of a new method of entrapment of proteic antigens on polymeric nanoparticles. The innovation of the study was due to the method of protein loading. Aim of this work was to adsorb proteins on the surface of preformed nanoparticles. Several parameters were studied in order to evaluate the best way to obtain the maximum adsorption of the protein.

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>Pag 5</b>
<i>1.1 Le nanoparticelle polimeriche</i>	<i>Pag 5</i>
1.1.1 Emulsione semplice con evaporazione del solvente.	Pag 7
1.1.2 Doppia Emulsione con evaporazione del solvente	Pag 7
<i>1.2 Le nanoparticelle solide lipidiche (SLN)</i>	<i>pag 8</i>
1.2.1 L'omogeneizzazione a caldo	Pag 8
1.2.2 L'omogeneizzazione a freddo	Pag 9
<i>1.3 Le ciclo destrine</i>	<i>Pag 10</i>
<i>1.4 L'Eudragit®</i>	<i>Pag 14</i>
<i>1.5 Compritol ATO 888</i>	<i>Pag 15</i>
<i>1.6 Il tratto gastro-intestinale e il rilascio sito specifico di farmaci e vaccini</i>	<i>Pag 16</i>
1.6.1 Caratteristiche anotomo-fisiologiche	Pag 16
1.6.2 La somministrazione colon-specifica di farmaci	Pag 19
1.6.3 La somministrazione colon-specifica di vaccini	Pag 22
<i>1.7 Obbiettivo del lavoro</i>	<i>Pag 26</i>

## CAPITOLO 1: PROGETTAZIONE DI FORMULAZIONI NANOPARTICELLARI POLIMERICHE A BASE DI CICLODESTRINE DESTINATE AL RILASCIO COLON SPECIFICO.

<b>2 MATERIALI E METODI</b>	<b>Pag 32</b>
<i>2.1 Materiali</i>	<i>Pag 32</i>
<i>2.2 Apparecchiature</i>	<i>Pag 33</i>
<i>2.3 Metodi</i>	<i>Pag 34</i>
2.3.1 Individuazione dei parametri di produzione delle nanoparticelle	Pag 34
2.3.2 Preparazione delle formulazioni contenenti Diclofenac Sodico	Pag 36
2.3.3 Processo di essiccamento delle formulazioni prodotte	Pag 37
2.3.4 Analisi del diametro medio delle emulsioni e delle particelle solide	Pag 37
2.3.5 Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)	Pag 38
2.3.6 Analisi ai raggi X	Pag 38
2.3.7 Analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC)	Pag 39
2.3.8 Calcolo dell'efficacia di incapsulazione	

e del contenuto effettivo del farmaco	Pag 40
2.3.9 Test di dissoluzione	Pag 40
2.3.10 Test di permeazione in-vitro	Pag 41
2.3.11 Test di permeazione ex-vivo	Pag 41
2.3.12 Test di permeazione attraverso il monostrato cellulare	Pag 42
2.3.13 Studi di citotossicità	Pag 43
<b>3 RISULTATI</b>	<b>Pag 45</b>
<i>3.1 Sviluppo della nanoemulsione mediante l'utilizzo del Silverson SL2</i>	<i>Pag 45</i>
<i>3.2 Sviluppo della nanoemulsione mediante l'utilizzo dell'omogeneizzatore NS 1001L-Panda-S.N.6890</i>	<i>Pag 46</i>
<i>3.3 Processo di essiccazione delle formulazioni prodotte</i>	<i>pag 47</i>
<i>3.4 Analisi dimensionale delle emulsioni e delle particelle essiccate</i>	<i>Pag 47</i>
<i>3.5 Analisi al Microscopio a Scansione elettronica (SEM)</i>	<i>Pag 48</i>
<i>3.6 Analisi ai raggi X</i>	<i>pag 51</i>
<i>3.7 Calorimetria differenziale a Scansione (DSC)</i>	<i>Pag 57</i>
<i>3.8 Spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR)</i>	<i>Pag 59</i>
<i>3.9 Valutazione dell'efficacia di incapsulazione del Diclofenac Sodico</i>	<i>Pag 60</i>
<i>3.10 Test di rilascio in-vitro in ambiente gastro intestinale simulato</i>	<i>Pag 61</i>
<i>3.11 Studi di permeazione in-vitro ed ex-vivo</i>	<i>Pag 63</i>
<i>3.12 Studi di citotossicità cellulare</i>	<i>Pag 65</i>

**CAPITOLO 2: PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE SOLIDE LIPIDICHE CONTENENTI IDROSSIPROPIL- $\beta$ -CICLODESTRINA DESTINATE AL TARGET COLON-SPECIFICO**

<b>4 MATERIALI E METODI</b>	<b>Pag 69</b>
<i>4.1 Materiali</i>	<i>Pag 69</i>
<i>4.2 Apparecchiature</i>	<i>Pag 70</i>
<i>4.3 Metodi</i>	<i>Pag 71</i>
<i>4.3.1 Preparazione delle SLN</i>	<i>Pag 71</i>
<i>4.3.2 Essiccazione delle nanoparticelle</i>	<i>Pag 71</i>
<i>4.3.3 Valutazione delle dimensioni nano particellari</i>	<i>Pag 72</i>
<i>4.3.4 Determinazione del contenuto reale di farmaco</i>	<i>Pag 72</i>

4.3.5	Test di dissoluzione	Pag 73
4.3.6	Test di permeazione in-vitro	Pag 74
4.3.7	Test di permeazione ex-vivo	Pag 75
4.3.8	Test di permeazione attraverso il monostrato cellulare	Pag 75

## **5 RISULTATI** **Pag 77**

5.1	Valutazione delle dimensioni particellari	Pag 77
5.2	Determinazione del drug content e dell'efficacia di incapsulazione	Pag 78
5.3	Test di dissoluzione in-vitro	Pag 78
5.4	Test di permeazione in-vitro	Pag 80
5.5	Test di permeazione ex-vivo	Pag 81
5.6	Permeazione attraverso il monostrato cellulare	Pag 81

## **CAPITOLO 3: OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO DI ADSORBIMENTO DI ANTIGENI PROTEICI SU NANOPARTICELLE A BASE DI PLA E PLGA**

## **6 MATERIALI e METODI** **Pag 84**

<i>6.1 materiali</i>	<i>Pag 84</i>
<i>6.2 Apparecchiature</i>	<i>Pag 84</i>
<i>6.3 Metodi</i>	<i>Pag 85</i>
6.3.1 Preparazione della formulazione a base di PLGA	Pag 85
6.3.2 Preparazione di formulazioni a base di PLA	Pag 86
6.3.3 Modifica delle serie F ed E per ottenere Nanoparticelle cariche positivamente	Pag 86
6.3.4 Prospetto riassuntivo delle formulazioni prodotte.	Pag 87
6.3.5 Analisi delle dimensioni particellari prima e dopo l'essiccamento	Pag 91
6.3.6 Processo di essiccamento mediante liofilizzazione	Pag 91
6.3.7 Valutazione del Potenziale Z delle particelle prima e dopo l'adsorbimento	Pag 91
6.3.8 Studio sul processo di adsorbimento della proteina BSA sulla superficie nanoparticellare	Pag 92
6.3.9 Valutazione della quantità di BSA adsorbita	Pag 93
6.3.10 Analisi al Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM)	Pag 94
6.3.11 Verifica della presenza della proteina sulla superficie delle nanoparticelle	

e della sua degradazione in seguito al processo di adsorbimento	Pag 94
6.3.12 SDS-Page	Pag 94
6.4 <i>Processo di adsorbimento di frammenti proteici derivanti dal capsid del Blue Tongue Virus</i>	Pag95
<b>7 RISULTATI</b>	<b>Pag 96</b>
7.1 <i>Preparazione dell'emulsione</i>	Pag 96
7.2 <i>Analisi dimensionale delle emulsioni e delle nanoparticelle essiccate</i>	Pag 96
7.3 <i>Valutazione dell'adsorbimento della proteina</i>	Pag 97
7.4 <i>Potenziale Z delle particelle prima e dopo l'adsorbimento</i>	Pag 100
7.5 <i>Analisi al TEM dopo test di adsorbimento</i>	Pag 102
7.6 <i>Test di rilascio in vitro</i>	Pag 104
7.7 <i>SDS-Page</i>	Pag 107
7.8 <i>Processo di adsorbimento di frammenti proteici derivanti dal capsid del Blue Tongue Virus</i>	Pag 110
<b>8 CONCLUSIONI</b>	<b>Pag 111</b>
<b>9 BIBLIOGRAFIA</b>	<b>Pag 113</b>

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Le nanoparticelle polimeriche

La nanotecnologia è considerata come una delle più grandi scommesse della medicina poiché attraverso di essa si vuole un nuovo metodo di produzione di farmaci destinati al rilascio controllato di farmaco e agenti terapeutici di natura biologica. La nanotecnologia occupa attualmente una grossa fetta del mercato farmaceutico e cosmetico. Attraverso di essa si possono ottenere sistemi innovativi aventi caratteristiche chimico-fisiche in grado di favorire la solubilità e la biodisponibilità di farmaci poco solubili in acqua, capaci di aumentare la permanenza in circolo di farmaci o indirizzarli al raggiungimento di uno specifico sito d'azione e capaci infine di fungere da adiuvanti per la somministrazione di vaccini (Aston, Francis et al; Couvreur et al; Sakuma et al).

Attualmente diversi sistemi nano particellari vengono studiati quali potenziali medicinali di nuova generazione (Tabella 1). Tra essi notevole sviluppo hanno avuto le nanoparticelle polimeriche, prodotte a partire da diversi tipi di polimeri sia di origine naturale che sintetica a partire dagli anni 70.

Nanotechnology	Comments
Liposomes	Developed for drug delivery applications since the early 1970s. Vesicles composed of one or more phospholipid bilayer membranes; smallest liposomes are in nanometre size range.
Dendrimers	Highly branched, monodispersed structures of 2–20 nm formed by the addition of shells of branched molecules to a central core; can be taken up by cells and, therefore, used to deliver into cells therapeutic compounds, e.g. small molecules, proteins and DNA. Can cross biological membranes, e.g. blood-brain barrier.
Polymer nanoparticles	Various polymers, e.g. poly(lactide-co-glycolide), used to produce biocompatible, biodegradable nanoparticles of 80–150 nm; being developed for various drug delivery applications; possible to attach ligands to target specific cell types.
Coated polymer-based nanoparticles	Polymer nanoparticles coated, for example, with polyethylene glycol to reduce recognition by the immune system and enhance circulatory persistence.
Micelles	Self-assembling nanoparticulate structures in 20–100 nm range formed in aqueous media from block copolymers. Can be used to carry range of drug entities.
Fullerenes	Carbon isoforms arranged in a spherical cage-like structure of 0.7–1.5 nm that can be developed to carry therapeutic agents, e.g. C <sub>60</sub> buckminsterfullerene or buckyballs.
Nanotubes	Carbon self-assembles in the presence of transition metal catalysts into single walled cylinders of 0.3–8 nm diameter. Potential for delivery of therapeutic agents.
Drug nanoparticles	Technologies that reduce drug crystals in size to $\leq$ 100 nm. Main application is to improve the solubility of poorly water soluble drugs.
Chitosan/lecithin nanoparticles	Nanoparticles of c. 300 nm produced by self-assembly of chitosan and lecithin in ethanol. Being developed for delivery of therapeutic agents, for example, via the nasal route.
Nanostructured biomaterials	Biocompatible matrices with nanoporous structures within which drug is contained. Materials can be produced in many forms including microparticles, fibres, fabrics, micromachined implants and devices. Being developed for the delivery of a wide range of therapeutic agents.

Tabella 1: tavola riassuntiva delle formulazioni nano particellari sviluppate a partire dagli anni '70. Esempi di polimeri o eccipienti di diversa natura impiegati nella loro produzione (Fonte: Pharmaceutical Technology Europe, 17(4), 21–28 (2005)).

In commercio si trovano già le prime specialità medicinali di natura nano particellare (Tabella 2); tuttavia finora essi sono costituiti principalmente da nuove forme farmaceutiche veicolanti farmaci noti. Attraverso la loro somministrazione è possibile osservare le differenti risposte terapeutiche legate alla forma farmaceutica scelta per la somministrazione (Aston et al).

Table 1: Approved nano-enabled therapeutics.

Nano component	Example					
	Product/brand name	Active Ingredient	Delivery route	Company	Indications	Approval date
Albumin nanoparticles	Abraxane	Paclitaxel	IV	Abraxis	Metastatic breast cancer patients who have failed combination therapy.	2005
Cross-linked Polyallylamine resin	Renagel	Cross-linked Polyallylamine resin (phosphate binder)	Oral	Genzyme	Control of serum phosphorus in patients on dialysis.	2005
Liposomes	Diprivan	Propofol	IV	Astrazeneca (now generic)	Anaesthetic	1989
Micellular nanoparticles	Estrasorb	Estradiol hemihydrates	Trans dermal	Novavax	Reduction of hot flushes and night sweats in menopausal women.	2003
NanoCrystals	Tricor/Tripix/Lofibra/Lipanthyl/lipidil/Fenocor-67	Fenofibrate	Oral	Abbott Labs/ Teva/Solvay Pharmaceutical/ Ordain Health Care Pvt	Reduction of triglycerides, LDL and total cholesterol. Increase abnormally low HDL.	2005
Pegylation	Neulasta	G-CSF (filgrastim)	IV	Amgen	Boost white blood count following chemotherapy.	2002
PLG microspheres	Lupron Depot	Luprolide acetate	IV	TAP Pharma	Prostate cancer, endometriosis, fibroids and central precocious puberty.	1989
PLGA microspheres	Trelstar Depot	Octreotide acetate	IV	Debiopharm/ Watson Pharma	Palliative treatment of advanced prostate cancer.	2000

Tabella 2: Tabella riassuntiva delle forme farmaceutiche nanoparticellari commercializzate, del relativo principio attivo, della via di somministrazione applicata e delle indicazioni terapeutiche Fonte: Pharmaceutical Technology Europe, 17(4), 21–28 (2005)

Le nanoparticelle polimeriche possono essere impiegate per il trattamento locale o sistemico di diverse patologie; esse sono caratterizzate da una matrice polimerica al cui interno il farmaco può essere disperso per formare nanosfere oppure racchiuso per formare nanocapsule (Aston et al).

I sistemi nanoparticellari, grazie alla loro conformazione, sono in grado di proteggere il farmaco dalla degradazione enzimatica, favorirne la diffusione attraverso l'epitelio, modificare la farmacocinetica e la distribuzione nei tessuti e aumentarne la penetrazione intracellulare. Possono essere somministrati attraverso tutte le vie classiche e sono in grado di favorire sia la biodisponibilità sia l'efficacia terapeutica del farmaco trasportato. Le dimensioni delle nanoparticelle sono fondamentali per garantire la loro diffusione attraverso le barriere biologiche. E' stato stabilito da diversi studi che, in seguito ad applicazione mucosale, quanto minori sono le dimensioni particellari, tanto maggiori sono le possibilità che le nanoparticelle trasportino il farmaco attraverso la mucosa stessa (Cheng et al, Couvreur e



Vauthier). Diversi studi hanno dimostrato che le nanoparticelle sono inglobate all'interno della maggior parte delle cellule; in particolare quelle aventi dimensioni intorno ai 100nm godono di un *uptake* cellulare maggiore di 2.5 volte rispetto a particelle aventi dimensioni di 1µm. Esse inoltre sono in grado di penetrare con maggiore facilità attraverso le porzioni submucosali, mentre le microparticelle sono localizzate principalmente nella zona epiteliale (Singh et al).

In letteratura sono riportati diversi metodi per la preparazione delle nanoparticelle; essi sono dipendenti dal materiale utilizzato e dall'impiego finale; la tecnica dell'emulsione semplice con evaporazione del solvente e quella della doppia emulsione con evaporazione del solvente, sono le metodiche utilizzate più frequentemente, sono state le prime ad essere messe a punto in scala di laboratorio e garantiscono un'ampia riproducibilità del metodo. Il raggiungimento delle dimensioni nanometriche è dovuto non solo alla tecnica impiegata ma anche all'aggiunta di agenti stabilizzanti o antiaggreganti fondamentali per favorire la formazione e il mantenimento dell'emulsione (Couvreur e Vauthier).

### **1.1.1 Emulsione semplice con evaporazione del solvente.**

Questo metodo è usato per la preparazione di nano e microsfele di farmaci insolubili o poco solubili in acqua. Si tratta principalmente di emulsioni O/A. In questo processo il polimero e il principio attivo sono disciolti in un solvente organico immiscibile con l'acqua. La soluzione ottenuta è emulsionata in una fase acquosa continua al fine di formare delle gocce aventi dimensioni ben definite. La fase fondamentale della preparazione è l'inclusione del solvente nella fase acquosa e l'evaporazione dello stesso. Le particelle ottenute in seguito all'evaporazione del solvente possono essere essiccate tramite filtrazione o altri metodi idonei. Affinchè il farmaco possa essere incapsulato mediante questa tecnica è indispensabile che sia insolubile in acqua o nel mezzo che costituisce la fase continua (Benoit et al).

### **1.1.2 Doppia Emulsione con evaporazione del solvente**

Questo metodo deriva da quello precedentemente descritto. Il principio attivo è disciolto in una soluzione acquosa che in seguito è omogeneizzata nella fase organica contenente il polimero. L'emulsione ottenuta è un'emulsione semplice A/O; essa è addizionata a una seconda soluzione acquosa (contenente eventualmente uno stabilizzante) in modo tale da avere una emulsione doppia A/O/A (Figura 2). Questa tecnica è usata solo quando il farmaco, molto solubile in acqua, ha un basso coefficiente di partizione (Benoit et al, Saraf et al).

## ***1.2 Le nanoparticelle solide lipidiche (SLN)***

Le SLN costituiscono una forma farmaceutica alternativa alle nanoparticelle polimeriche da cui derivano. Sono costituite da lipidi solidi e hanno diametro medio compreso fra gli 50 e i 1000nm. La matrice è costituita da un lipide solido disperso in una soluzione acquosa e stabilizzato dalla presenza di surfactanti o polimeri. Le SLN combinano diversi vantaggi:

- Ottenimento di un rilascio prolungato del farmaco garantito dallo stato solido della matrice lipidica
- protezione del principio attivo dalla degradazione chimica ed enzimatica
- impiego di lipidi generalmente ben tollerati dall'organismo e caratterizzati da bassa tossicità cellulare e sistemica (Muller et al)(Tabella 3).

Le SLN sono state usate sin dall'inizio in campo farmaceutico esclusivamente per l'applicazione topica cutanea (Lombardi Borgia et al), successivamente le vie di somministrazione oculare ma anche parenterale (Wissing et al) e orale (Bummer, Muller e Olbrich) sono state studiate e vengono tuttora approfondite. In modo particolare grande importanza viene data alla via di somministrazione orale poiché le SLN, come le particelle polimeriche possono essere facilmente fagocitate dai macrofagi presenti all'interno delle placche di Peyer ed espletare una potenziale funzione antigenica in seguito alla veicolazione di appropriati vaccini (Muller e Olbrich).

Le SLN possono essere prodotte utilizzando le prime metodiche sviluppate per la loro produzione: l'*omogeneizzazione a caldo* e *omogeneizzazione a freddo* (Muller e Olbrich, Muller et al, zur Mulhen et al, Mehnert et al). Nel corso degli anni sono state sviluppate nuove tecniche di produzione quali: Iniezione del solvente, utilizzo di fluidi supercritici, coacervazione, ultracentrifugazione, diffusione del solvente (Hu et al; Trotta et al; Cavalli et al), Ultrasuoni; (Puglia et al) Membrane contactor (Charcosset et al, El-Harati et al)

### **1.2.1 L'omogeneizzazione a caldo**

Questa tecnica prevede la dispersione del lipide ancora caldo *all'interno della fase acquosa anch'essa calda e contenente* il surfactante in modo da ottenere una Pre-emulsione O/A che può essere riemulsionata in maniera appropriata fino ad ottenere una nano emulsione (Mehnert et al) farmaco può trovarsi o disciolto all'interno della fase lipidica oppure all'interno della fase acquosa.

### **1.2.2 L'omogeneizzazione a freddo**

Nella tecnica dell'*omogenizzazione a freddo* il lipide contenente il Farmaco è fatto raffreddare e versato all'interno della soluzione acquosa tenuta in agitazione magnetica. Durante tale processo il lipide tende a precipitare sotto forma di microparticelle che sono immediatamente sospese all'interno di una soluzione acquosa fredda contenente il surfactante. La sospensione ottenuta è omogeneizzata a temperatura ambiente o inferiore al fine di ottenere nanoparticelle. Questa tecnica è utilizzata per garantire la minima perdita di farmaco idrosolubile all'interno della fase acquosa (Menhert et al).

	<b>Tipo di nanosistema</b>	<b>Classificazione chimica</b>	<b>Riferimento bibliografico</b>
<b>Imwitor 900 (Gliceril monostearato)</b>	SLN	Lipide	Menhert et al
<b>Compritol ATO 888 (Glicerol Beenato)</b>	SLN	Lipide	Menehert et al.
<b>Precirol ATO5 (Gliceril palmitostearato)</b>	SLN	Lipide	Menehert et al.
<b>Witepsol W35, H35, H42, E85</b>	SLN	Lipide	Menehert et al.
<b>PLA (Acido polilattico)</b>	Nanoparticelle polimeriche	Omopolimeri sintetici	Vauthier e Bouchemal
<b>PLGA (Acido polilattico-co-glicolico)</b>	Nanoparticelle polimeriche	Polimeri sintetici	Vauthier e Bouchemal
<b>Eudragit (Acidi poliacrilati e polimetacrilati)</b>	Nanoparticelle polimeriche	Omopolimeri sintetici	Vauthier e Bouchemal
<b>Chitosano</b>	Nanoparticelle polimeriche	Polimeri naturali	Vauthier e Bouchemal
<b>Alginato</b>	Nanoparticelle polimeriche	Polimeri naturali	Vauthier e Bouchemal
<b>Gelatina</b>	Nanoparticelle polimeriche	Polimeri naturali	Vauthier e Bouchemal
<b>Albumina</b>	Nanoparticelle polimeriche	Polimeri naturali	Vauthier e Bouchemal
<b>Ciclodestrine e derivati</b>	Nanoparticelle polimeriche	Polimeri naturali e semisintetici	Hedges

Tabella 3: Esempi di materiali polimerici e lipidici usati per la preparazione di nanoparticelle.

### ***1.3 Le ciclodestrine***

Le ciclodestrine (CD) sono oligosaccaridi ciclici costituiti da un massimo di 10 unità zuccherine e sono ottenute dalla conversione enzimatica dell'amido per reazione di transglicosilazione intramolecolare ad opera della ciclodestrina-glucoamyltransferasi (CGTasi).

Dal processo enzimatico si ottengono molecole di forma lineare: le *destrine*. In soluzione acquosa le destrine lineari si dispongono a formare una spirale elicoidale costituita da molecole glucosidiche legate fra loro in posizione 1,4. La CGTasi può staccare una porzione molecolare delle destrine e legare fra loro le due estremità del frammento dando origine alla ciclodestrina (Loftsson et al.). A causa dell'impossibilità di ruotare nei punti di connessione, le ciclodestrine non sono molecole perfettamente cilindriche, ma prendono forma di toroide o di tronco di cono (Loftsson et al., Zhu et al). Tutti i gruppi ossidrilici sono orientati verso la porzione esterna del toroide: quelli primari verso la porzione più stretta, mentre quelli secondari verso la più larga (Figura 1).

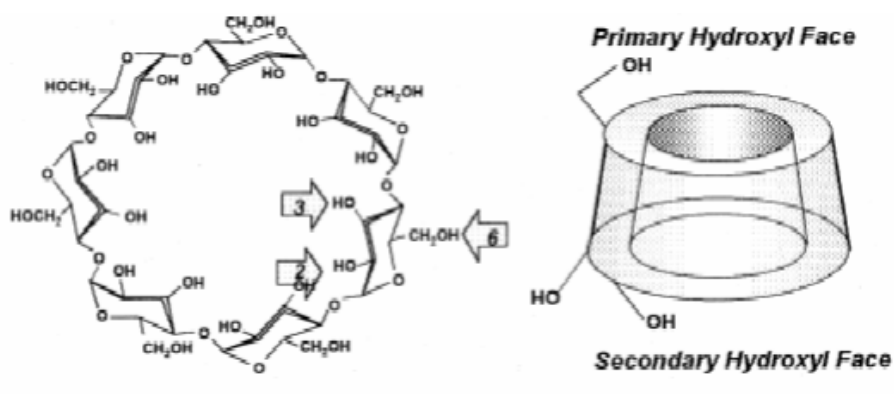


Figura 1: Schematizzazione della molecola (o struttura) di una ciclodestrina.

A seconda del numero di unità glucosidiche si hanno diversi tipi di ciclodestrine, più precisamente quattro tipi, distinte con una lettera greca (Tabella 4):

$\alpha$ -CD: è la più piccola ed è costituita da 6 unità glucosidiche.

$\beta$ -CD: è una delle più usate in campo farmaceutico e presenta 7 unità glucosidiche

$\gamma$ -CD: ha 8 unità glucosidiche

$\delta$ -CD: è la più grande ed è costituita da 9 unità glucosidiche.

Type of CD	Cavity Diameter Å	Molecular Weight	Solubility (g/100 mL)
$\alpha$ -CD	4.7–5.3	972	14.5
$\beta$ -CD	6.0–6.5	1135	1.85
$\gamma$ -CD	7.5–8.3	1297	23.2
$\delta$ -CD	10.3–11.2	1459	8.19

Tabella 4: Caratteristiche chimico-fisiche dei 4 principali tipi di ciclodestrine non funzionalizzate.

Attualmente viene prodotto un numero notevole di ciclodestrine derivatizzate allo scopo di ottenere polimeri sempre più versatili nelle varie applicazioni sia in campo farmaceutico che chimico.(Singh et al). Le variazioni molecolari presenti su questi tipi di polisaccaridi modificati sono relative al tipo di sostituente, alla sua posizione e al grado di sostituzione. Quest'ultimo, da solo, non è capace di differenziare le ciclodestrine derivatizzate: infatti, pur avendo spesso lo stesso grado di sostituzione, le ciclodestrine non sono uguali fra loro poiché i gruppi sostituenti possono occupare posizioni diverse.

Il grado di sostituzione delle ciclodestrine è dato dal numero medio di gruppi ossidrilici sostituiti in rapporto al numero di unità di glucopiranosio contenute nell'anello delle ciclodestrine (Challa et al).

All'interno delle ciclodestrine possono essere complessati diversi farmaci in funzione delle dimensioni della cavità delle ciclodestrine stesse, generalmente le  $\alpha$  hanno un diametro troppo piccolo per includere la maggior parte dei farmaci, le  $\gamma$  sono, al contrario, troppo grandi e la loro produzione è troppo dispendiosa. Il processo di complessazione dipende anche dalla conformazione della molecola che si vuole internalizzare nella ciclodestrina; Lofftson et al. mostrano come la formazione di complessi d'inclusione fra le CD e diversi farmaci è dovuta alla capacità del polisaccaride di inglobare all'interno della sua cavità un'intera molecola o parte di essa. I legami non covalenti fra CD e farmaco si possono formare e rompere continuamente: in ambiente acquoso è possibile ritrovare le molecole del farmaco allo stato libero in equilibrio con molecole legate alla cavità delle CD. La forza principale che permette la formazione del complesso è la presenza di molecole d'acqua entalpicamente ricche che non sono in grado di soddisfare la formazione di tutti i possibili legami idrogeno all'interno della cavità molecolare; l'energia del sistema diminuisce quindi solo quando le molecole d'acqua vengono sostituite da una molecola meno polare dell'acqua. Le altre forze che favoriscono la

formazione del complesso sono legami di tipo idrofobico, forze di Van Der Waals e interazioni ioniche (Loftsson et al.).

Nella figura sottostante sono riportati alcuni esempi di formazione di complessi farmaco-ciclodestrina nel rapporto molare 1:1. La loro formazione è determinata dall'equilibrio di legame fra i due componenti il complesso; solitamente la durata del legame farmaco ciclodestrina è di breve durata (circa 1 secondo), tuttavia la reazione è strettamente basata su un rapporto equilibrato di formazione e scissione del complesso molto rapido. (Challa et al)

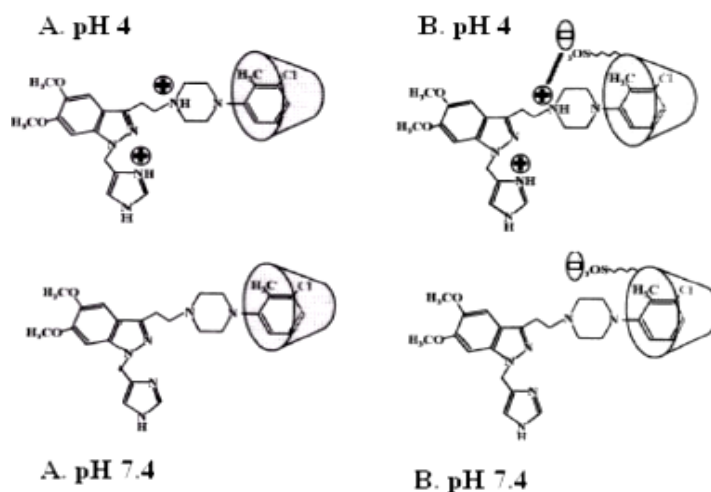


Figura 2: Esempi di formazione del complesso farmaco: ciclodestrina in rapporto 1:1

Grazie a tale caratteristica le ciclodestrine giocano un ruolo di notevole importanza nelle formulazioni di farmaci meno polari dell'acqua poiché esse possono aumentare la solubilità apparente del farmaco in seguito alla sua complessazione (Bibby et al, Uekama et al). Le ciclodestrine possono essere usate come carriers idrofilici per principi attivi con particolari caratteristiche molecolari come per esempio il Piroxicam, avente un anello piridinico in grado di entrare all'interno della cavità del polimero (Challa et al). Esse migliorano la biodisponibilità di farmaci insolubili in mezzo acquoso poiché ne aumentano la solubilità e la capacità di permeare le membrane biologiche. La  $\beta$ -ciclodestrina e suoi derivati sono state utilizzate per complessare diversi tipi di farmaci (Challa et al, Hedges) e attualmente le ciclodestrine sono presenti nella composizione di formulazioni destinate alla somministrazione orale, parenterale, oculare, nasale e dermica di vari farmaci; alcuni esempi di farmaci in commercio complessati con ciclodestrine sono riportati in Tabella 5.

<b>Derivato della <math>\beta</math>- ciclodestrina</b>	<b>Farmaco</b>		<b>Attività</b>
	Diltiazem	✓	Rilascio controllato orale
	Nitroglicerina	✓	Rilascio controllato sottocutaneo
<b>Dietil <math>\beta</math>-CD</b>	Isosorbidedinitrato	✓	Rilascio controllato sottocutaneo
<b>Triacetil- <math>\beta</math>-CD</b>	Acido flufenamico	✓	Rilascio prolungato orale
<b>Peracetil- <math>\beta</math>-CD</b>	Salbutamolo	✓	Rilascio prolungato orale
	Captopril	✓	Rilascio controllato
<b>O-carbossimetil-O- <math>\beta</math>-CD</b>	Diltiazem-HCl	✓	Rilascio ritardato uso orale

Tabella 5: Principali farmaci complessati con derivati delle  $\beta$ -ciclodestrine

Le ciclodestrine vengono inoltre impiegate per aumentare il grado di assorbimento sia di farmaci che di peptidi e proteine in quanto considerate penetration enhancer capaci di interagire con la membrana cellulare (Uekama et al, Chourasia e Jain, Duchene et al). Alcuni studi indicano che a causa della loro capacità di rimuovere il colesterolo dalle cellule, le ciclodestrine possono aumentare la fluidità delle membrane, indurre la loro invaginazione in seguito alla perdita di resistenza dei legami, e causare lisi cellulare (Anderson et al, Zheng et al).

Al fine di verificare l'effettiva tossicità di queste molecole sono tuttora in corso diversi studi di vitalità cellulare sia su colture cellulari di Caco 2 monostratificate (Hovgaard et al, Prego et al, Sandri et al) che su vescicole fosfolipidiche unilamellari costruite *in vitro* (Anderson et al, Tsamaloukas et al). Altri studi sono stati fatti per verificare il diverso grado di tossicità e la variazione del trasporto attraverso le membrane biologiche in seguito all'utilizzo di diverse ciclodestrine derivatizzate (Hovgaard et al).

#### 1.4 L'EUDRAGIT L100

Questo composto fa parte di una vasta classe di polimeri, ottenuti da copolimeri dell'acido metacrilico; in particolare, esso è composto da acido metacrilico e metilmetacrilato in rapporto percentuale 50:50 (Evonik Degussa GmbH). Questa classe di polimeri può essere suddivisa in due grandi gruppi: uno di cui fanno parte le molecole di EUDRAGIT® sensibili a variazioni del pH (Tabella 6) e un gruppo in cui fanno parte quelle con comportamento indipendente dal pH (Tabella 7). In campo farmaceutico tali polimeri sono utilizzati soprattutto come materiale di rivestimento per forme farmaceutiche orali a rilascio controllato di farmaci nel tratto gastro-intestinale.

<b>Tipo di EUDRAGIT®</b>	<b>Proprietà chimica</b>	<b>Proprietà di dissoluzione</b>	<b>Monografie +DMF</b>
L100-55 L 30 D-55	Polimeri anionici aventi l'acido metacrilico come gruppo funzionale	Dissoluzione al di sopra del pH 5,5	Ph.Eur.,USP/NF JPE,DMF 2548 Ph.Eur.,USP/NF JPE,DMF 2584
L 100		Dissoluzione al di sopra del pH 6,0	Ph.Eur.,USP/NF JPE,DMF 1242
S 100		Dissoluzione al di sopra del pH 7,0	Ph.Eur.,USP/NF JPE,DMF 1242
FS 30 D			DMF 13941

Tabella 6: Eudragit in grado di favorire il rilascio del farmaco al variare del gradiente di pH all'interno del tratto gastro-intestinale.

\*DMF: Drug Master File (documento riguardante il polimero e sottoposto alla FDA dalla casa farmaceutica produttrice).



Tipo di EUDRAGIT®	Proprietà chimica	Proprietà di dissoluzione	Monografie +DMF
RL 30 D RL PO RL 100	Copolimeri Metil-/ acrilati con trimetil-ammonioetil-metacrilati	Insolubile in ambiente acquoso Alta permeabilità Rigonfiamento pH indipendente	Ph.Eur. USP/NF JPE DMF1482
RS 30 D RSPO RS 100	come gruppi funzionali	Insolubile in ambiente acquoso Bassa permeabilità Rigonfiamento pH indipendente	Ph.Eur. USP/NF JPE DMF1482
NE 30 D NM 30 D NE 40 D	Polimeri neutri con metilacrilati	Insolubile in ambiente acquoso Bassa permeabilità Rigonfiamento pH indipendente	Ph.Eur JPE DMF 2822

Tabella 7: Eudragit in grado di favorire il rilascio del farmaco indipendentemente dal variare del gradiente di pH all'interno del tratto gastro-intestinale

### 1.5 Compritol ATO 888

Il compritol è una miscela di glicerolo e derivati dell'acido benico, ha origine esclusivamente vegetale, esso viene usato sia per stabilizzare e strutturare le emulsioni che per formulare gel anidri o per altre applicazioni in campo chimico e in campo specificamente farmaceutico. Esso è perfettamente compatibile con qualsiasi tipo di olio e consente di ispessire la fase grassa di un'emulsione, regolare la consistenza degli oli e creare gel anidri ultra morbidi.

Ha numerosi vantaggi: grazie alla sua struttura specifica e al suo punto di fusione relativamente elevato rafforza la viscosità e la stabilità delle emulsioni alla temperatura, migliora la consistenza, la morbidezza e la sensazione vellutata delle emulsioni, e il «play time» delle creme da massaggio ([www.gattefosseitalia.it](http://www.gattefosseitalia.it)).

Il Compritol in campo farmaceutico può essere usato come lubrificante o come eccipiente all'interno di forme farmaceutiche a rilascio controllato. Infatti, è utilizzato in quantità pari al 10-20% in peso per lo sviluppo di compresse poiché è in grado di formare una matrice inerte che "in-vivo" rilascia lentamente il principio attivo attraverso il metodo dell'erosione/diffusione. Inoltre è impiegato in percentuale compresa fra il 2 e il 20% per il processo di rivestimento a caldo (Gattecoat® process) in cui le molecole di farmaco vengono rivestite dal lipide e possono successivamente essere formulate con altri eccipienti all'interno di compresse in grado di controllare il rilascio del farmaco. ([www.gattefossecanada.ca](http://www.gattefossecanada.ca)).

## ***1.6 Il tratto gastro-intestinale e il rilascio sito specifico di farmaci e vaccini***

### **1.6.1 Caratteristiche anatomico-fisiologiche**

L'assorbimento dei farmaci somministrati attraverso la via orale può avvenire nello stomaco oppure nell'intestino. Quest'ultimo può essere distinto in due parti principali, intestino tenue e intestino crasso. L'intestino tenue fa seguito allo stomaco in corrispondenza del piloro e giunge fino alla valvola ileo-ciecale, dove continua con l'intestino crasso. È il più lungo tratto del canale alimentare ed è costituito da due parti di differente lunghezza: una prima parte chiamata duodeno che misura circa 25-30 cm; una seconda parte, detta intestino mesenterico, lunga poco meno di 7 m.

L'intestino crasso fa seguito al tenue in corrispondenza della valvola ileo-ciecale e termina in corrispondenza dell'ano. È lungo circa 1,70 m ed ha un calibro maggiore dell'intestino tenue, raggiungendo un diametro di circa 7-8 cm (contro i 4 cm del tenue). Esso risulta suddiviso in 3 parti: intestino cieco, colon, e retto. La mucosa dell'intestino crasso si differenzia da quella del tenue in quanto non sono presenti i villi intestinali. Al contrario, vi sono diverse ghiandole secernenti grandi quantità di muco, la cui funzione consiste nell'unire e lubrificare le varie sostanze di scarto per garantirne il passaggio nel retto e la successiva espulsione. Nell'intestino crasso vengono assorbiti sali e acqua; lo scarto solido forma le feci. Il colon è suddiviso in cinque porzioni principali: colon destro, trasverso, colon sinistro (o discendente), colon sigmoideo o sigma e retto (Cattaneo). La complessità dell'intestino non è legata esclusivamente alle caratteristiche morfologiche ma anche a diversi fattori quali il pH, il tempo di transito del cibo, la pressione intestinale, gli enzimi e la presenza di batteri che hanno un ruolo fondamentale nell'omeostasi intestinale.

#### *La flora intestinale*

Diversi studi hanno dimostrato che all'interno dell'intestino sono presenti un notevole numero di batteri sia aerobi che anaerobi. I generi predominanti negli umani sono bacteroidi,

bifidobatteri, eubatteri, clostridi, peptococchi, peptostreptococchi e rumino cocchi, mentre escherichia, enterobatteri, enterococchi, klebsiella, lactobacilli, proteus, etc sono specie presenti ma non dominanti. La microflora batterica ha diverse funzioni:

- **Metabolica:** Favorisce la fermentazione di residui di nutrienti non digeribili lungo il tratto superiore dell'intestino, produzione delle vitamina K e assorbimento di ioni.
- **Trofica:** Controllano la proliferazione e la differenziazione delle cellule nonché sviluppano e garantiscono l'omeostasi del sistema immunitario.
- **Protettiva:** protezione contro agenti patogeni (effetto barriera) (Guarner et al).

L'intestino si presenta non solamente come un organo deputato alla digestione ma anche come il sito in cui si ha lo sviluppo di gran parte delle risposte immunitarie dell'organismo a causa della presenza delle Placche di Peyer.

Le placche di Peyer insieme ai nodi linfatici mesenterici fanno parte del tessuto linfoide presente nell'intestino (McI Mowat et al). Esso è in grado di discriminare fra antigeni nocivi o meno e mantenere l'omeostasi intestinale proprio grazie alla presenza delle placche di Peyer che fungono da siti induttivi della risposta immunitaria. (Mason et al).

La mucosa associata al tessuto linfoide è separata dal lumen intestinale per mezzo dell'epitelio follicolare associato, composto da enterociti e cellule M, queste ultime considerate la via d'ingresso principale degli agenti patogeni. Le cellule M sono caratterizzate da un orletto a spazzola disordinato e da uno strato di muco ridotto, la loro porzione basolaterale è invaginata per ospitare i linfociti.

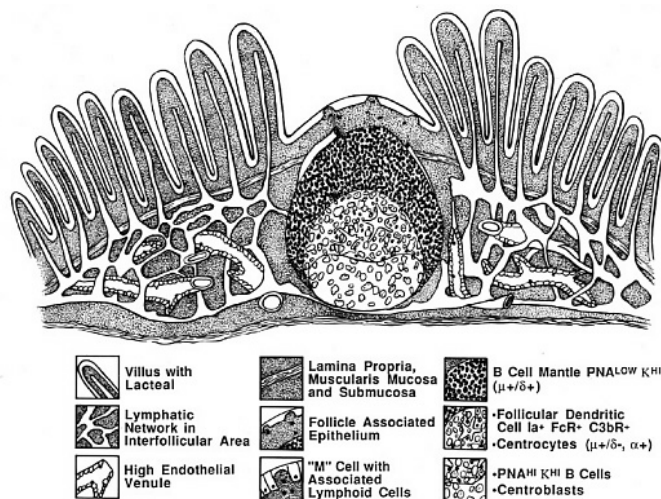


Figura 5: Rappresentazione della placca di Peyer.

Il compito principale delle cellule M è l'*uptake* dell'antigene mediante l'interazione della membrana apicale con quest'ultimo e il suo trasporto verso la zona baso-laterale. L'ottimizzazione dell'endocitosi e l'accesso dell'antigene sulla porzione basolaterale garantiscono il contatto dell'antigene stesso con le cellule APC (antigen presenting cells) che si trovano nella membrana basolaterale (Garinot et al) e che determinano l'insorgenza della risposta immunitaria in seguito alla stimolazione dei linfociti CD4+ detti anche linfociti T *helper*.

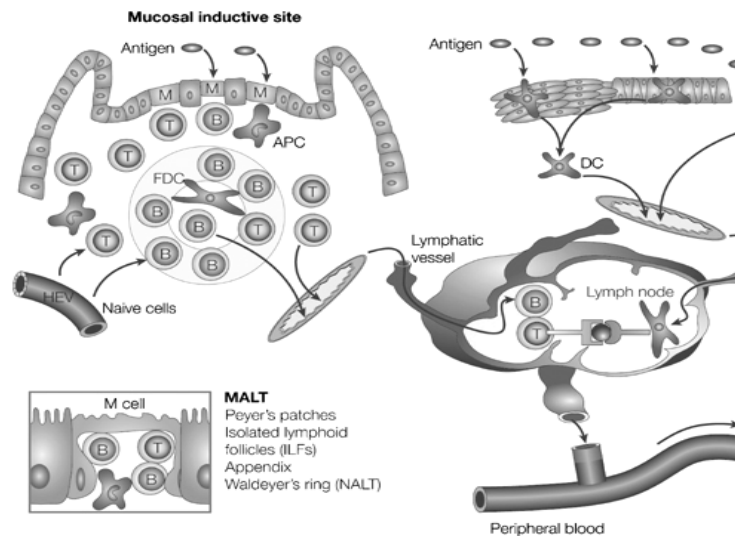


Figura 6 Rappresentazione schematica del meccanismo di induzione immunitaria nell'intestino

Le nanoparticelle sono in grado di stimolare o sopprimere la risposta immunitaria in seguito al loro legame con le proteine della membrana cellulare e al tipo di proteina o vaccino che veicolano.

Studi preclinici hanno dimostrato che le nanoparticelle non hanno maggiore attività immunotossica rispetto alle forme farmaceutiche convenzionali (Dobrovolskaia), ma anzi l'attività immunogenica delle nanoparticelle veicolanti vaccini è proporzionale alle dimensioni particellari, infatti particelle aventi dimensioni inferiori ai 10 $\mu$ m hanno maggiore attività immunogenica rispetto a quelle di dimensioni maggiori (Borges et al), tale effetto è strettamente legato alla capacità da parte delle APC di fagocitare con più facilità le particelle di dimensioni minori (O'Hagan et al).

### 1.6.2 La somministrazione colon-specifica di farmaci

La somministrazione orale dei farmaci è senz'altro la via più semplice, la più seguita e la più accettata dai pazienti soprattutto per la cura di patologie croniche; tuttavia essa rappresenta una sfida continua per chi studia nuove forme farmaceutiche atte a garantire il raggiungimento di un buon profilo farmacocinetico in seguito ad assorbimento di farmaci nel tratto GI (Ali-Asghar e Chandran).

Tale via presenta una serie di ostacoli come le barriere morfologiche date dai microvilli e dallo strato di muco presenti sia nello stomaco che in diverse porzioni dell'intestino (Francis et al), le differenze di pH, le differenze di pressione del lumen e da altri fattori di varia origine (Fetzner et al). Per esempio lo stato di salute del lumen, la somministrazione contemporanea di più farmaci, la posizione del corpo, il tipo di cibo possono essere fattori che influenzano l'assorbimento dei farmaci. Inoltre all'interno dell'intestino sono presenti circa 300-500 specie di batteri che sono in grado di influenzare l'omeostasi intestinale, favorire l'insorgenza di varie malattie oppure avere benefici sulla salute dell'ospite (Guarner e Malagelada).

Un farmaco che viene difficilmente assorbito attraverso la mucosa intestinale ha solitamente proprietà chimico-fisiche ben definite che sottostanno alla cosiddetta "rule-of-five" anche conosciuta come "Lipinski's rule of drug-likeness". Tale regola stabilisce che uno scarso assorbimento o una scarsa permeazione sono più probabili quando:

- ci siano più di cinque sostituenti donatori di H per la formazione di legami idrogeno (espressi dalla somma dei sostituenti –OH e –NH)
- Ci siano più di dieci sostituenti accettori di H per la formazione del legame idrogeno (espressi dalla somma degli O e degli N)
- Il peso molecolare sia superiore a 500kDa
- Il logaritmo del coefficiente di ripartizione (log P) sia maggiore di 5.

Un'altra proprietà importante ai fini dell'assorbimento intestinale è la solubilità del farmaco all'interno dei fluidi biologici, che è dovuta alle dimensioni molecolari del farmaco, alla polarità, e alla formazione di legami idrogeno (Zhang et al).

Un altro metodo per stabilire la biodisponibilità di un farmaco in seguito ad assorbimento intestinale è stato ideato da Amidon, definito come *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) e diffuso dalla FDA (<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm128219.htm>). Tale sistema individua quattro categorie di molecole identificandone i fattori limitanti la biodisponibilità:

- **Classe I - elevata Permeabilità, elevata Solubilità**
  - Esempio: Metoprololo

Questi composti sono ben assorbiti e la velocità di assorbimento è solitamente più elevata dell'escrezione.

- **Classe II - Elevata Permeabilità, Bassa Solubilità**

- Esempio: Glibenclamide

La biodisponibilità di tali farmaci è limitata dalla velocità di dissoluzione.

- **Classe III - Bassa Permeabilità, Elevata Solubilità**

- Esempio: Cimetidina

L'assorbimento è limitato dalla velocità di permeazione, ma il farmaco è dissolto rapidamente nel mezzo. Sono necessari promotori dell'assorbimento.

- **Classe IV - Bassa Permeabilità, Bassa Solubilità**

- Esempio: Idroclorotiazide

Questi composti hanno scarsa biodisponibilità, solitamente non sono ben assorbiti attraverso la mucosa intestinale e ci si aspetta un'elevata variabilità comportamentale.

Un farmaco viene considerato molto solubile quando la massima quantità di principio attivo solubile in acqua è maggiormente solubile in meno di 250ml di acqua piuttosto che in tampone avente *range* di pH da 1 a 7,5.

Viene considerato molto permeabile quando il grado di assorbimento del farmaco è maggiore del 90% della dose somministrata.

Un farmaco viene considerato in grado di dissolversi rapidamente quando più del 85% della sostanza si dissolve nell'arco di 30 minuti all'interno di un apparecchio USP di tipo I o II in un volume di tampone inferiore a 900ml.

Nel colon è particolarmente favorito l'assorbimento di farmaci poco biodisponibili; ciò è dato dal fatto che si ha una diminuzione della degradazione enzimatica a causa dell'assenza di endopeptidasi presenti nello stomaco (Chourasia e Jain) e un aumento del tempo di permanenza del farmaco lungo il tratto intestinale che nel colon può durare fino a 33 ore negli uomini e fino a 47 nelle donne (Ali-Asghar e Chandran).

Il rilascio controllato dei farmaci a livello del colon rappresenta un approccio vantaggioso per favorire la biodisponibilità orale di farmaci destinati al trattamento di malattie che seguono il ritmo circadiano come per esempio l'asma e l'artrite reumatoide (Cheng et al). Uno studio effettuato su pazienti affetti da artrite reumatoide ha evidenziato come questa malattia segua ritmi circadiani, con l'acuirsi della sintomatologia nelle prime ore del mattino.

Al fine di ottenere il rilascio colon-specifico di farmaci somministrati attraverso la via orale è necessario veicolarli all'interno di formulazioni in grado di inibire il rilascio del farmaco

all'interno dello stomaco e dell'intestino tenue e di garantirne il rilascio all'interno del colon stesso. Tuttavia il raggiungimento di un tale obiettivo appare difficile poiché le formulazioni sono esposte a diverse condizioni ambientali durante il passaggio attraverso il tratto GI. Diversi polimeri a partire dalla famiglia degli Eudragit sono stati prodotti a tale scopo. (Basit).

- **Il Diclofenac Sodico**

Il diclofenac sodico è un farmaco appartenente alla classe dei Fans (farmaci antinfiammatori non steroidei). Esso è un derivato dell'acido fenilacetico sviluppato specificamente come agente antinfiammatorio.

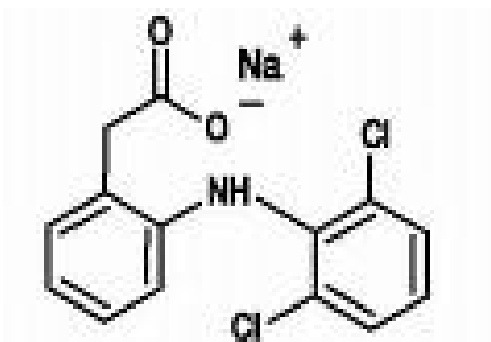


Figura 7: Struttura chimica dell'acido diclorofenilamminoacetico sale sodico (Diclofenac Sodico)

Le sue proprietà analgesiche, antinfiammatorie e antipiretiche si manifestano attraverso l'inibizione della ciclossigenasi o prostaglandina endoperossido sintetasi o COX che è il primo enzima coinvolto nella sintesi delle prostaglandine, mediatori dell'infiammazione. La somministrazione assieme al cibo rallenta la velocità ma non altera l'entità dell'assorbimento. Esso presenta un notevole effetto di primo passaggio, quindi solo il 50% circa del diclofenac è disponibile nel circolo sistemico dopo somministrazione orale. Il farmaco si lega per il 99% alle proteine plasmatiche con emivita di 1-2 ore.

Dopo somministrazione orale il diclofenac si accumula nel liquido sinoviale e questo può spiegare la durata dell'effetto terapeutico che è notevolmente maggiore rispetto all'emivita plasmatica. Il Diclofenac Sodico è usato per la terapia a lungo termine in pazienti con osteoartrite, artrite reumatoide e leggere infiammazioni dei tessuti. Il diclofenac è caratterizzato da una rapida clearance sistemica per cui sono necessarie due o tre dosi giornaliere (Brunton et al).

### 1.6.3 La somministrazione colon-specifica di vaccini

La somministrazione orale è una delle vie più studiate per il *drug delivery* dei vaccini (Chourasia et al) a causa della sua natura non invasiva e dell'effettiva induzione della risposta immunitaria mucosale e sistemica in seguito al contatto delle formulazioni vaccinali con le placche di Peyer presenti nell'intestino, responsabili dell'insorgenza della maggior parte delle risposte immunitarie sistemiche. (Tyrer et al). Tuttavia un'adeguata forma farmaceutica per la somministrazione di peptidi e proteine attraverso la via orale non è stata ancora trovata (Orive et al).

Lo scarso sviluppo dei vaccini per somministrazione orale è dovuto fondamentalmente a una serie di fattori tecnici e biologici essenziali, infatti, un vaccino destinato alla somministrazione orale deve essere protetto dalla degradazione all'interno dello stomaco da parte degli enzimi necessari alla digestione al fine di poter raggiungere l'intestino in cui si trovano cellule specializzate nell'*uptake* degli antigeni conosciute come cellule M, posizionate sull'epitelio follicolare presente nelle Placche di Peyer. (Tyrer et al). Conseguentemente l'impiego di forme farmaceutiche in grado di permettere un rilascio colon-specifico di vaccini rappresenta un'importante sfida nell'ambito degli studi di *drug delivery*. Una delle strategie studiate per la somministrazione orale di vaccini è stata la incapsulazione dei vaccini in microsfele polimeriche.

a) Il PLGA come *carrier* per i vaccini somministrabili attraverso la via orale

Da diversi anni il PLA (acido polilattico) e il suo copolimero PLGA (acido polilattico -co-glicolico) vengono impiegati per lo studio di formulazioni contenenti vaccini, poiché sono in grado di favorire un rilascio prolungato dell'antigene, sono compatibili con un gran numero di vaccini, e non ultimo garantiscono un basso costo di produzione. È stato dimostrato che l'*uptake* delle particelle a base di PLGA da parte delle cellule M è dipendente dalle caratteristiche chimico-fisiche del polimero, infatti dall'aumento della sua idrofobicità dipende direttamente la sua capacità di interazione con le cellule M (Shakweh et al). Le microsfele a base di PLGA sono state le prime formulazioni veicolanti vaccini per la somministrazione orale: Il vaccino viene incapsulato all'interno della microsfera durante il processo di preparazione della microsfera stessa, che generalmente viene prodotta tramite emulsione A/O/A; ciò comporta l'esposizione della proteina ai solventi e alla fase di omogeneizzazione o sonicazione e non ultima al processo di freeze drying. Tutti questi



passaggi e la possibilità di degradazione del PLGA favoriscono la possibilità di diminuire la stabilità dell' antigene all'interno della formulazione (Cleland et al, Mundargi et al). L'efficacia di incapsulazione della proteina all'interno di nano o microparticelle è strettamente dipendente da vari fattori quali le dimensioni particellari, il peso molecolare del polimero (Blanco et al) e la sua idrofobicità (Mundargi et al). Per ovviare a tutti questi inconvenienti è stato preso in considerazione da diversi studiosi il metodo di adsorbimento della proteina sulla superficie nano particellare ma ad oggi ancora molti quesiti devono essere risolti.

#### *a) Il PLGA e il PLA*

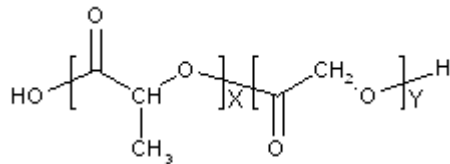
Il PLA (acido polilattico) e il suo copolimero PLGA (acido polilattico –co-glicolico) sono due poliesteri alifatici che sono stati usati in campo farmaceutico per la preparazione di diverse forme farmaceutiche, come per esempio micro particelle e nanoparticelle, a causa della loro biodegradabilità e biocompatibilità (Iwata et al) e per la loro capacità di aumentare la stabilità di vari principi attivi contro la degradazione enzimatica. Durante gli ultimi anni questo tipo di polimeri sono stati studiati come micro e nanocarriers per proteine polinucleotidi e vaccini (Cai et al).

#### *b) Il PLGA*

Il PLGA è sintetizzato a partire da due diversi monomeri: l'acido glicolico e l'acido lattico mediante un processo di catalisi. Durante la polimerizzazione le catene dei due monomeri si legano in successione fra loro mediante legami esterei per formare un polimero costituito da un poliesteri alifatico

Il PLGA si degrada a causa dell'idrolisi dei suoi legami esterei in presenza di acqua. È stato osservato che il tempo di degradazione è direttamente proporzionale al rapporto dei due monomeri, infatti, un maggior numero di molecole di acido glicolico determina un minor tempo di degradazione. Un' eccezione alla regola è data dal polimero con rapporto 50:50 che si degrada più rapidamente degli altri nell'arco di circa 2 mesi

Il PLGA scelto per lo sviluppo di questo progetto è costituito da una miscela al 50:50 di unità di acido polilattico-e di acido glicolico



x - Number of units of Lactic Acid  
y - Number of units of Glycolic Acid

Figura 8: Formula molecolare del PLGA

### c) Il PLA

Il PLA (Figura 9) è costituito da unità monometriche di Acido lattico. A causa della natura chirale di quest'ultimo esistono diverse forme di acido polilattico derivanti dalla polimerizzazione dell'acido.

A causa dell'alta temperatura di fusione, il PLA può essere utilizzato per la creazione di fibre termoplastiche e film.

Come già detto il PLGA e il PLA presentano diversa struttura molecolare e diversi pesi molecolari

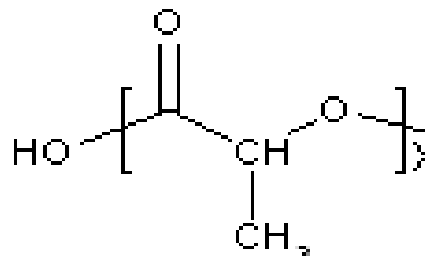


Figura 9: Formula molecolare del PLA

Il PLA scelto ha un peso molecolare di 100kDa ed è ottenuto dalla forma levogira dell'acido lattico e viene più propriamente indicato come PLLA.

### d) La tecnica dell'adsorbimento

La tecnica dell'adsorbimento è un meccanismo complesso non ancora completamente conosciuto a causa della scarsa omogeneità della superficie proteica che è in grado di cambiare continuamente conformazione determinando di conseguenza una variazione

dell'interazione con la superficie polimerica (Gong et al) . Tale tecnica è stata applicata al caricamento di sostanze di natura proteica su sistemi nano particellari.

L'Adsorbimento è basato sulla capacità delle proteine di interagire con le nanoparticelle per formare la cosiddetta “corona proteica”. Essa è costituita da uno strato dinamico di proteine che si forma in seguito al contatto fra le nanoparticelle e il fluido in cui esse si trovano disciolte. Tale fenomeno avviene non solo durante i processi tecnologici ma anche in seguito al contatto delle nanoparticelle con i fluidi biologici in vivo. La corona proteica è in grado di raggiungere un equilibrio dinamico e di legarsi alla superficie nano particellare mediante legami di diverso tipo che si basano principalmente sull'affinità della molecola proteica con il polimero che forma la nano particella. (Lynch et al).

Le formulazioni a base di PLGA hanno dimostrato notevole abilità nel favorire il legame e il rilascio di diversi antigeni adsorbiti sulla loro superficie. Tali legami sono dovuti principalmente a interazioni elettrostatiche e altri meccanismi quali forze di Van Der Waals, punto isoelettrico, interazioni idrofobiche e interazioni chimiche specifiche della proteina. È stato osservato che la capacità di legame fra le due parti è direttamente proporzionale all'area superficiale delle nanoparticelle disponibile all'adsorbimento, in particolare l'efficienza della reazione diminuisce con la saturazione dei siti di adsorbimento (Chesko et al). Diversi studi hanno dimostrato il complesso comportamento delle proteine sulle superfici solide utilizzando varie tecniche che suggeriscono la formazione di un multistrato proteico (Chesko et al) le cui caratteristiche influenzano il metodo di rilascio delle proteina nel sito di *uptake*. E' stato dimostrato infatti che la “corona” proteica presente sulla superficie di nanoparticelle di varia natura polimerica può essere spesso costituita da una porzione adsorbita in maniera irreversibile e una porzione legata reversibilmente (Lynch et al).

### ***1.7 Obiettivo del lavoro***

Il seguente lavoro è volto alla progettazione e caratterizzazione di sistemi nanoparticellari sia polimerici che solidi lipidici per la somministrazione colon-specifica di farmaci idrofili.

Il progetto può essere suddiviso in due parti:

Nella prima parte sono state prodotte nanoparticelle di tipo polimerico a base di idrossipropil- $\beta$ -ciclodestrine (HP) caricate con Diclofenac Sodico scelto come farmaco modello. Sono stati studiati i parametri tecnologici e formulativi capaci di fornire delle emulsioni stabili e di

dimensioni adeguate allo scopo e successivamente essiccabili. E' stata quindi valutata l'efficacia della HP come polimero gastro resistente e l'effetto sulla capacità di permeazione del diclofenac in confronto e in sinergia con l'Eudragit. A tale scopo è stata preparata e studiata una formulazione denominata HPDs, contenente HP e farmaco, una formulazione simile denominata HPDEs contenente anche una quantità nota di EUDRAGIT L100, noto polimero gastro-resistente e un' ultima formulazione denominata DEs priva di Ciclodestrina e contenente solo Eudragit e farmaco.

La seconda parte del lavoro si è basata sullo studio della capacità di HP di determinare un rilascio colon specifico quando presente nella composizione di nanoparticelle solide lipidiche (SLN). Per questo motivo sono state prodotte due diverse SLN: la formulazione HPDL contenente sia la ciclodestrina che il lipide e la formulazione corrispondente DL, priva di HP, al fine di osservare gli effetti dell'assenza di HP sulla formulazione.

E' stata valutata l'influenza della quantità di farmaco sulle caratteristiche chimico-fisiche e sul comportamento in-vitro ed ex-vivo delle particelle. A tal fine sono state preparate altre due serie di SLN: HPDL2 e DL2 aventi concentrazioni di farmaco dimezzate rispetto alle corrispondenti formulazioni HPDL1 e DL1.

Alcune delle SLN prodotte sono state essiccate col metodo del freeze-drying mediante l'utilizzo di crioprotettori poiché è stato spesso osservato che il processo di liofilizzazione danneggia le SLN (Shwarz et al; Zimmermann et al; Cavalli et al). L'effetto della presenza di tali sostanze sulle formulazioni prodotte e sul loro comportamento in-vitro ed ex-vivo è stato ugualmente valutato.

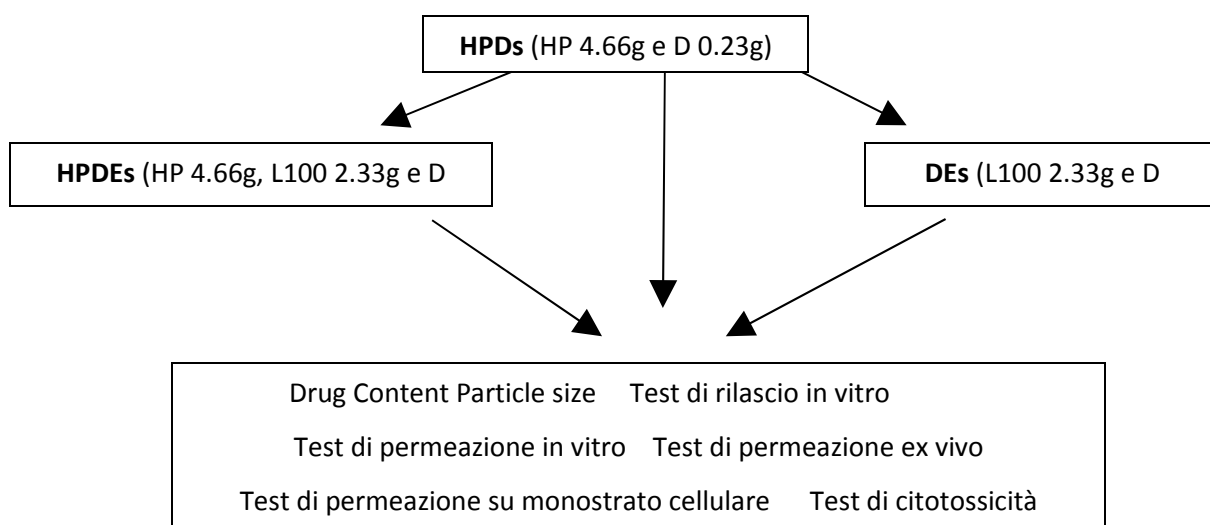
Dal punto di vista terapeutico è interessante studiare il Diclofenac Sodico come potenziale farmaco idrofilo destinato al rilascio colon-specifico a causa della sua rapida *clearance*, della necessità di più somministrazioni giornaliere in particolare durante la notte al fine di impedire l'acuirsi di malattie quali l'artrite reumatoide. Dal punto di vista formulativo il diclofenac può essere studiato come farmaco modello per la formazione di nanoparticelle a base di ciclodestrina al fine di valutare l'influenza della formazione del complesso farmaco-polimero nel comportamento in-vitro ed ex-vivo delle nanoparticelle destinate al rilascio controllato colon specifico.

Il terzo capitolo del lavoro si basa sullo studio di un nuovo metodo di veicolazione di antigeni proteici su nanoparticelle di origine polimerica. Le nanoparticelle di PLGA e PLA sviluppate durante lo studio sono ampiamente conosciute, infatti vari autori ne hanno già studiato sia i metodi di produzione sia i meccanismi di incapsulazione di farmaci di origine sintetica o di natura proteica. Il lavoro si basa sull'utilizzo di questo tipo di nanoparticelle per studiare la

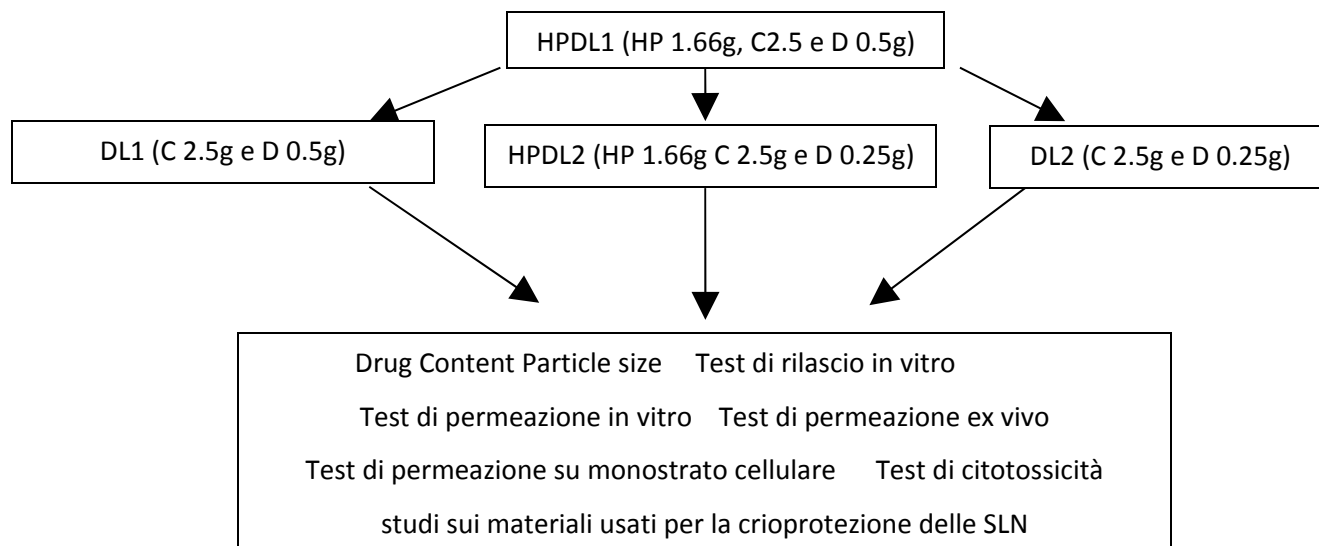
tecnica di veicolazione di antigeni proteici attraverso in processo di adsorbimento della proteina sulla superficie nanoparticellare. In particolare sono stati presi in considerazione diversi parametri in grado di influenzare in maniera più o meno significativa sia la veicolazione che il rilascio delle proteine nel sito d'azione al fine di individuare i fattori dominanti nello svolgimento di tale processo. Tale lavoro è stato svolto presso la School of Pharmacy di Londra dal aprile 2008 al dicembre 2008 sotto la guida della Prof.ssa Oya Alpar nell'ambito del progetto Erasmus attuato in collaborazione fra l'Università di Sassari e l'Università di Londra.

## SCHEMA RIASSUNTIVO DELLE FORMULAZIONI PRODOTTE E DELLE ANALISI CONDOTTE

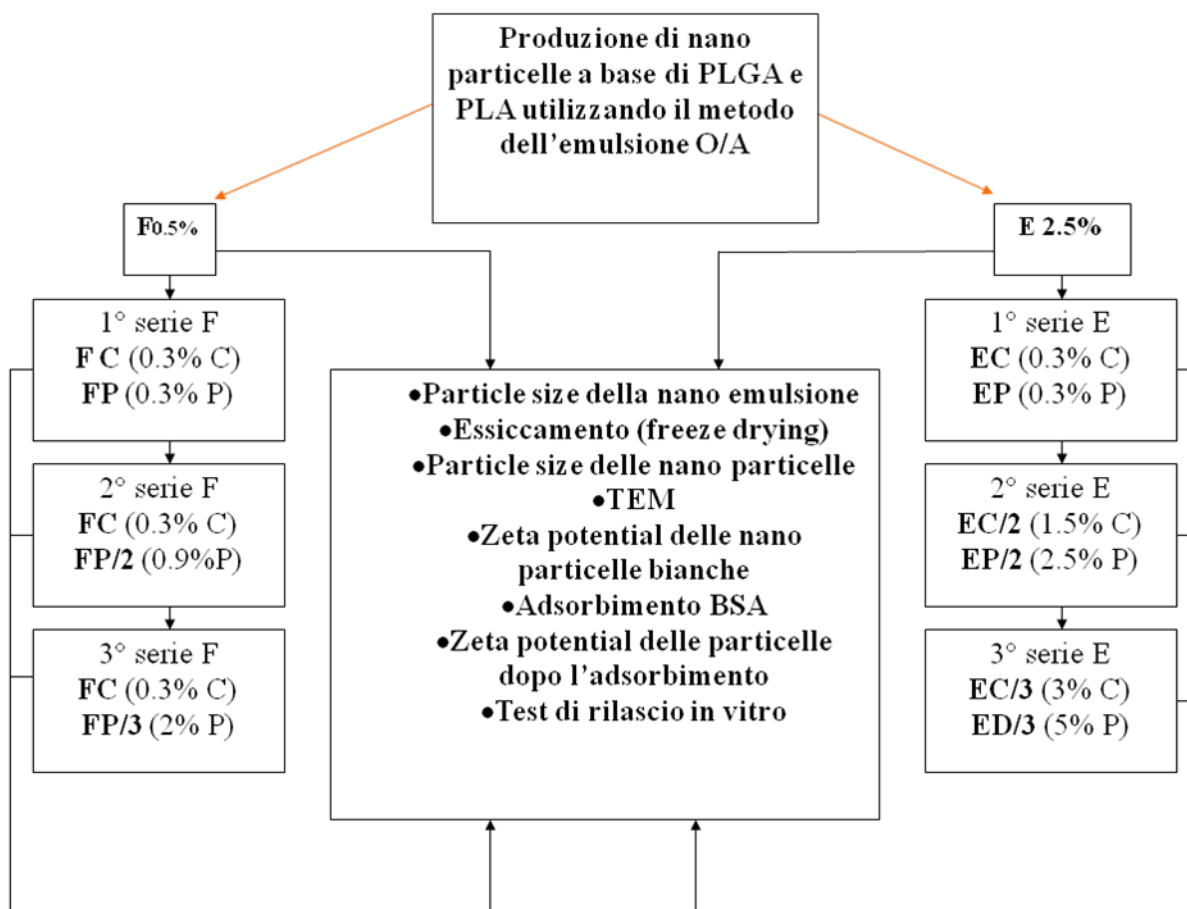
### Primo capitolo



## Secondo capitolo



### Terzo capitolo





**CAPITOLO 1: PROGETTAZIONE DI FORMULAZIONI NANO PARTICELLARI  
POLIMERICHE A BASE DI CICLO DESTRENE DESTINATE AL RILASCIO COLON  
SPECIFICO**

## 2 MATERIALI e METODI

### 2.1 Materiali

<b>1-butanolo</b>	Purissimo per analisi. Lotto n°K37211390 716 Merck, Darmstadt, Germania
<b>Acetonitrile</b>	Lotto n° 07Z6738 VWR Prolabo, EC Geddanaaksebaan 464, Leuven, Belgio
<b>Acido cloridrico 37%</b>	Lotto n°k37471017726 Merk Darmstadt, Germania
<b>Diclofenac Sodico</b>	BP-99,96% grado di purezza. Lotto n° 223/97028, Prodotti Cruciani CRUAL s.r.l., Roma, Italia
<b>Dimetilsolfossido 99,9%</b>	Lotto n° 10185ch, Sigma Aldrich A.c.s reagent, Steinheim, Germania
<b>DMEM</b>	Lotto n°311791 Gibco 41966 Invitrogen srl San Giuliano milanese, Milano, Italia
<b>Eudragit L100</b>	Lotto n° B0851203084 Rofarma Italia S.r.l. Gaggiano (Mi), Italia
<b>Gibco penicillina/streptomina</b>	Lotto n° 300847 invitrogen srl San Giuliano milanese, Milano, Italia
<b>Idrossipropil-<math>\beta</math>- ciclodestrina</b>	Cavasol Mw: 1400 g/mol, sostituzione molecolare (per unità di glucosio anidro): 0.65 Lotto n° 73B009 Wecker GmbH Monaco, Germania
<b>Metanolo</b>	Normapur. Lotto n°08G080525 Prolabo, VWR International S.A.S, Briare, Francia
<b>Nucleopore Rack-Etch Membrane</b>	Membrane di policarbonato, diametro 47 mm, porosità 0.05 $\mu$ m. Lotto n° 6348013 Whatman International Ltd. Maidstone, RegnoUnito
<b>Siero bovino fetale</b>	Lotto n°018k3395 Sigma Aldrich Steinheim, Germania
<b>Sodio fosfato dibasico dodecaidrato</b>	Per analisi Lotto n°A018292001, Acros organics, Geel, Belgio
<b>Sodio fosfato tribasico dodecaidrato</b>	Purissimo Lotto n° 62570 Riedel-de Haen, Sigma Aldrich, Steinheim, Germania

<b>Tripsina edta 0,25%</b>	Lotto n° 057k2384, Sigma Aldrich Chemie GmbH Stienheim, Germania
<b>Tween80</b>	Lotto n°A0233969 Acros Organics, Gees, Belgio

## *2.2 Apparecchiature*

<b>Omogeneizzatore NS1001L-Panda</b>	Niro Soavi S.p.A Parma, Italia
<b>Coulter nanosizer</b>	Beckman Coulter Inc. Miami, Florida, USA
<b>Dissolutore Erweka DT 70</b>	Erweka GmbH, Heusenstamm, Germania
<b>HPLC</b>	Hewlett-Packard mod.1050 con rivelatore UV, autocampionatore e integratore HP 3395, USA

## 2.3 Metodi

### 2.3.1 Individuazione dei parametri di produzione delle nanoparticelle

Una prima serie di emulsioni denominate in sequenza HP1e-4e sono state preparate utilizzando un omogeneizzatore del tipo Silverson SL2.

L'emulsificazione ottenuta con il *Silverson* è data dalla rotazione ad alta velocità delle lame del rotore che costituisce la testata di miscelazione (Figura 1); il liquido da miscelare viene aspirato dal basso verso l'alto passando attraverso le lame forate, la forza centrifuga spinge il liquido dall'interno all'esterno della testata di miscelazione, la forza idraulica che ne segue forza il liquido a passare attraverso i fori presenti sulle pareti della testata di miscelazione, il materiale espulso viene proiettato verso le pareti del vessel di miscelazione, allo stesso tempo il liquido viene indirizzato continuamente verso la testata del rotore per continuare la miscelazione ([www.silverson.com](http://www.silverson.com)).

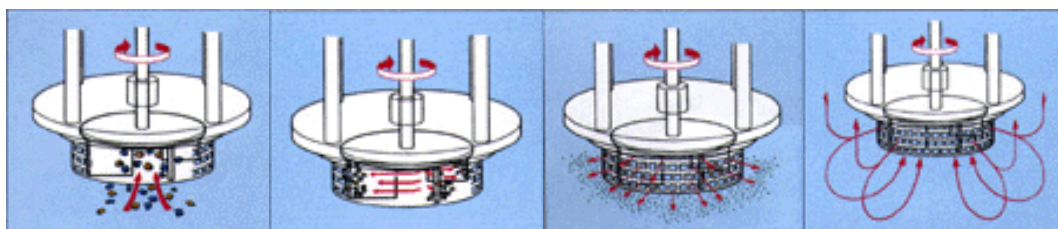


Figura 1: Metodo di emulsificazione mediante *Silverson SL2*

Nel caso di una emulsione, sia essa olio in acqua o viceversa, il passaggio attraverso la testata di miscelazione del *Silverson* determina la formazione di un'emulsione, in cui, nella fase esterna sono disperse goccioline di fase interna rese stabili dalla presenza di uno o più surfactanti (Benichou et al.). Le dimensioni delle gocce sono dovute al tempo di emulsione e alla potenza di rotazione del *Silverson*.

Durante la fase di emulsione sono state studiate le quantità di HP e del surfactante Tween80 necessari per garantire la formazione di un'emulsione stabile.

Come costituente della fase oleosa dell'emulsione è stato scelto l'1-butanololo, invece la fase acquosa è stata ottenuta mediante la dissoluzione di HP e Tween80 all'interno dell'appropriata quantità di acqua; gli esatti volumi di fase acquosa e oleosa sono stati studiati al fine di favorire la stabilità dell'emulsione.

In Tabella 1 sono riportate le quantità di polimero o surfactante e i volumi di liquidi impiegati nella produzione delle prime emulsioni A/O prodotte e tutte le variazioni apportate al fine di raggiungere una formulazione stabile.

Formulazione	H <sub>2</sub> O(ml)	1-butanolo(ml)	Tween80(ml)	HP(g)
HP1e	77	161	2.1	4.9
HP2e	77	161	2.1	7
HP3e	77	161	4.2	7
HP4e	77	161	4.9	7

Tabella.1: Composizione delle formulazioni a base di HP preparate col Silverson SL2. Le quantità dei componenti sono espresse in grammi.

L'emulsione è stata preparata dissolvendo all'interno della fase acquosa, tenuta sotto costante agitazione magnetica, l'HP e il Tween80. La fase così ottenuta è stata versata goccia a goccia all'interno della fase oleosa costituita dall'1-butanolo tenuto sotto costante agitazione magnetica. la preemulsione ottenuta è stata sottoposta a omogeneizzazione utilizzando il Silverson SL2 a una velocità di 5000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente.

Partendo dalla formulazione HP4 è stata prodotta una seconda serie di formulazioni utilizzando l'omogeneizzatore "*Panda NS100L-Panda-S.N.6890*" (*Niro Soavi S.p.A Parma, Italy*).

Questo tipo di omogeneizzatore è uno strumento costituito da una pompa volumetrica a pistoncini provvista di una specifica valvola regolabile, appositamente progettata per generare la pressione necessaria alla micronizzazione diversi materiali usati sia in campo farmaceutico che alimentare. Esso è costituito da due stadi di pressione modificabili, il 1° stadio è regolabile fino al raggiungimento di una pressione massima di 1500 bar, il 2° stadio, montato in serie rispetto al 1°, esercita una contropressione nei confronti di esso fino ad un valore massimo di 150 bar. Usando il 2° stadio è possibile ottenere una variazione della viscosità del prodotto trattato ad alta pressione con l'omogeneizzatore. Sebbene gli effetti di micronizzazione ottenuti con il 1° stadio non siano modificati, il 2° stadio riduce o aumenta la viscosità finale del prodotto e consente di ripartire il salto di pressione disponibile. Partendo dalla formulazione HPO6 è stata prodotta la formulazione HPEe contenente L100 (Tabella 2). Le formulazioni prodotte col nuovo omogeneizzatore sono state denominate consecutivamente HPO1e-HPEe e differiscono fra loro per diverse pressioni da lavoro e per le quantità dei componenti l'emulsione riassunti in Tabella 2:

Formulazione	H2O	1-butanolo	Tween80	HP	L100	Pressione(Bar) <sup>a</sup>
HPO1e	77	161	4.9	7	-	1500
HPO2e	77	161	0	7	-	1500
HPO3e	77	161	4.9	7	-	150/1500
HPO4e	77	161	2.33	7	-	100/1000
HPO5e	77	161	3.03	7	-	100/1000
HPO6e	77	161	3.03	7	-	50/800
HPEe	77	161	3.03	4.66	2.33	50/800

Tabella 2: Composizione delle formulazioni contenenti HP prodotte con l'omogeneizzatore ad alta Pressione. Tutte le quantità utilizzate sono espresse in grammi

### 2.3.2 Preparazione delle formulazioni contenenti Diclofenac Sodico

Le due formulazioni cariche HPDe e HPDEe (Tabella 3) contenenti Diclofenac Sodico quale farmaco modello sono state prodotte a partire dalle formulazioni HPO6 e HPE non cariche. Una terza formulazione denominata DE, composta esclusivamente da L100 e Diclofenac è stata fatta al fine di valutare l'effetto di HP nella formulazione. I parametri individuati durante la produzione di HPO6e sono stati mantenuti anche durante la preparazione delle successive formulazioni.

Tabella 3: Composizione delle formulazioni caricate con Diclofenac Sodico. Le quantità dei

Formulazione	acqar	1-butanolo	Tween80	HP	L100	D	Pressione (Bar)
HPDe	77	161	3.03	4.66	0	0.23	50/800
HPDEe	77	161	3.03	4.66	2.33	0.23	50/800
DEe	77	161	3.03	-	2.33	0.23	50/800

componenti sono espresse in grammi.

### **2.3.3 Processo di essiccamento delle formulazioni prodotte**

Le emulsioni prodotte sono state sottoposte ad essiccamento al fine di ottenere nanoparticelle solide.

Il processo è stato condotto utilizzando un evaporatore rotante Büchi 011 (Büchi Switzerland) a 80°C per favorire l'evaporazione della miscela azeotropica formata dall'acqua e dal butanolo. Dopo l'evaporazione del solvente le formulazioni sono state messe in stufa a 40°C per due giorni al fine di eliminare eventuali tracce di butanolo.

### **2.3.4 Analisi del diametro medio delle emulsioni e delle particelle solide**

Le emulsioni e le particelle solide sono state sottoposte ad analisi con Coulter nanosizer e caratterizzate in termini dimensionali. Questo strumento permette di misurare particelle solide o goccioline il cui diametro sia dell'ordine dei nanometri e di verificare l'omogeneità dimensionale del campione analizzato.

Il metodo di misurazione si basa sulla spettroscopia di correlazione fotonica fondata sul principio della diffrazione dinamica della luce. Il sistema di analisi prevede sei angoli di diffrazione della luce compresi fra 11 e 90 gradi che permettono di caratterizzare campioni contenenti particelle di diverse dimensioni.

La spettroscopia di correlazione fotonica è una tecnica usata per determinare il coefficiente di diffusione di piccole particelle contenute in un liquido. Il coefficiente è determinato mediante la misurazione accurata dell'intensità della luce diffratta come una funzione del tempo di interazione con le particelle.

Le particelle si diffondono all'interno delle celle di analisi con moto browniano e un raggio incidente di luce le illumina. Le particelle diffrangono la luce producendo la fluttuazione dell'intensità della diffrazione in funzione del tempo. La luce diffratta è raccolta attraverso le fibre ottiche a differenti angoli e misurata attraverso un detector ([www.beckmancoulter.com](http://www.beckmancoulter.com)).

Le emulsioni sono state analizzate prelevando circa 3 gocce, disponendole nelle apposite cuvette ed infine diluendole con circa un millilitro di 1-butanolo. Per ogni emulsione sono state eseguite tre analisi, con sviluppo successivo di un grafico che ha permesso di valutare innanzitutto il diametro medio delle nano gocce, sia i valori di Indice di polidispersione (PI).

L'I.P. è definito come la misura dell'omogeneità dimensionale delle nanoparticelle sospese in un liquido, una dispersione può essere definita omogenea o monodispersa quando il valore di I.P. è minore o uguale a 0.4.

L'esame dimensionale è stato effettuato anche sulle particelle solide ottenute in seguito ad essiccamento con rotavapor

Una piccolissima quantità pari a circa 1mg di polvere di HPO6s, HPEs, HPDs, HPDEs è stata risospesa in 1-butanolo, la sospensione è stata agitata al vortex per 1 minuto e immersa in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti, al fine di favorire la separazione di eventuali aggregati; la sospensione ottenuta è stata analizzata al Nanosizer nel modo precedentemente descritto. DE è stata sospesa in acqua acidulata al fine di evitare la dissoluzione delle nanoparticelle all'interno del butanolo ed è stata trattata secondo la procedura precedentemente descritta per le altre formulazioni. Tutte le analisi sono state condotte in triplicato al fine di calcolare il diametro medio $\pm$ DS e il PI $\pm$ DS.

### 2.3.5 Analisi al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)

La morfologia delle nanoparticelle è stata studiata al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) (Zeiss DSM 962, Zeiss, Germany). Le nanoparticelle sono state disposte su un supporto in alluminio e rivestite di una lamina d'oro (circa 25 nm di spessore), che ha la proprietà di riprodurre fedelmente la forma e la superficie delle particelle solide. Dopo il *gold sputtering*, ogni campione è stato inserito nel *probe* dello strumento, mantenuto sotto vuoto, ed investito da un fascio di elettroni primari dotati di un potenziale di accelerazione di 20 kV; in seguito alla loro collisione con la lamina d'oro sono stati emessi elettroni secondari, aventi minore energia, che sono stati raccolti ed usati per variare l'intensità di uno *spot* su uno schermo televisivo che si muove in sincronia con il fascio di elettroni. Le immagini sono state fotografate.

### 2.3.6 Analisi ai raggi X

L'analisi ai raggi X è stata fatta per valutare lo stato fisico dei polimeri e del farmaco sia prima che dopo la preparazione delle formulazioni. La tecnica della diffrazione a raggi X si basa sullo *scattering* elastico coerente: il fenomeno macroscopico della diffrazione nasce infatti dalla somma coerente di tutte le onde elettromagnetiche diffuse dagli atomi che si trovano lungo una stessa famiglia di piani reticolari. Per manifestarsi richiede necessariamente la presenza di un ordine a lungo raggio, come si riscontra nei cristalli.

In base alla natura del campione sotto esame si può parlare di diffrazione su cristallo singolo (SC-XRD, *single crystal X-ray diffraction*) o diffrazione di polveri (XRPD, *X-ray powder diffraction*).

Le determinazioni diffrattometriche sono state realizzate impiegando un diffrattometro Siemens D5000, radiazione CuK $\alpha$ , avente monocromatore in grafite sul raggio diffratto,



voltaggio 40 kV, amperaggio 30 mA, range di  $2\theta$  da  $2^\circ$  a  $70^\circ$ , step size  $0.020^\circ$  di  $2\theta$ , time per step 2 s; il software di gestione è di tipo Bruker DIFfracPlus.

Tutti i campioni sono stati analizzati a temperatura ambiente. Si è preso nota della temperatura ed umidità relativa.

I campioni analizzati sono i seguenti:

- materiali: Idrossipropilciclodestrina, Eudragit L100, Diclofenac Sodico.
- formulazioni: HPDs, HPDEs, DEs
- Miscele fisiche

Le polveri, in precedenza setacciate per eliminare eventuali aggregati, sono state disposte all'interno di un porta campioni in vetro avente un incavo che costituisce l'apposito alloggiamento del campione da analizzare. Il campione è livellato utilizzando un vetrino copri oggetti al fine di ottenere una superficie di analisi liscia. Il campione così preparato è disposto all'interno dell'apparecchiatura di analisi.

### **2.3.7 Analisi calorimetrica differenziale a scansione (DSC)**

La DSC è stata fatta per valutare la transizione termica dei polimeri, del farmaco e delle formulazioni preparate.

La DSC è una tecnica sperimentale che misura i parametri termodinamici associati con le transizioni di fase indotte termicamente. Durante l'analisi il campione e il riferimento, posti all'interno di celle di alluminio, sono riscaldati contemporaneamente e separatamente. Poiché la quantità di calore applicata ad entrambe le celle è uguale, le loro temperature aumentano linearmente nel tempo e la differenza di temperatura si mantiene a zero. Quando il campione subisce una transizione di fase indotta dalla temperatura (come la fusione) si sviluppa una differenza di temperatura tra le celle. L'energia fornita dal sistema per neutralizzare questo squilibrio è direttamente monitorata come variazione di corrente in funzione della temperatura e convertita in termogrammi che mettono in correlazione la variazione di flusso termico (in W/g) con l'aumentare della temperatura. I valori di temperatura e di entalpia sono stati misurati con un sistema Mettler Star<sup>e</sup> (Mettler Toledo, Novate Milanese, Milano, Italia) equipaggiato con una cella DSC 821<sup>e</sup> e un sistema di raffreddamento Intracooler (Julabo mod. FT 900).

Le analisi sono state condotte in atmosfera di  $N_2$  su campioni del peso di 2-5 mg (microbilancia Mettler M3) posti in crogioli di alluminio da 40  $\mu$ L. Tramite una pressa i

crogioli sono stati poi chiusi con un coperchio nel quale è stato praticato un piccolo foro con uno spillo. Come riferimento è stato utilizzato un analogo crogiolo vuoto.

### **2.3.8 Calcolo dell'efficacia di incapsulazione e del contenuto effettivo del farmaco**

Una quantità esattamente pesata di nanoparticelle (19.4mg) è stata disciolta all'interno di 100ml di tampone fosfato pH6.8 e tenuta sotto agitazione magnetica per 10 minuti a temperatura ambiente al fine di garantirne la totale dissoluzione. La quantità di D presente in soluzione è stata determinata alla lunghezza d'onda di 275nm, utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis. L'effettiva quantità di D contenuta all'interno delle nanoparticelle è stata determinata utilizzando una curva di calibrazione precedentemente calcolata ( $R^2=0.9997$ ). Le possibili interferenze della ciclodestrina, dell'Eudragit e del lipide sull'analisi spettrofotometrica sono state verificate.

L'efficacia di incapsulazione % (EE%) del farmaco all'interno delle nanoparticelle è stata ottenuta dal rapporto tra la quantità di farmaco realmente incapsulata rispetto a quella impiegata per la preparazione secondo la seguente formula:

$$EE\% = (\text{contenuto in farmaco effettivo \%} / \text{contenuto in farmaco teorico \%}) * 100$$

### **2.3.9 Test di dissoluzione**

Tutte le formulazioni essiccate sono state sottoposte a test di dissoluzione in vitro al fine di determinare i profili di rilascio del farmaco in ambiente gastrointestinale simulato.

Per lo svolgimento del test è stato utilizzato un dissolutore Erweka DT 70 a 6 vessel corredato di un sistema di agitazione a basket. L'apparecchio è conforme alle specifiche della FU XI e della USP 24.

Una quantità di nanoparticelle corrispondenti a 2.8mg di D è stata dispersa all'interno di 500ml di tampone a pH 1.2 simulante il fluido gastrico. La capacità di rilascio del farmaco all'interno del fluido è stata testata per due ore, dopodiché 123 ml di sodio fosfato tribasico 0.2M sono stati aggiunti al mezzo di analisi al fine di variare il pH fino al valore di 6.8, in seguito il test è stato condotto per le successive due ore. Ad intervalli di tempo prestabiliti 1ml esatto di fluido è stato prelevato, centrifugato e analizzato alla lunghezza d'onda di 275nm mediante uno spettrofotometro UV-Vis utilizzando la retta di calibrazione precedentemente descritta; la quantità di campione prelevata è stata sostituita con tampone fresco al fine di mantenere le condizioni sink del test. I parametri utilizzati sono stati:

- Temperatura:  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$

- Velocità agitazione: 50 giri/min

Tutti i test di dissoluzione sono stati condotti in triplicato e i risultati espressi come media  $\pm$ deviazione standard (DS).

### 2.3.10 Test di permeazione in vitro

I test di permeazione *in vitro* ed *ex vivo* sono stati condotti utilizzando un sistema a flusso continuo dotato di 3 celle messo a punto nel nostro laboratorio.

In ciascuna cella è stata applicata una membrana sintetica in policarbonato avente pori di diametro pari a  $0,05\mu\text{m}$  sulla quale è stata disposta in maniera uniforme una quantità di nanoparticelle contenenti esattamente 1mg di D. La membrana separa la formulazione dal compartimento accettore, dove corre il liquido accettore. Esso è costituito da 100ml di tampone fosfato a pH 1,2 per le prime 2 ore, nelle successive 2 ore il pH è stato portato a 6,8 attraverso l'aggiunta di 23 ml di sodio fosfato tribasico 0,2M, come descritto nella USP 24, in modo tale da simulare l'ambiente gastrointestinale.

A intervalli di tempo prestabiliti aliquote di liquido accettore (1ml) sono state prelevate e analizzate all'HPLC per determinare la quantità di farmaco permeata. La quantità prelevata è stata ripristinata con uguale volume di liquido corrispondente termostatato al fine di mantenere le condizioni *sink*.

I parametri utilizzati sono stati:

- Temperatura:  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$
- Velocità di flusso: 4.2ml/min
- Durata: 4 ore

Tutti i test di permeazione sono stati condotti in triplicato e i risultati espressi come media  $\pm$ deviazione standard (DS).

Le possibili interferenze della ciclodestrina, dell'Eudragit e del lipide sono state verificate.

### 2.3.11 Test di permeazione ex-vivo

Il test *ex vivo* è stato condotto apportando alcune variazioni al metodo utilizzato nella permeazione *in vitro*: la membrana artificiale è stata sostituita da un frammento di mucosa di intestino di maiale regolarmente macellato poco prima del prelievo. Il frammento di mucosa è stato estratto dalla porzione del colon di intestino di maiale e messo a bagno in PBS fresco per pochi minuti, al fine di eliminare residui di feci e mantenerne la vitalità del campione biologico. Il tampone PBS aiuta a mantenere costante il pH e la concentrazione dei sali in esso

contenuti corrisponde a quella fisiologica. Il procedimento di lavaggio in PBS deve essere fatto delicatamente in modo tale da non portare via lo strato di muco naturalmente presente sulle pareti interne dell'intestino; prima del suo posizionamento nella cella il frammento intestinale deve essere tagliato lungo la linea mesenterica e deve essere privato della tonaca sierosa che ne costituisce la parete esterna al fine di garantire il passaggio del farmaco attraverso la tonaca mucosa verso il liquido accettore (Mayer et al., Van de Kerkhof et al., Zheng et al).

Il liquido accettore all'interno della cella è costituito dal tampone a pH 6.8 simulante il fluido biologico presente all'interno del colon (USP 24).

Le formulazioni, contenenti ciascuna 1mg di farmaco incapsulato, sono state uniformemente disperse utilizzando una spatola sulla porzione mucosa del frammento intestinale che funge da zona di donazione del farmaco; la porzione submucosale è stata messa in diretto contatto con il liquido accettore. A intervalli di tempo prestabiliti sono stati prelevati campioni da 1 ml ed è stata valutata la concentrazione di farmaco permeata mediante analisi in HPLC. La quantità di liquido prelevata è stata ripristinata con uguale volume di soluzione corrispondente al fine di mantenere le condizioni *sink*.

I parametri utilizzati sono stati:

- Temperatura:  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Velocità di flusso: 4,2ml/min
- Durata: 4 ore

Tutti i test di permeazione sono stati condotti in triplicato e anche in questo caso i risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (DS).

Le possibili interferenze della ciclodestrina, dell'Eudragit, del lipide e di materiale biologico ceduto dalla mucosa sono state verificate.

### **2.3.12 Test di permeazione attraverso il monostrato cellulare**

Il test è stato condotto utilizzando colture cellulari immortalizzate di tipo CACO2 derivanti da adenocarcinoma del colon in grado di differenziarsi e simulare l'epitelio intestinale e perciò ampiamente usate per verificare l'assorbimento di farmaci destinati al target colon specifico.

Il monostrato cellulare è stato fatto crescere all'interno di appositi inserti porosi collocati nelle piastre di coltura. Le cellule sono state ricoperte del mezzo di crescita costituito da DMEM addizionato con 9.7% di siero fetale bovino, 1.4% di una soluzione di penicillina e

streptomycin e 1.4% di aminoacidi non essenziali. La stessa quantità di terreno è stata disposta anche all'interno dei pozzetti in modo tale da tenere immersi i supporti contenenti le cellule e garantire un adeguato ambiente di crescita. Prima di iniziare il test, il terreno di coltura è stato sostituito con lo stesso volume di soluzione tampone di Hank (HBSS) a pH 6.8 sia al di sopra dello strato cellulare sia al di sotto del supporto in modo tale da costituire due zone : una contenente il liquido donatore e una contenente il liquido accettore.

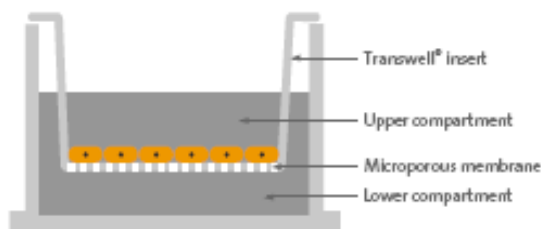


Fig 3: Rappresentazione schematica del sistema di permeazione attraverso il monostrato cellulare

Una quantità di nanoparticelle esattamente pesate pari a 10 mg/ml di D vengono uniformemente disperse sopra il monostrato cellulare. Ad intervalli di tempo prestabiliti 100µL di tampone vengono prelevati dal liquido accettore disposto al di sotto del supporto all'interno del pozzetto e sostituiti con tampone fresco al fine di mantenere le condizioni sink. La quantità di D permeata attraverso il monostrato cellulare è stata valutata mediante HPLC secondo la metodica precedentemente descritta. La vitalità cellulare è stata valutata tramite TEER e MTT test. Ciascun test è stato fatto in triplicato e i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

### 2.3.13 Studi di citotossicità

#### a) Trattamento delle colture cellulari

I test di citotossicità sono stati fatti utilizzando colture di cellule Caco2 coltivate all'interno di fiasche da 75 cm<sup>2</sup> (Nunc, Danimarca). Il mezzo di coltura è stato ottenuto utilizzando il Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), addizionato con 9.7% siero bovino fetale, 1.4% di una miscela di Penicillina e Streptomycin, 1.4% di aminoacidi non essenziali. Le cellule sono state incubate a 37°C in atmosfera controllata addizionata con il 5% di CO<sub>2</sub> fino al raggiungimento di circa 80-90% di confluenza.

Al termine della fase di crescita le cellule sono state disposte all'interno di un piatto composto da 24 pozzetti e sottoposte a contatto con i materiali utilizzati per la produzione delle nanoparticelle e con le nanoparticelle stesse al fine di verificare la loro tossicità .

#### b) MTT test

Il test di vitalità cellulare è normalmente condotto utilizzando l'MTT o (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro. Questo reagente è in grado di determinare l'attività della deidrogenasi mitocondriale che avviene all'interno delle cellule vitali. 710µL di soluzione 5mg/ml di MTT vengono versati al di sopra del monostrato cellulare precedentemente trattato con le sostanze da valutare, privato del terreno di coltura e lavato per tre volte con PBS. Le cellule messe a contatto con l'MTT vengono fatte incubare per 15 minuti dopodiché la dispersione di cristalli di Formazan formatasi viene rimossa e analizzata allo spettrofotometro UV-Vis a una lunghezza d'onda di 570nm.

I cristalli di formazan sono ottenuti secondo la reazione riportata in Figura in seguito all'ossidazione dell' NADH in NAD<sup>+</sup> da parte dell'MTT (Figura 4).

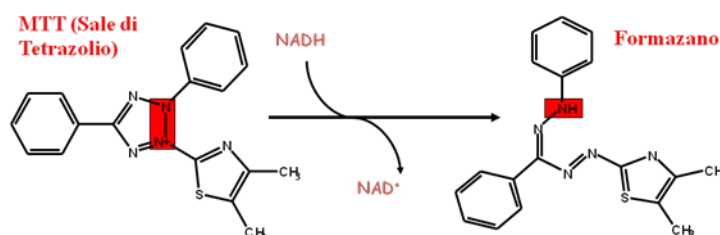


Figura 4: rappresentazione schematica della formazione dei cristalli di Formazan a partire dal MTT

#### c) Citotossicità dei componenti usati nella preparazione delle nanoparticelle

E' stato verificato l'effetto citotossico di HP, L100, Tween80, butanolo e del farmaco D.

Al di sopra del monostrato cellulare cresciuto all'interno dei pozzetti sono state disposte nel mezzo di coltura varie concentrazioni di HP comprese fra 15 e 2.5mg/ml, sono state inoltre testate anche una soluzione di 10 µL di Tween80 e di 10 µL di 1-butanolo in terreno; tali quantità corrispondono a quelle usate nella preparazione delle formulazioni preparate. Le soluzioni sono state lasciate a contatto con le cellule per 24 ore a 37°C e 5% di CO<sub>2</sub> e infine la vitalità del monostrato cellulare è stata saggiata col test precedentemente descritto. Tre pozzetti di crescita sono stati messi in incubazione in presenza del solo terreno di coltura e sono stati utilizzati come controllo di vitalità cellulare positivo.

#### d) Citotossicità delle formulazioni nanoparticellari in soluzione

Le nanoparticelle cariche HPDs, HPDEs e le nanoparticelle prive di farmaco HPEs ed HPO6s sono state lavate con 1-butanolo, centrifugate per 10 minuti a 13000rpm, private del surnatante ed essiccate a 40°C al fine di eliminare eventuali residui di Tween80 presenti sulla loro superficie.

La formulazione DE non è risultata essere lavabile in presenza né di 1-butanolo né di acqua poiché le nanoparticelle sono facilmente danneggiate da entrambi i solventi.

Le formulazioni lavate e la formulazione DE non lavata sono state sottoposte a test di citotossicità: soluzioni di terreno formate da 5mg/ml di tutte le formulazioni citate sono state preparate, versate sopra il monostrato cellulare precedentemente privato del terreno di coltura e lavato con PBS e infine messe in incubazione per 24 ore come precedentemente descritto. Al termine del periodo di incubazione è stata valutata la vitalità cellulare.

#### e) Citotossicità delle formulazioni nanoparticellari in sospensione

Una quantità esattamente pesata (5mg) di nanoparticelle cariche (HPDs, HPDEs o DEs) precedentemente lavate (fatta eccezione per DEs) sono state uniformemente disperse al di sopra del monostrato cellulare, ricoperte con 0.5ml di terreno e incubate per 24h a 37°C al fine di osservare eventuali effetti citotossici.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Sviluppo della nanoemulsione mediante l'utilizzo del *Silverson SL2*

Nella prima parte del lavoro sono stati messi a punto i parametri per la preparazione di nanoemulsioni A/O contenenti ciclodestrine. In particolare i risultati ottenuti hanno mostrato che:

- La fase organica utilizzata per la preparazione dell'emulsione deve essere costituita da 1-butanolo, poiché esso garantisce una buona stabilità del prodotto finale e allo stesso tempo è uno dei pochissimi solventi evaporabili a temperatura uguale o superiore all'acqua. I classici solventi utilizzati nella preparazione delle nanoemulsioni, infatti, hanno solitamente un punto di ebollizione molto inferiore a quello dell'acqua; tale fattore determinerebbe l'evaporazione del solvente basso bollente, il passaggio in soluzione dei polimeri solubili in acqua e la conseguente distruzione dell'emulsione. Al fine di ovviare a questo inconveniente si è scelto di formare un'emulsione acqua in

1-butanolo; questi due solventi hanno un punto di ebollizione molto simile e la loro miscela dà origine ad una miscela eutettica che evapora a circa 80°C a pressioni ridotte.

- Il rapporto ideale tra le fasi acqua-solvente organico è risultato pari a 1-2.1(p/p); questo parametro garantisce la stabilità dell'emulsione durante il tempo necessario ad effettuare le analisi dimensionali e l'essiccamento.
- Il tipo e la quantità di tensioattivo influiscono sulla possibilità di ottenere la nanoemulsione; il Tween80 è il surfactante che ha permesso di ottenere una nanoemulsione stabile, la quantità impiegata è decisiva per il risultato finale desiderato.
- Una quantità di HP compresa tra 0.7 g e 1.0 g per 11 parti di acqua risulta essere la quantità ideale di ciclodestrina da disciogliere nella fase acquosa.

L'emulsione migliore ottenuta durante la prima fase di studio è la HP4e essa appare infatti stabile nel tempo e composta da gocce aventi dimensioni comprese nell'ordine dei nanometri e bassi valori di IP. Questa formulazione è stata presa come punto di partenza per la preparazione di una seconda serie di nanoparticelle mediante l'utilizzo di un nuovo tipo di omogeneizzatore.

### ***3.2 Sviluppo di nanoemulsioni mediante l'utilizzo dell'omogeneizzatore NS 1001L-Panda-S.N.6890***

La prima modifica apportata alla produzione della serie HPO6e è stata la variazione della quantità di Tween 80 usato, come surfactante, infatti la forza di omogeneizzazione dell'apparecchiatura utilizzata risulta essere maggiore rispetto a quella dell'omogeneizzatore a testata e perciò la quantità di surfactante necessario è molto minore. Le condizioni di esercizio dello strumento appaiono avere un ruolo fondamentale sulla stabilità della preparazione e sulle dimensioni delle particelle in essa contenute.

Infatti, nelle prime formulazioni della serie è stata applicata un'unica pressione pari a 1500 bar, facendo passare per 3 volte l'emulsione nel sistema con risultati insoddisfacenti. A partire da HPO3 è stato introdotto anche il 2° stadio dell'apparecchio in grado di fornire una contropressione che può raggiungere i 200bar.

Le prove effettuate hanno dimostrato che i valori di pressione ottimali sono pari a 50/800bar; in seguito ai risultati ottenuti è stata prodotta la formulazione finale HPO6e a partire dalla quale sono state prodotte le nuove emulsioni HPEe e quelle contenenti il Diclofenac.



La formulazione HPEe è stata realizzata utilizzando la stessa procedura di preparazione di HPO6e sia nella preparazione dell'emulsione sia nella fase di omogeneizzazione, l'unica differenza rispetto alla preparazione di riferimento è nella quantità di HP utilizzata, diminuita in quantità tale da avere un rapporto HP/L100 di 2:1(p/p). Questa variazione è stata necessaria per permettere l'introduzione dell'Eudragit L100 senza che variassero le quantità finali dei polimeri presenti nell'emulsione. Le formulazioni HPDe e HPDEe sono state ottenute senza la necessità di cambiamenti nei parametri stabiliti per la produzione di HPO6e e HPEe.

### ***3.3 Processo di essiccamento delle formulazioni prodotte***

La miscela di acqua e 1-butanolo è una miscela eutettica che evapora a circa 97°C, perciò le emulsioni A/O contenenti polimeri sono state evaporate a pressione ridotta utilizzando un evaporatore rotante alla temperatura di 80°C.

Alla fine del processo, dalle formulazioni HP4e, HPO6e, HPEe, HPDe e HPDEe si ottengono dei cristalli costituiti dalle nanoparticelle ormai essiccate. Nel caso della formulazione DEe, prodotta per valutare gli effetti della ciclodestrina sulla formulazione gastroresistente, è stato necessario diminuire la temperatura di evaporazione del solvente da 80 a 60°C per poter ottenere un prodotto essiccato trattabile. Questa necessità potrebbe essere attribuita alle proprietà plasticizzanti degli Eudragit. I diversi risultati ottenuti con DEe rispetto alla HPDEe sono dovuti alla presenza di HP nella formulazione, la quale potrebbe mascherare l'effetto plasticizzante o evitarlo.

### ***3.4 Analisi dimensionale delle emulsioni e delle particelle essiccate***

Come possibile osservare dalla Tabella 4, l'emulsione HP4e, prodotta con l'utilizzo dell'omogeneizzatore a testata, ha diametro medio inferiore rispetto a quello dalle formulazione HPO6e, tuttavia un'analisi più approfondita dimostra che sia la deviazione standard del diametro medio di HPO6e che il IP sono inferiori rispetto ai dati relativi a HP4; questi fattori indicano che l'utilizzo del omogeneizzatore Panda favorisce la formazione di emulsioni più stabili e un numero inferiore di popolazioni dimensionali. Le emulsioni successive, fatta eccezione per HPEe sono caratterizzate da valori di diametro medio inferiore ai 500nm e da un PI inferiore a 0.7; tale valore indica che le formulazioni appaiono costituite da una famiglia monodimensionale di nanoparticelle. La formulazione HPEe si differenzia dalle altre formulazioni a causa dl IP più elevato, ma anch'essa come le altre emulsioni è costituita da goccioline di diametro inferiore ai 500nm.

Formulazione	HP4e	HPO6e	HPDe	HPEe	HPDEe	DEe
Diametro medio (nm)	277.5±29	360.1±13.1	425.7±94.2	314.0±58.6	497.6±16.1	262.5±9.8
P.I.	1.6±0.9	1.1±0.5	0.7±0.7	1.3±0.2	0.6±0.3	0.1±0.14

Tabella. 4: Analisi dimensionale dell'emulsione

Le formulazioni essiccate e risospese in 1-butanol ( in acqua acidulata per quanto riguarda DE) sono state sottoposte ad analisi dimensionale. Dai dati ottenuti si evince che tutte le formulazioni essiccate hanno diametro medio e IP superiori rispetto alle corrispondenti emulsioni. Tali valori possono essere dovuti alla formazione, durante il processo di essiccamento, di aggregati solidi non facilmente disperdibili durante la fase di preparazione del campione da analizzare. Le formulazioni ottenute appaiono comunque costituite da popolazioni particellari aventi diametro medio compreso nell'ordine dei nanometri e quindi considerabili formulazioni nano particellari (Tabella 5)

Formulazione	HP4s	HPO6s	HPDs	HPEs	HPDEs	DEs
Diametro medio (nm)	516.5±16	662.6±157.	516.2±59.	373.6±62.	529.8±101.	384.6±11.
P.I.	8	7	2	8	8	6
	1.9±0.4	1.1±0.5	1.1±0.2	0.9±0.6	1.1±0.4	0.4±0.023

Tabella. 5: Risultati dell'analisi dimensionale delle nanoparticelle essiccate

### 3.5 Analisi al Microscopio a Scansione elettronica (SEM)

Le formulazioni HPO6s, HPDs, HPEs e HPDEs sono state analizzate al Microscopio Elettronico a Scansione (SEM).

L'analisi morfologica delle nanoparticelle ha mostrato alcune differenze fra le formulazioni contenenti sola HP (HPO6 e HPD) e quelli contenenti HP e Eudragit (HPEs e HPDEs).

Le nanoparticelle HPO6s (Figura 5) hanno forma sferica e superficie liscia tuttavia esse appaiono parzialmente fuse, di dimensioni grandi e poco omogenee.

Le nanoparticelle HPDs (Figura 6) hanno forma sferica e superficie liscia; si osservano nanoparticelle di varie dimensioni, molte di esse risultano parzialmente formate o facenti parte di aggregati, le particelle di dimensioni più piccole invece appaiono ben formate e distinte dalle altre. Non si nota la presenza del farmaco all'esterno delle nanoparticelle.

Le nanoparticelle HPEs (Figura 7) appaiono di forma sferica, superficie liscia e sono ben formate e separate fra loro, inoltre hanno dimensioni molto piccole e omogenee.

Le nanoparticelle HPDEs (Figura 8) sono di forma sferica e dimensioni abbastanza omogenee anche se si possono notare alcuni aggregati formati da nanoparticelle di piccolissime dimensioni, anche in HPDEs, come in HPDs, si può notare la totale assenza di farmaco cristallino sulla superficie delle nanoparticelle.

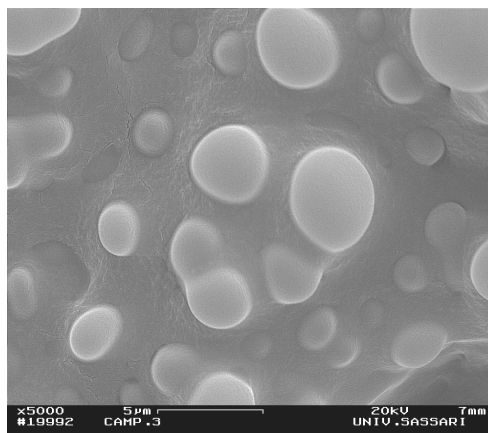


Figura 5: *Fotografia al SEM di HPO6s*

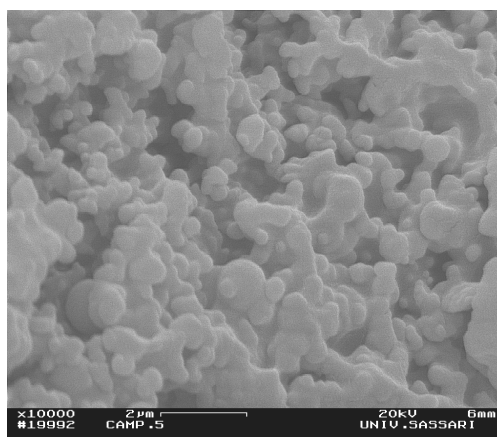


Figura 6: *Fotografia al SEM di HPDs*

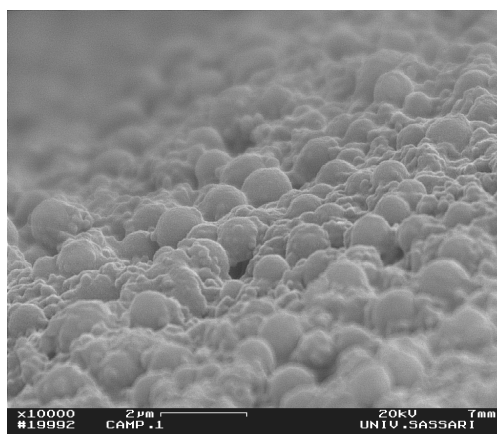


Figura 7: *Fotografia al SEM di HPE*

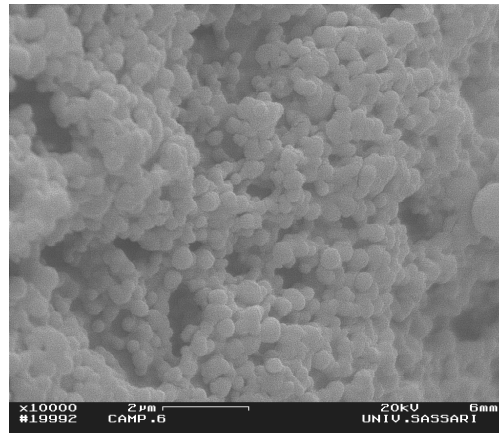


Figura 8: *Fotografia al SEM di HPDE*

### 3.6 Analisi ai raggi X

I due polimeri utilizzati per la preparazione delle nanoparticelle, rispettivamente HP e L100, mostrano diffrattogrammi tipici di sostanze amorse, sono rilevabili solamente alcuni picchi caratterizzati da un basso rapporto intensity/background Figura 9a-b.

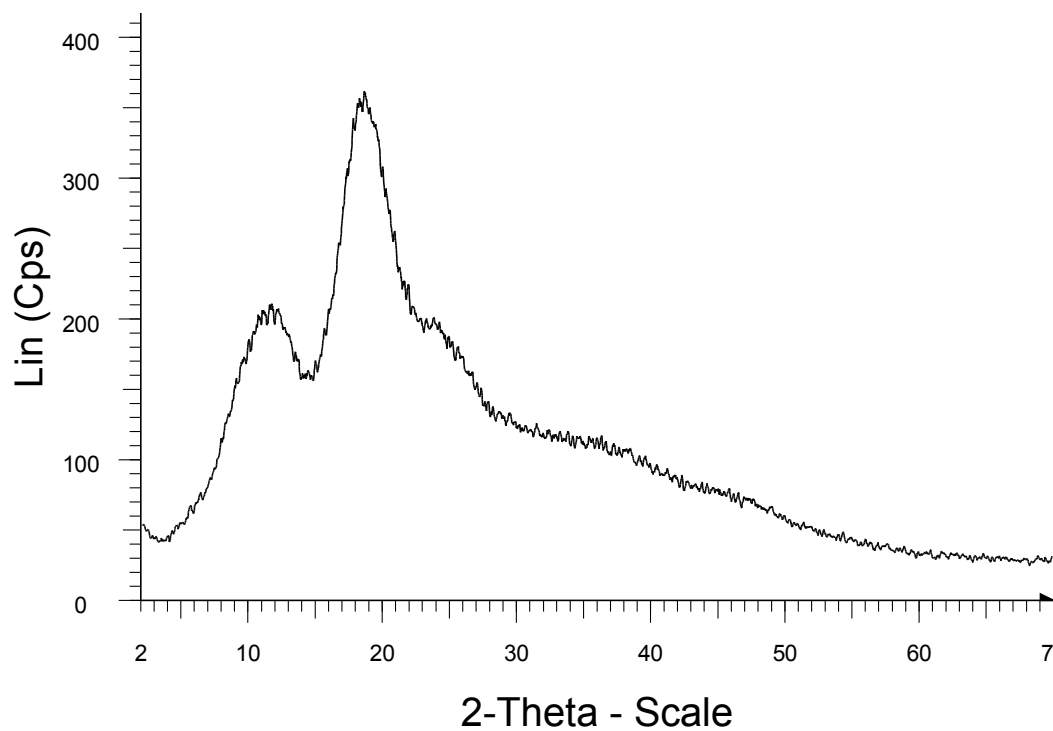


Figura 9a: diffrattogramma ai raggi X di HP

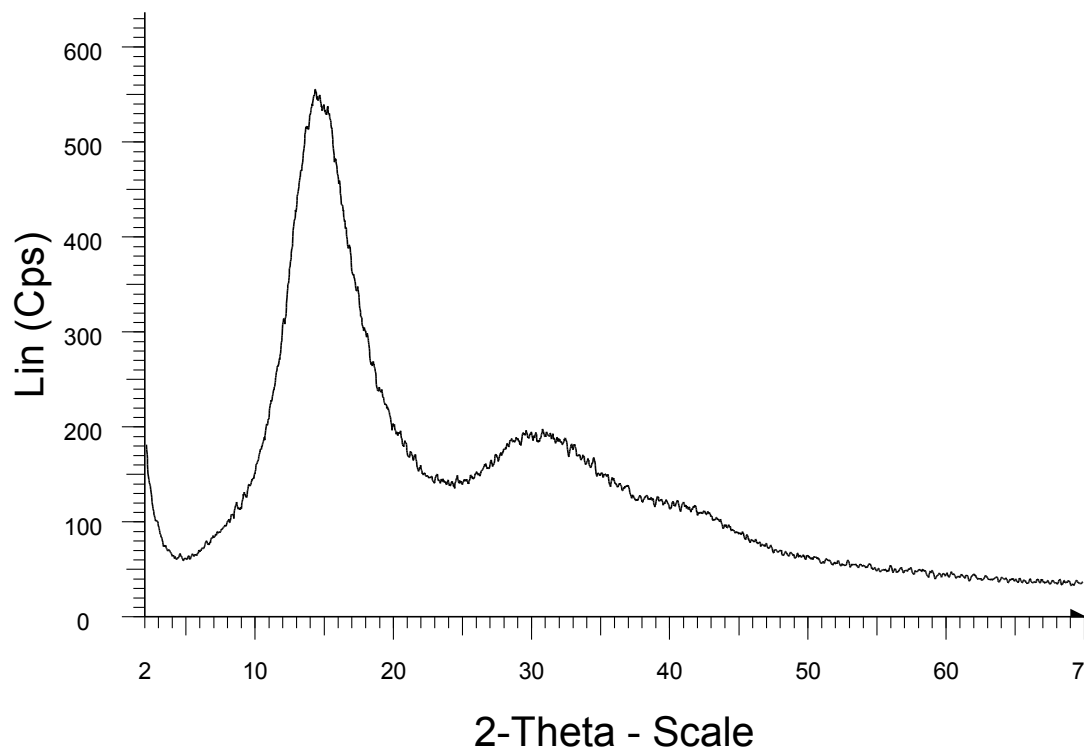


Figura 9b: Diffrattogramma ai raggi X di L100

Il Diclofenac Sodico si presenta come una sostanza cristallina e il suo diffrattogramma corrisponde a quello del D riportato nel database (file 00-039-1684)(Figura 9c)

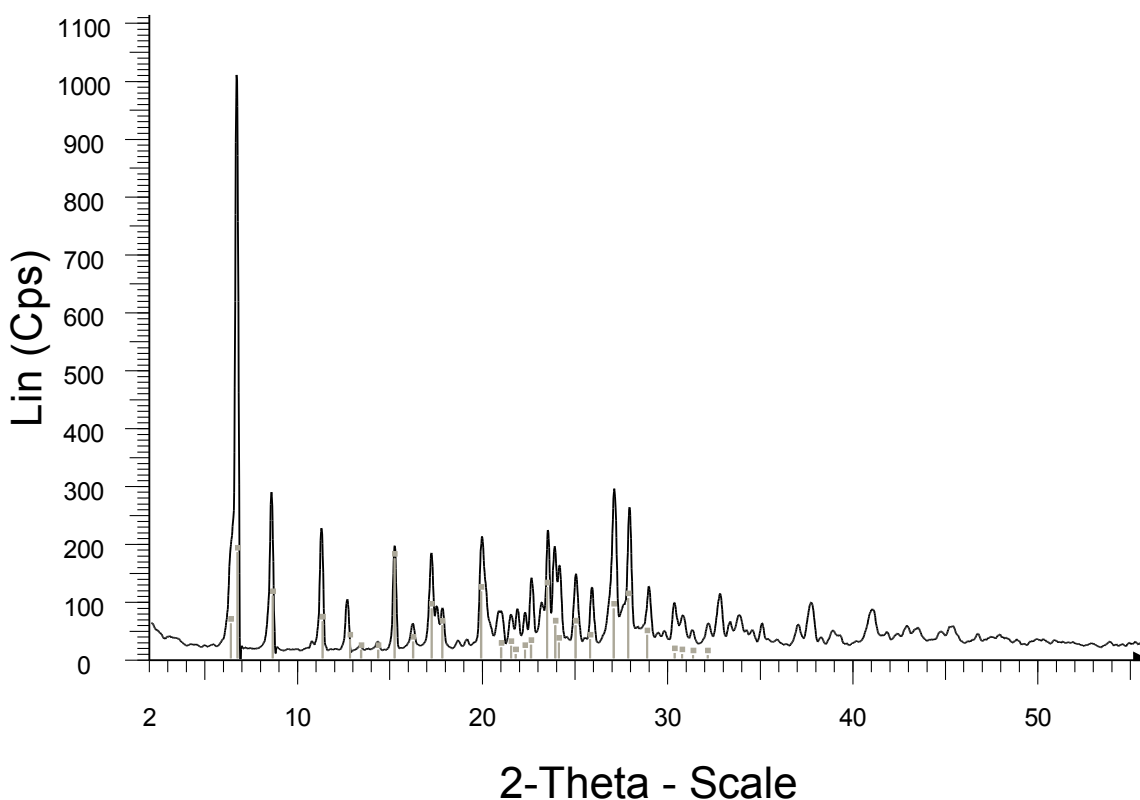


Figura 9c: Difrattogramma del Diclofenac Sodico (nero); Le barre grigie presenti nel diffrattogramma corrispondono al pattern del farmaco contenuto nel database

Tutte le formulazioni prodotte sono state sottoposte all'analisi ai raggi X e i loro diffrattogrammi sono stati confrontati con le miscele fisiche e con i materiali puri.

La formulazione HPDs mostra diffrattogrammi simili ad HP, mentre le analisi della miscela fisica (HPO6+D) mostrano oltre al profilo caratteristico di HP anche alcuni picchi riferibili al farmaco (Figura 10a).

L'assenza di tali picchi nel diffrattogramma relativo ad HPDs confermano la formazione del complesso HP:D che mascherano la presenza del farmaco stesso.

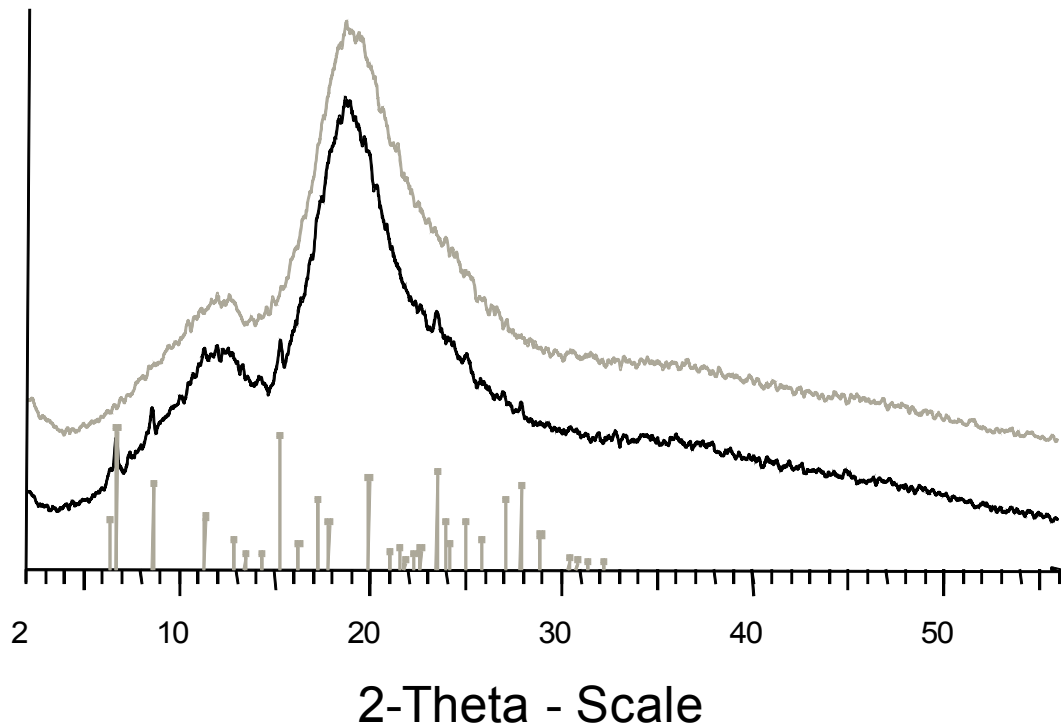


Figura 10a: Analisi ai raggi X di HPDs (grigio) confrontato con la miscela fisica HPO6S+D (nero). I Patterns sono stati spostati lungo l'asse delle Y al fine di evidenziare la loro forma.

Lo stesso fenomeno riscontrato precedentemente si osserva anche durante il confronto fra i diffrattogrammi di HPDEs e HPEs+D (Figura 10b). Anche in questo caso dai risultati ottenuti si può evincere che il processo di preparazione di HPDs e HPDEs determinano l'amorfezza del farmaco.



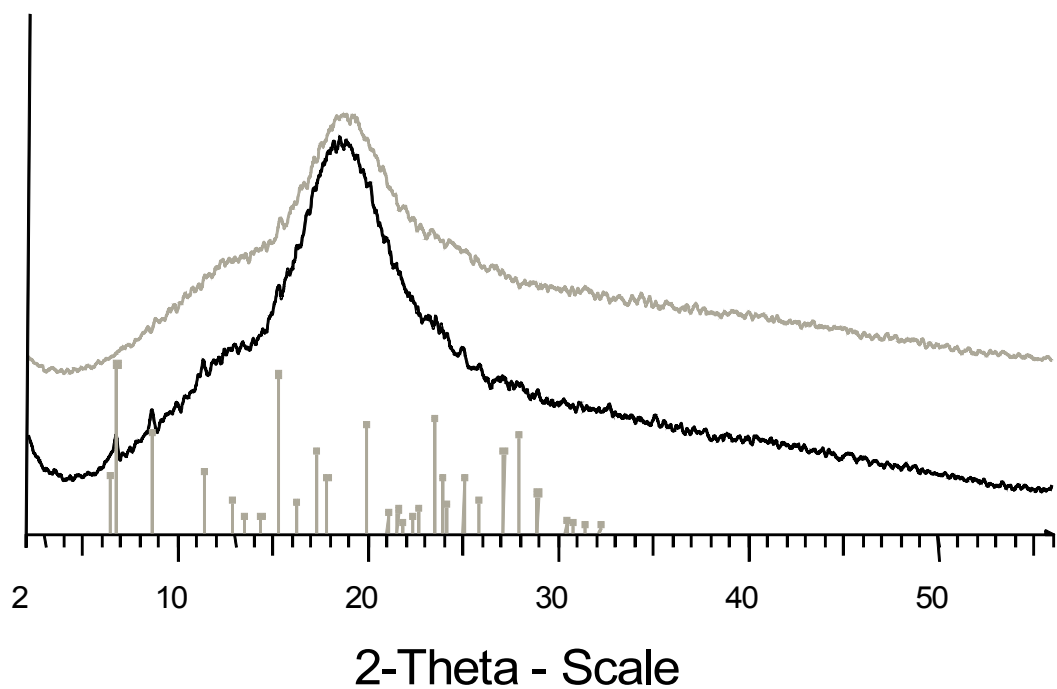


Figura 10b: Analisi ai raggi X di HPDEs (grigio) confrontata con HPE+D (nero). I Patterns sono stati spostati lungo l'asse delle Y al fine di evidenziare la loro forma.

L'analisi ai raggi X della formulazione DEs evidenzia la presenza di fasi sia cristalline che amorfe, entrambe caratterizzate da patterns differenti rispetto a L100 e a D (Figura 10c). Al contrario la miscela fisica L100+D mostra chiaramente I pattern tipici dei singoli componenti. Tali risultati indicano che durante la preparazione di DE avvengono trasformazioni strutturali sia del polimero che del farmaco, le quali determinano la formazione di una nuova fase. Un simile fenomeno è riportato in letteratura (Shivakumar et al).

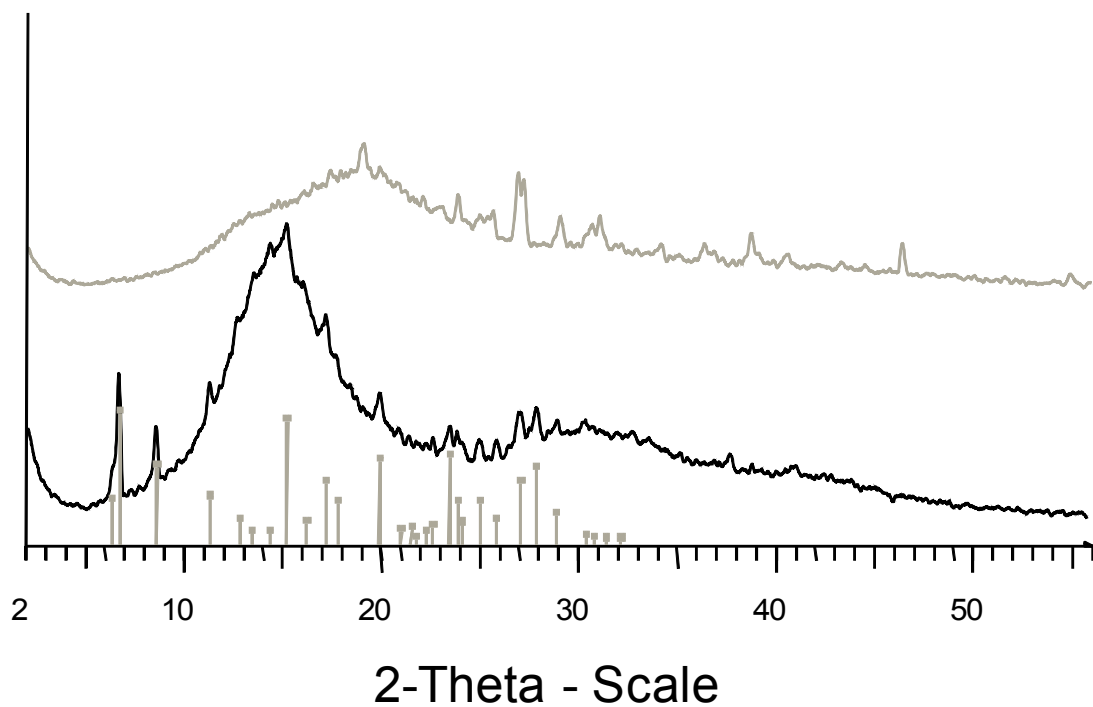


Figura 10c: Analisi ai raggi X della formulazione DEs (grigio) confrontata con la miscela fisica L100+D (nero). I pattern sono stati spostati lungo l'asse delle Y per evidenziare la loro forma

### 3.7 Calorimetria differenziale a Scansione

Il comportamento termico del Diclofenac Sodico utilizzato per le formulazioni nanoparticellari è tipico di un farmaco di natura cristallina anidra, caratterizzato da un effetto endotermico dovuto al processo di fusione che avviene a  $283.4 \pm 0.1$  °C a cui è associata un'entalpia pari a  $69 \pm 3$  Jg<sup>-1</sup> e la concomitante decomposizione esotermica (Figura 11 curva a)

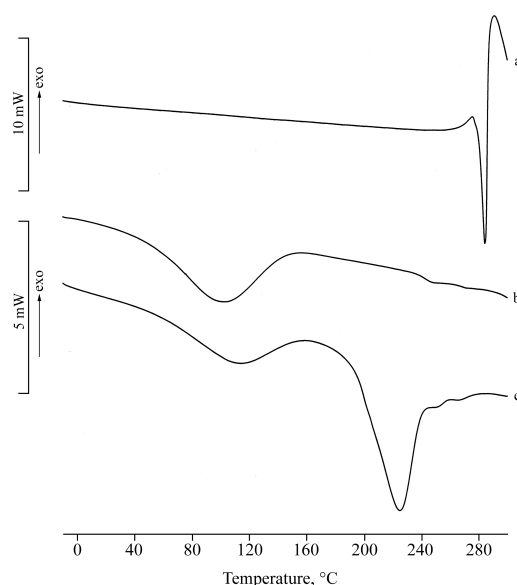


Figura 11: Profili DSC dei polimeri HP (a), L100 (b), e del farmaco D (c) utilizzati per la preparazione delle nanoparticelle.

Le curve rappresentanti HP ed L100 (Figura 11 curva b e curva c) mostrano il profilo tipico di polimeri amorfi caratterizzati da un ampio effetto endotermico fra 0-160 °C per HP e 30-160 °C per L100. Tali effetti sono dovuti alla presenza di molecole d'acqua (~4.5 % e ~3% per HP e L100, rispettivamente) seguiti dalla decomposizione del campione a circa 220°C.

In Figura 12 sono riportati i grafici ottenuti dall'analisi DSC di HPDs (curva c) e HPDEs (curva f) i quali presentano un comportamento termico tipico dei prodotti amorfi. Nelle curve attribuite alle miscele fisiche (curve b ed e) non si osserva un evidente comportamento endotermico associabile alla fusione, ciò è dovuto al fatto che, a causa delle condizioni sperimentali adottate, l'effetto di fusione non è apprezzabile poiché mascherato dalla decomposizione dei polimeri.

Il comportamento di DEs (Figura 7, curva i) è anch'esso tipico di un prodotto amorfo caratterizzato dalla decomposizione del prodotto a 200°C. la curva DSC relativa alla miscela fisica L100+D riportata in Figura 11 curva h, mostra un piccolo effetto endotermico a 285°C dovuto alla fusione del prodotto.

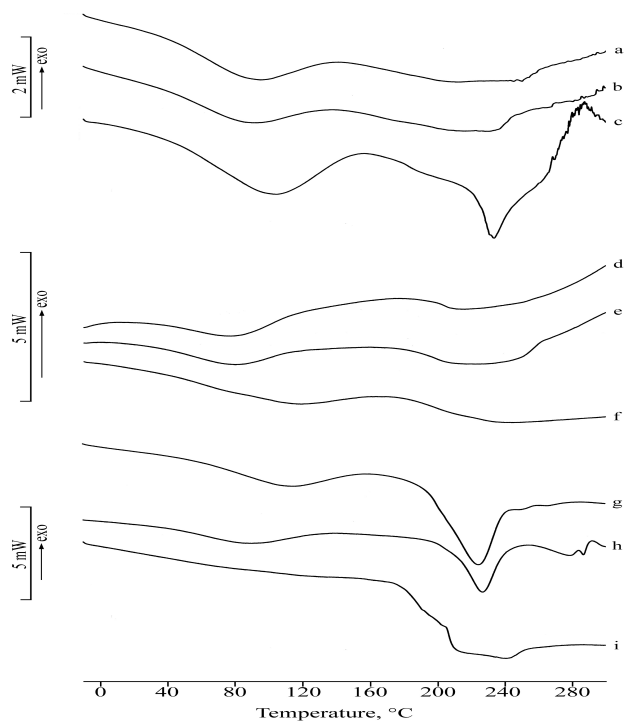


Figura 11 analisi comparative DSC fra le formulazioni HPDs, HPDEs e DEs con le corrispondenti formulazioni prive di farmaco e le miscele fisiche.

### 3.8 Spettroscopia infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR)

Lo spettro FT-IR del farmaco cristallino e dei polimeri amorfi sono riportati in Figura 12. La banda allargata nel range di lunghezza compreso fra 3400 e 2800  $\text{cm}^{-1}$ , dovuto alla tipica vibrazione dello stretching degli OH e dei CH, è presente in tutti gli spettri e in particolare è visibile nello spettro del farmaco. Negli spettri relativi a D e a L100 sono presenti dei picchi a 1730  $\text{cm}^{-1}$  riferibili ai gruppi carbossilici; infine a 1570  $\text{cm}^{-1}$  sono presenti nello spettro del farmaco picchi relativi alla vibrazione C=C.

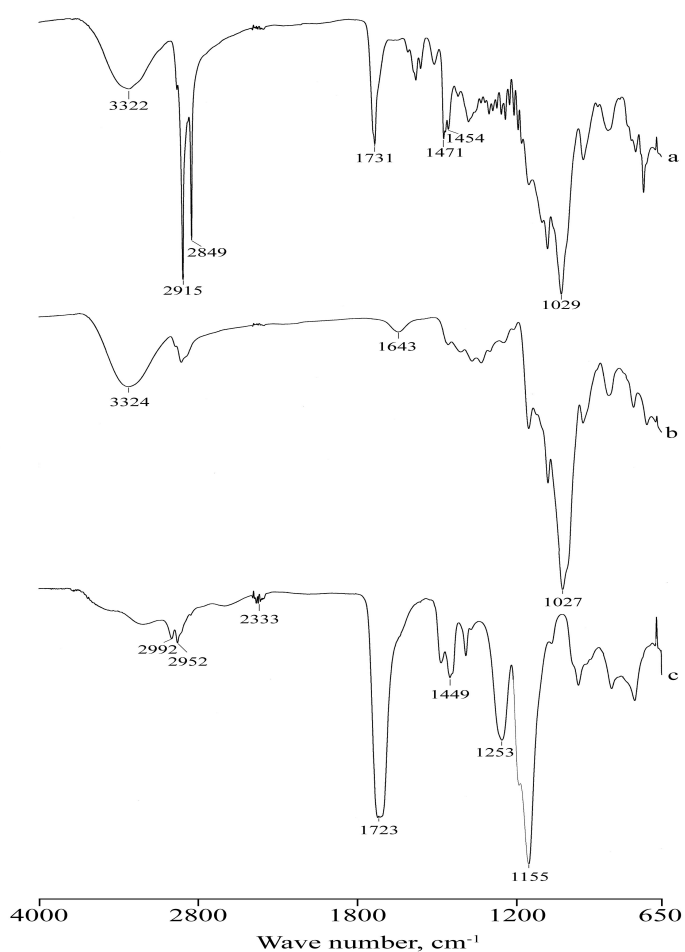


Figura 12: Analisi FT-IR del Diclofenac, idrossipropil- $\beta$ -ciclodestrina e Eudragit L100<sup>®</sup>.

In Figura 13 sono riportati gli spettri FT-IR delle formulazioni prodotte DEs, HPDEs and HPDs (Rispettivamente spettri a, b e c )

Tutte le bande presenti negli spettri relativi a HPDs e HPDEs fanno riferimento a bande tipiche del polimero e del farmaco. L'assenza, nello spettro della formulazione DE, delle bande a  $1570\text{ cm}^{-1}$  relative a D sono attribuibili alla formazione di una nuova fase solida derivata dall'interazione fra D ed L100 come già rilevato nell'analisi ai raggi X.

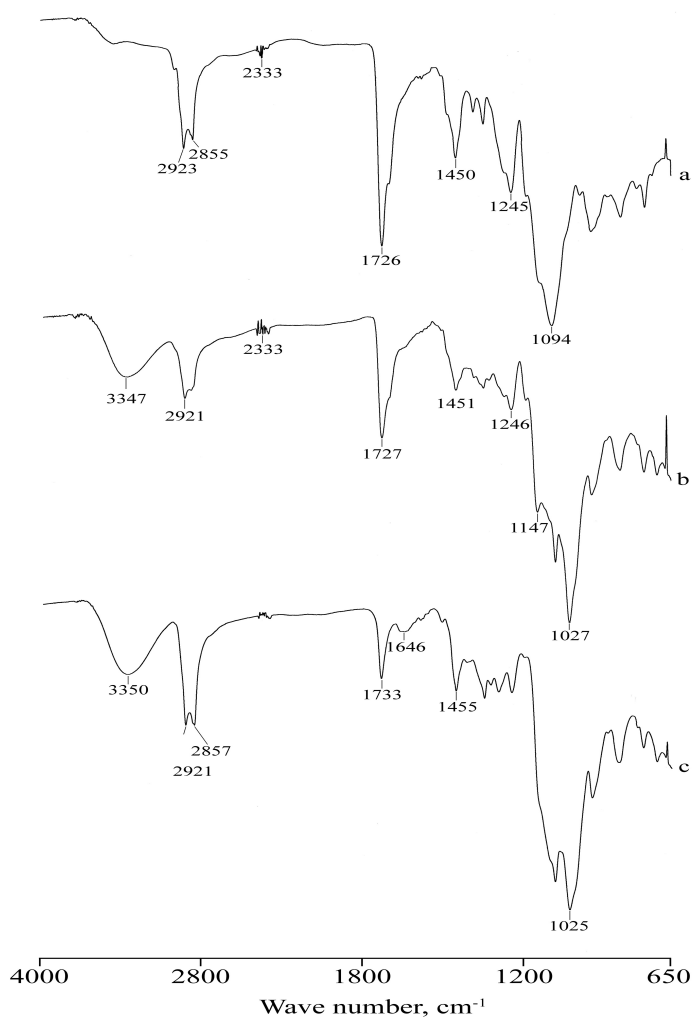


Figura 13: Analisi FT-IR di HPDs, HPDEs e DEs (zona dell'impronta digitale).

### 3.9 Valutazione dell'efficacia di incapsulazione del Diclofenac Sodico

Le nanoparticelle HPDs e HPDEs e DEs sono state caratterizzate in termini di contenuto reale di farmaco ed efficacia di incapsulazione.

Le analisi condotte sulle tre formulazioni cariche, dimostrano che HPDS contiene una quantità effettiva di farmaco (Efficacia di incapsulazione %:  $87.4 \pm 1.6$ ) inferiore ai valori teorici calcolati ciò è probabilmente attribuibile alla capacità da parte delle ciclodestrine di formare con il Diclofenac e con vari altri farmaci complessi stabili tali da non permettere il

rilevamento del farmaco con i normali strumenti di analisi in dotazione (Shamsipur et al.). Per avvalorare questa ipotesi sono in corso studi di complessazione fra HP e DS. Tutto il farmaco incapsulato in HPDEs è stato invece ritrovato in soluzione (efficacia di incapsulazione  $102.5 \pm 1.8$ ), ciò è dovuto al fatto che L100 influenza la capacità della formazione del complesso HP:D e favorisce così il ritrovamento del farmaco nel mezzo di dissoluzione.

### ***3.10 Test di rilascio in-vitro in ambiente gastro intestinale simulato***

Il test di rilascio in-vitro è stato condotto utilizzando un apparato di dissoluzione conforme alle normative riportate all'interno della USP 24. Il dissolutore è provvisto di basket all'interno dei quali è stata dispersa la polvere da testare. Il test è stato condotto seguendo i parametri precedentemente descritti.

I risultati ottenuti mostrano che le formulazioni HPDs e HPDEs hanno un diverso profilo di rilascio del farmaco: HPDs è in grado di rilasciare circa il 60% di farmaco in ambiente gastrico a pH 1.2 già dopo i primi 5 minuti di test; durante le due ore successive la quantità di farmaco ritrovata nel mezzo acquoso non variano. In seguito all'incremento del valore di pH la quantità di farmaco ritrovata all'interno del tampone è di circa il 90% dopo i primi 15 minuti di test.

La formulazione HPDEs è maggiormente in grado di inibire il rilascio di D in ambiente acido grazie alla presenza del L100. Durante le prime 2 ore di test in ambiente gastrico circa il 25% di farmaco viene ritrovato all'interno del fluido. In seguito al cambiamento di pH circa il 94% di D viene rilasciato dalla formulazione durante i primi 30 minuti di test. Come già osservato per la formulazione HPDEs, anche DEs appare non favorire il rilascio del farmaco a pH 1.2 poiché l'unico polimero costituente le nanoparticelle è l'L100. A pH 6.8 la formulazione DE favorisce il rilascio dell'80% di D dopo i primi 5 minuti.

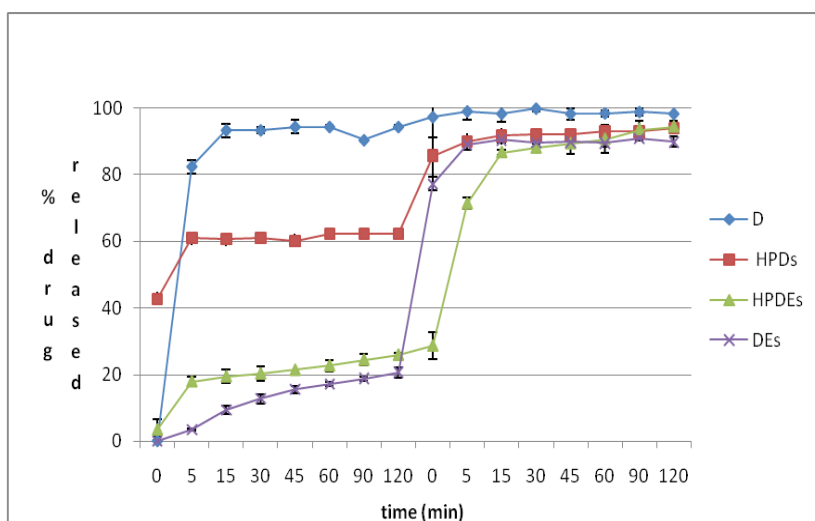


Figura14 Test di dissoluzione in-vitro in ambiente gastro-intestinale simulato (primi 0-120 min pH 1.2, secondi 0-120 min pH6.8). (SD <1.6).



### 3.11 Studi di permeazione

#### 3.11.1 Test di permeazione in vitro utilizzando membrane sintetica

Dalla Figura 15 è possibile osservare che le formulazioni sono in grado di proteggere il farmaco dall'ambiente acido: solamente l'8% di farmaco permea dalla formulazione HPDs e il 4% permea da HPDEs, la formulazione DEs inibisce la permeazione completa del farmaco a pH 1.2.

A pH basico, tuttavia, le nanoparticelle contenenti HP favoriscono la permeazione del farmaco attraverso la membrana in maniera più efficace rispetto alla formulazione DEs ( $P < 0.001$ ). In particolare, l'associazione fra HP e L100 appare essere la migliore combinazione per la preparazione di formulazioni colon-specifiche poiché la formulazione HPDEs è l'unica formulazione in grado di favorire la permeazione di quasi il 100% di D attraverso la membrana sintetica (HPDEs vs HPDs:  $P < 0.001$ ).

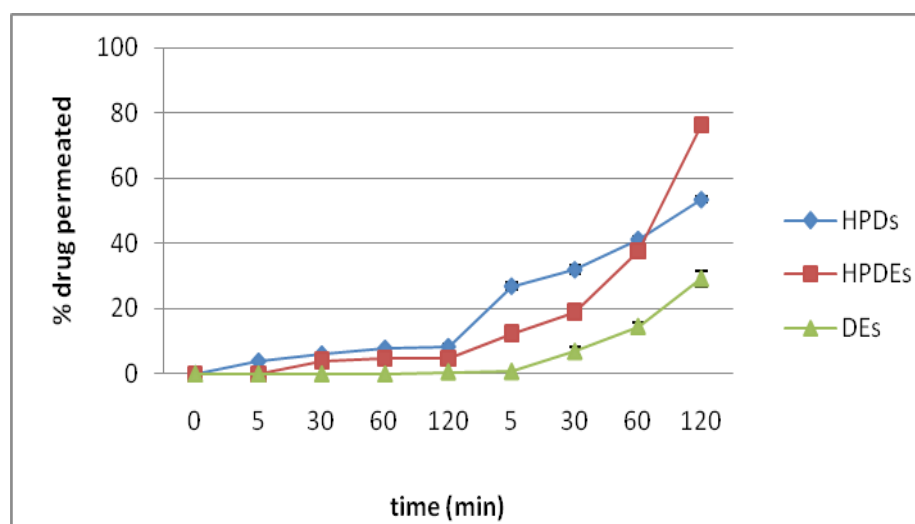


Figura 15 Test di permeazione in-vitro in ambiente gastro-intestinale simulato (primi 0-120 min pH 1.2, secondi 0-120 min pH6.8). (DS <2.5).

#### 3.11.2 Test di permeazione in-vitro attraverso monostrato cellulare

I Test condotti su monostrato cellulare simulanti la barriera intestinale, mostrano un'influenza negativa di HP sulla permeazione del farmaco; infatti, come è possibile osservare dalla Figura 16, HPDs trattiene circa il 90% di D ancora dopo 2 ore di test. Al contrario la presenza di L100 all'interno della formulazione HPDEs e DEs aumenta in maniera rilevante la quantità di farmaco permeata attraverso il monostrato cellulare. la quantità di D ritrovata all'interno del liquido accettore sono rispettivamente il 50% per HPDEs e 60% per DEs. (HPDs vs HPDEs and HPDs vs DEs :  $P < 0.001$ ; HPDEs vs DEs :  $P < 0.001$ ).

Il risultato ottenuto potrebbe essere dovuto all'elevata solubilità nel liquido e al sistema statico in cui il test è stato condotto. Il comportamento della formulazione DEs conferma tale ipotesi poiché al termine delle 4 ore di test circa il 90% di farmaco è ritrovato all'interno del mezzo accettore.

Al termine del test l'analisi TEER e il test MTT dimostrano che circa il 77% e il 90% di cellule trattate rispettivamente con HPDs e HPDEs sono vive al termine delle 4 ore di trattamento. Il contatto fra le formulazione DEs e il monostrato cellulare determina la morte di circa il 32% di cellule. Questo può essere determinato dalla presenza di residui di tensioattivo in questo tipo di formulazione visto che non è stato trovato un agente capace di lavare le particelle dal Tween senza causare modificazioni o solubilizzazione delle particelle.

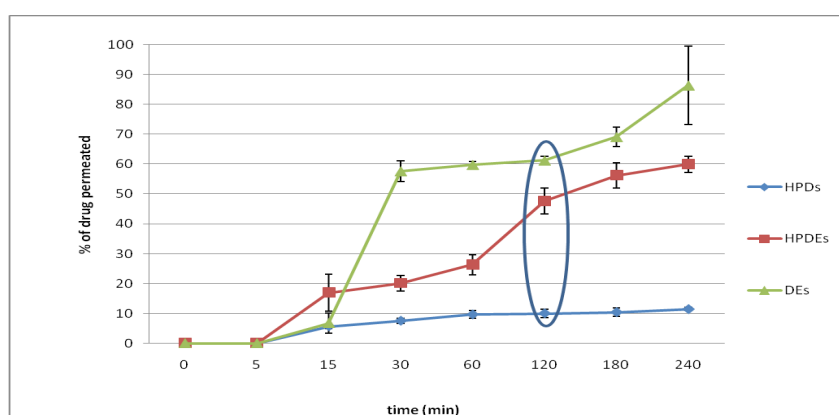


Figura. 16: test di permeazione in-vitro su monostrato cellulare a pH 6.8. (SD < 5.6).

### 3.11.3 Test di permeazione ex-vivo attraverso mucosa di colon di maiale

I risultati ottenuti da questa prova confermano la capacità agire da penetration enhancers da parte delle ciclo destrine già osservata durante i test di permeazione in-vitro. Infatti come si può osservare dalla Figura 17. Dopo 2ore di test circa il 13% di farmaco contenuto nella formulazione HPDs è stato ritrovato all'interno del fluido accettore. Al contrario la presenza del polimero L100 in HPDEs e DEs diminuiscono la velocità di permeazione del farmaco rispetto alla formulazione HPDs(HPDs vs HPDEs and HPDs vs DEs :  $P < 0.001$ ).

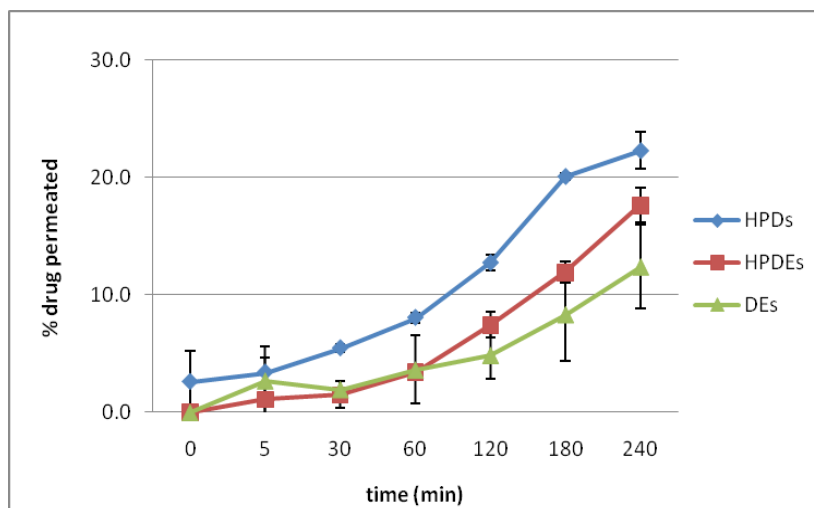
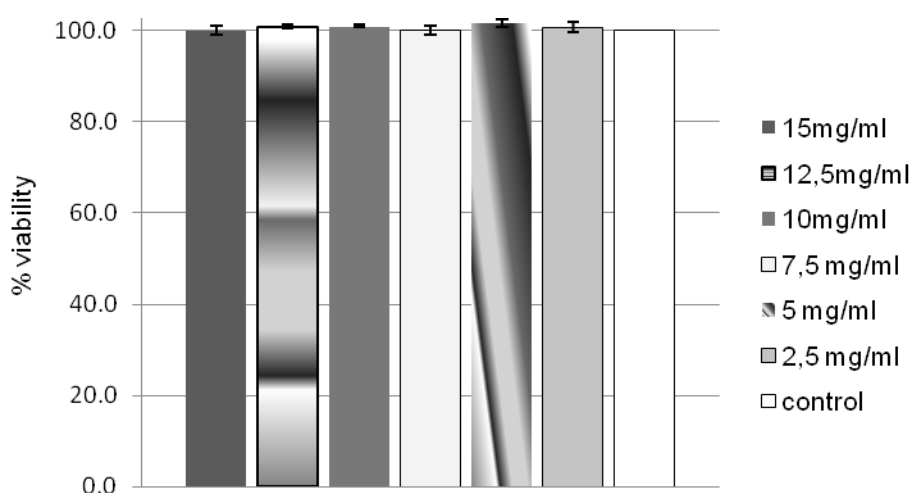


Figura. 17: test di permeazione Ex-vivo fluido intestinale simulato pH 6.8. (SD < 3.6).

### 3.12 Studi di citotossicità cellulare

#### a) Citotossicità dei componenti usati nella preparazione delle nanoparticelle

In seguito al periodo di incubazione con varie concentrazioni di HP si può osservare che nessuna delle concentrazioni di HP prese in considerazione è nociva per il monostrato cellulare (Figura 18). L'incubazione del monostrato con il tween80 ha determinato la morte di tutte le cellule; tale risultato è dovuto alla tossicità tipica di tutti i tensioattivi che sono in grado di solubilizzare la membrana cellulare (Almgren, Jones, Simoes). Il butanolo, testato alle concentrazioni utilizzate per la preparazione delle nanoparticelle non presenta alcun effetto tossico.



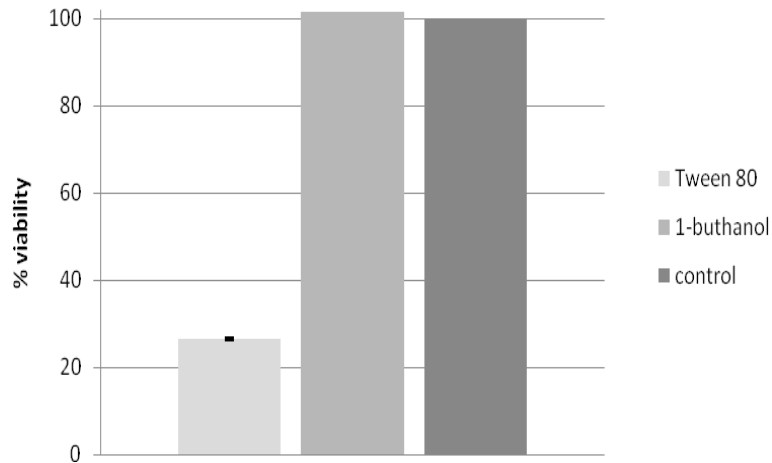


Figura.18 a,b: MTT test di HP e degli eccipienti usati per la preparazione delle nanoparticelle (SD <3)

*b) MTT test delle nanoparticelle in soluzione*

Dai risultati ottenuti in seguito al test di citotossicità cellulare si evince che tutte formulazioni in precedenza lavate per eliminare eventuali tracce di tween80, dimostratosi citotossico, non hanno alcun effetto citotossico.

Infatti la mortalità di circa il 40% delle cellule in seguito a contatto con la formulazione DEs è riconducibile alla presenza del surfactante sulle nanoparticelle poiché tale formulazione non è lavabile né in solventi organici né in solventi acquosi (Figura 19).

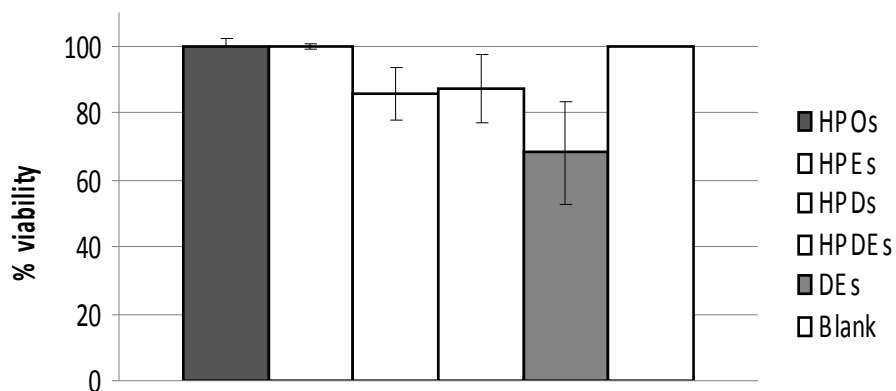


Figura.19: Test di vitalità cellulare condotto su HPO6s, HPEs, HPDs, HPDEs e DEs in in soluzione 5mg/ml in DMEM. (SD <16).

*a) MTT test delle nanoparticelle in sospensione*

In seguito a 24 ore di contatto diretto fra le nanoparticelle essiccate e il monostrato cellulare le formulazioni HPDs e HPDEs non presentano tossicità. Infatti si ritrovano percentuali di vitalità di 76-77%. La percentuale di vitalità, nel caso di DE, si riduce più del 50% rispetto al controllo; anche in questo caso tale risultato è attribuibile alla presenza del tween80 (Figura 20).

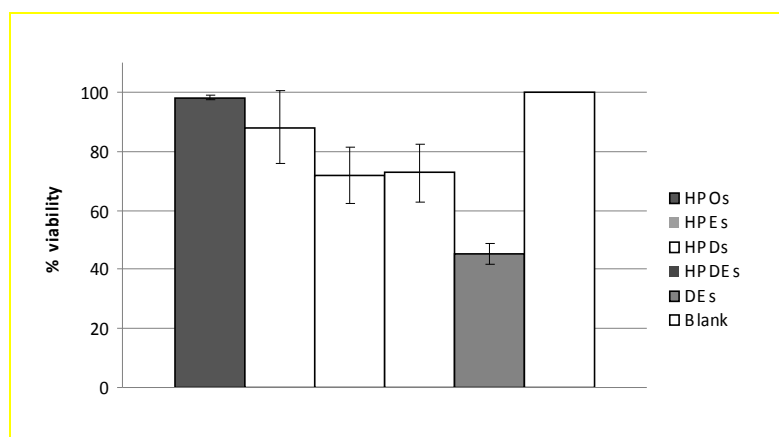


Figura 20: test di vitalità condotto su sospensioni HPO6s, HPEs, HPDs, HPDEs and DEs. (SD <12).

### Discussione

La presenza del L100 e dell'HP garantisce la produzione di una formulazione che fonde in sé la gastroresistenza e la capacità di fungere da penetration enhancer, perciò la formulazione HPDEs appare essere la migliore prodotta. Essa non ha effetti citotossici e presenta ottimi profili sia di rilascio che di permeazione del farmaco sia in-vitro che ex-vivo per questo motivo è stata scelta come base di partenza per la successiva parte della tesi.

## **CAPITOLO 2: PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOPARTICELLE SOLIDE LIPIDICHE CONTENENTI IDROSSIPROPIL-B-CICLODESTRINE DESTINATE AL TARGET COLON- SPECIFICO**

Attraverso i test effettuati in ambiente gastro-intestinale simulato sulle formulazioni HPDs, HPDEs e DEs è stato osservato che una piccola percentuale di D viene rilasciata dalla formulazione HPDs in ambiente gastrico, mentre la presenza dell'Eudragit L100 favorisce il rilascio controllato del farmaco esclusivamente all'interno dell'intestino ed è capace di controllare la velocità di permeazione del farmaco attraverso membrane artificiali e biologiche. I dati ottenuti hanno inoltre messo in evidenza che la formulazione a base di L100 non è in grado di favorire la permeazione del farmaco attraverso la mucosa intestinale.

Sulla base dei risultati ottenuti, nella prosecuzione del lavoro si è voluto verificare:

- L'effetto del tipo di eccipiente nella formulazione a rilascio colon-specifico. Per questo motivo Eudragit L 100 è stato sostituito con un materiale di tipo lipidico. Tale formulazione è stata denominata HPDL.
- Si è voluto inoltre verificare l'effetto dell'assenza della ciclodestrina nella preparazione di nanoparticelle solide lipidiche e nel loro comportamento in-vitro ed ex-vivo a livello colon-specifico attraverso la preparazione di formulazioni denominate DL.
- Infine è stata valutata l'importanza del rapporto fra ciclodestrina e farmaco incapsulato inseguito alla preparazione di HPDL2 e DL2 contenenti dosi di Diclofenac Sodico dimezzate rispetto alle formulazioni di partenza.

## 4 MATERIALI E METODI

### 4.1 Materiali

<b>Compritol ATO 888</b>	Lotto n°27685 Gattefossè Saint Priest, Francia
<b>Diclofenac sodico</b>	BP-99.96% grado di purezza. Lotto n° 223/97028, Prodotti Cruciani CRUAL s.r.l., Roma, Italia
<b>Idrossipropilciclodestrina</b>	Cavasol Mw: 1400 g/mol, sostituzione molecolare (per unità di glucosio anidro): 0.65 Lotto n° 73B009 Wecker GmbH Monaco, Germania
<b>Nucleopore Rack-Etch Membrane</b>	Membrane di policarbonato, diametro 47 mm, porosità 0.05 $\mu$ m. Lotto n° 6348013 Whatman International Ltd. Maidstone, Regno Unito
<b>Tween80</b>	Lotto n°A0233969 Acros Organics, Gees, Belgio
<b>Acetonitrile</b>	Lotto n° 07Z6738 VWR Prolabo, EC Geddanaaksebaan 464, Leuven, Belgio
<b>Acido cloridrico 37%</b>	Lotto n°k37471017726 Merk Darmstadt, Germania
<b>DMEM</b>	Lotto n°311791 Gibco 41966 Invitrogen srl San Giuliano milanese, Milano, Italia
<b>Siero bovino fetale</b>	Lotto n°018k3395 Sigma Aldrich Steinheim, Germania
<b>Gibco penicillina/streptomina</b>	Lotto n° 300847 invitrogen srl San Giuliano milanese, Milano, Italia
<b>Tripsina edta 0,25%</b>	Lotto n° 057k2384, Sigma Aldrich Chemie GmbH Stienheim, Germania
<b>Dimetilsolfossido 99,9%</b>	Lotto n° 10185ch, Sigma Aldrich A.c.s reagent, Steinheim, Germania
<b>Sodio fosfato monobasico dodecaidrato</b>	Per analisi Lotto n°A018292001,Acros organics, Geel, Belgio
<b>Sodio fosfato tribasico dodecaidrato</b>	Purissimo Lotto n° 62570 Riedel-de Haen, Sigma Aldrich, Steinheim, Germania
<b>Lattosio Ph.Eur-FU</b>	Lotto n° 153/6101767, Prodotti Cruciani CRUAL s.r.l., Roma, Italia
<b>Polivinilpirrolidone FU</b>	Lotto n° 144/41166000, Prodotti Cruciani CRUAL s.r.l., Roma, Italia

## 4.2 *Apparecchiature*

<b>Omogeneizzatore Silverson SL2</b>	Silverson Machines Inc. East Longmeadow,(MA), USA
<b>Coulter nanosizer</b>	Beckman Coulter Inc. Miami, Florida, USA
<b>Dissolutore Erweka DT 70</b>	Erweka GmbH, Heusenstamm, Germania
<b>HPLC</b>	Hewlett-Packard mod.1050 con rivelatore UV, autocampionatore e integratore HP 3395, USA
<b>Liofilizzatore 5Pascal LIO 5P</b>	Cinquepascal srl, Milano, Italia



### 4.3 Metodi

#### 4.3.1 preparazione delle SLN

La prima formulazione, denominata HPDL e derivata direttamente dalla formulazione di natura polimerica HPDE, è stata preparata secondo il procedimento di seguito riportato: 2.5g di Compritol sono stati fusi a bagnomaria a 80°C. In un becker 1.66 g di HP, 1.25g di tween80 e 0.5g di D sono stati disciolti in 88.17g di acqua. La soluzione calda di lipide è stata aggiunta sotto agitazione magnetica alla soluzione acquosa mantenuta alla stessa temperatura di 80°C. La pre-emulsione è stata omogeneizzata utilizzando un emulsionatore a testata Silverson SL2, i parametri di lavoro sono stati: 6200 rpm per 5 minuti a 80°C. La nanoemulsione ottenuta è stata lasciata ricristallizzare in ghiaccio sotto costante agitazione magnetica in modo tale ottenere una sospensione acquosa di nanoparticelle solide lipidiche (SLN). Tale metodo è derivato dal hot homogenization process ampiamente descritto da Muller e Menhert. Seguendo questa metodica sono state prodotte altre tre formulazioni differenti da quella di partenza per quantità di HP e/o D; le caratteristiche di ciascuna formulazione sono riportate in Tabella 1.

<b>Formulazione</b>	<b>HP (g)</b>	<b>C (g)</b>	<b>Tween80 (g)</b>	<b>D (g)</b>	<b>H<sub>2</sub>O(ml)</b>
<i>HPDL1</i>	1.66	2.5	1.25	0.5	88.17
<i>DL1</i>		2.5	1.25	0.5	88.17
<i>HPDL2</i>	1.66	2.5	1.25	0.25	88.17
<i>DL2</i>		2.5	1.25	0.25	88.17

Tabella 1: prospetto riassuntivo degli eccipienti delle sostanze impiegate nella preparazione delle SLN

#### 4.3.2 essiccamento delle nanoparticelle

Tutte le sospensioni contenenti SLN sono state sottoposte a processo di liofilizzazione al fine di ottenere nanoparticelle essiccate. Le sospensioni da liofilizzare sono state congelate a -80 gradi prima di essere disposte all'interno del freeze-drier. Il processo è stato condotto a una temperatura di -54°C sotto vuoto (0,909 mBar) per 8 ore. 10ml di HPDL sono stati sottoposti al processo di essiccamento senza l'ausilio di crioprotettori; al contrario 5ml di DL1, HPDL2 e DL2 sono state addizionate con 5ml di due diverse soluzioni acquose di crioprotettori (concentrazione 10% (w/v)): il Lattosio e il Polivinilpirrolidone (PVP) (Shwarz et al; Zimmermann et al; Cavalli et al). In seguito all'aggiunta dei crioprotettori sono state ottenute diverse formulazioni di SLN essiccate. Le quantità di emulsione, il tipo e la quantità di crioprotettore aggiunto e le SLN ottenute sono state riportate in Tabella 2.

<b>Nanosospensioni sottoposte a freeze-drying</b>	<b>SLN ottenute</b>
<b>5ml DL1+ 5ml of Lattosio</b>	DLL1
<b>5ml DL1+ 5ml of PVP</b>	DLP1
<b>5ml HPDL2+ 5ml of Lattosio</b>	HPDLL2
<b>5ml HPDL2+ 5ml of PVP</b>	HPDLP2
<b>5ml DL2+ 5ml of Lattosio</b>	DLL2
<b>5ml DL2+ 5ml of PVP</b>	DLP2

Tabella 2: Quantità di sospensione nano particellare e di soluzione contenente crioprotettore utilizzate per ottenere SLN essiccate mediante il processo di liofilizzazione

### 4.3.3 Valutazione delle dimensioni nanoparticellari

Tutte le sospensioni nanoparticellari e le formulazioni essiccate corrispondenti sono state analizzate mediante spettroscopia a diffrazione usando Coulter nanosizer N5 (Beckman-Coulter Inc. Miami, Florida, USA), il cui funzionamento è stato precedentemente descritto nel capitolo 1, al fine di misurare sia il diametro medio che l'indice di polidispersività (PI) delle SLN. Attraverso tale tecnica è stato valutato anche l'effetto del processo di essiccazione e della presenza del crioprotettore sulle dimensioni nano particellari e sulla loro distribuzione dimensionale

### 4.3.4 Determinazione del contenuto reale di farmaco

In una soluzione di 50 ml di tampone fosfato a pH 6.8 è stata disciolta una quantità nota ed esattamente pesata di nanoparticelle (4.7mg di HPDL1; 11.8mg di DLL1 e DLP1; 26.1mg di HPDLL2 e HPDLP2 e 23.6mg di DLL2 and DLP2, corrispondenti a una quantità di D pari 10mg). La soluzione è stata sottoposta ad agitazione magnetica vigorosa per 30 minuti a 80°C, al fine di garantire la completa dissoluzione del solido. La soluzione è stata centrifugata a 13000rpm per 15 min, filtrata e analizzata in triplicato tramite HPLC. L'analisi è stata effettuata con un apparecchio del tipo Varian ProStar 210, corredato da un DAD detector Varian 330 e un auto campionatore Varian 410 (Varian, Inc. Cary, North Carolina, USA). Secondo quanto precedentemente descritto da El sayed, 20 µL di campione sono stati direttamente iniettati all'interno della colonna ed eluiti con una miscela di acetonitrile e una soluzione 0.5 M di acido acetico 50/50 (v/v), la velocità di flusso è di 1.2 ml/min. per 8 min. Tutte le analisi sono state fatte a temperatura ambiente.

La concentrazione del farmaco all'interno della soluzione è stata estrapolata dalla retta di calibrazione ottenuta mediante analisi di soluzioni standard di D. Le soluzioni sono state preparate in tampone fosfato pH 6.8 USP., partendo da una madre da 1000 mg/L (50mg di

Diclofenac Na in 50 ml di tampone). La retta di taratura è stata realizzata iniettando in HPLC soluzioni a concentrazione crescente di Diclofenac: 1– 2,5 – 5 – 10 – 20 mg/L ( $y=118321.8x+8079,3$   $R^2=0,9997$ ).

L'efficacia di incapsulazione % (EE%) del farmaco all'interno delle nanoparticelle è stata ottenuta dal rapporto tra la quantità di farmaco realmente incapsulata rispetto a quella impiegata per la preparazione secondo la seguente formula:

$$EE\%=(D.C.\% \text{ effettivo}/D.C.\% \text{ teorico})\cdot 100$$

#### 4.3.5 test di dissoluzione

Tutte le formulazioni essiccate sono state sottoposte a test di dissoluzione in vitro al fine di determinare i profili di rilascio del farmaco in ambiente gastrointestinale simulato.

Per lo svolgimento del test è stato utilizzato un dissolutore Erweka DT 70 a 6 vessel corredato di un sistema di agitazione a basket. L'apparecchio è conforme alle specifiche della FU XI e della USP24.

Il test è stato condotto disperdendo uniformemente una quantità esattamente pesata di nanoparticelle, corrispondente a 10mg di D incapsulato, all'interno dei basket immersi in 525ml di tampone a pH 1.2 per un tempo di 2 ore. Successivamente sono stati aggiunti alla soluzione acida 125ml di sodio fosfato tribasico 0.2M per ottenere il tampone a pH 6.8 (USP 24). L'esperimento è stato condotto nelle stesse condizioni per altre due ore. Ad intervalli regolari da ciascun vessel, è stato prelevato 1ml di soluzione e ripristinato il volume iniziale con tampone fresco, al fine di mantenere le condizioni *sink*.

I parametri utilizzati sono stati:

- Temperatura: 37°C
- Velocità agitazione: 50 giri/min
- Durata: 4 ore
- Tempi di prelievo: ogni 30min dall'inizio alla fine del test.

Tutti i campioni prelevati sono stati centrifugati a 13000rpm, filtrati con filtro avente porosità di 20µm e analizzati secondo la metodica HPLC descritta nel paragrafo 4.3.5.

#### 4.3.6 test di permeazione in vitro

Test di permeazione in vitro è stato condotto su tutte le formulazioni essiccate. Una quantità nota ed esattamente pesata di nanoparticelle corrispondente a 10mg di D è stata uniformemente dispersa con l'aiuto di una spatola su una membrana sintetica in policarbonato avente pori di diametro pari a 0.05µm. La membrana ha il compito di simulare il

comportamento di una mucosa naturale per valutare la quantità di farmaco capace di attraversare la membrana e raggiungere il liquido accettore. Il test è stato condotto utilizzando delle celle di Franz modificate costruite nel nostro laboratorio.

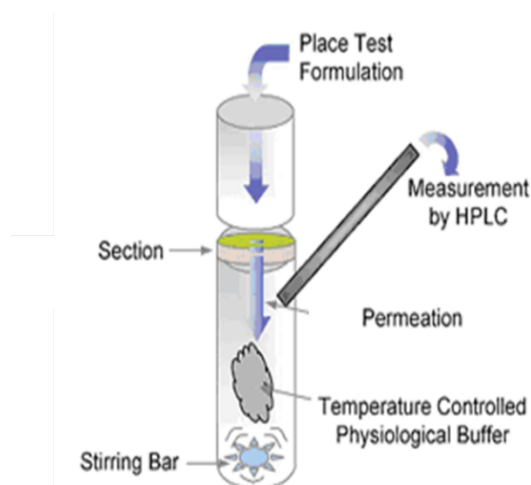


Figura 1: Schema del processo di permeazione attraverso membrana.

Il liquido accettore è costituito da 100ml di tampone a pH 1.2 per le prime 2 ore, nelle successive 2 ore il pH è stato portato a 6.8 attraverso l'aggiunta di 25ml di sodio fosfato tribasico 0.2M, come descritto in Farmacopea Americana (USP24) in modo tale da simulare l'ambiente gastrointestinale, per tale motivo l'apparecchiatura è stata tenuta ad una temperatura costante di 37°C. Le tre celle sono collegate in serie ad un sistema di aspirazione, che permette il flusso continuo del tampone all'interno delle celle al di sotto delle membrane permeanti. I valori di Diclofenac ritrovati all'interno del liquido accettore rilevati tramite analisi HPLC sono stati interpolati alla retta di calibrazione del Diclofenac in tampone a pH 6,8 precedentemente descritta. La quantità di principio attivo che permea la membrana è stata calcolata in ciascun tempo. I test di permeazione sono stati condotti in triplicato al fine di calcolare i valori medi di D permeate o le relative deviazioni standard.

#### 4.3.7 test di permeazione ex-vivo

Il test ex vivo è stato condotto apportando alcune variazioni al metodo utilizzato nella permeazione in-vitro:

- La membrana artificiale è stata sostituita da un frammento di mucosa intestinale prelevata da maiali regolarmente macellati presso il mattatoio comunale di Ploaghe.

- Il liquido accettore utilizzato è stato unicamente il tampone a pH 6.8, poiché il tampone a pH 1.2 avrebbe potuto danneggiare la mucosa intestinale utilizzata per il test in sostituzione della membrana artificiale e poiché l'intestino è caratterizzata toto dalla presenza di un liquido avente caratteristiche basiche.

Il frammento di mucosa è stato prelevato dalla porzione del colon di intestini di maiale e messo a bagno in PBS fresco per pochi minuti, al fine di eliminare residui di feci e mantenerne la vitalità. La concentrazione salina del tampone utilizzato coincide con quella del corpo umano cioè è isotonica. Il procedimento di lavaggio della mucosa deve essere fatto delicatamente in modo tale da non lavare via lo strato di muco naturalmente presente sulle pareti dell'intestino; prima del suo posizionamento nella cella il frammento intestinale deve essere tagliato lungo la linea mesenterica e deve essere inoltre privato della tonaca sierosa che ne costituisce la parete esterna al fine di garantire il passaggio del farmaco attraverso la tonaca mucosa verso il liquido accettore (Mayer et al, Van de Kerkhof , Zheng et al).

La formulazione è stata uniformemente dispersa sulla porzione mucosale del frammento intestinale che funge da zona di donazione del farmaco, la porzione submucosale è stata messa in diretto contatto con il liquido accettore in cui è possibile ritrovare il farmaco in seguito a permeazione attraverso la mucosa intestinale. A intervalli di tempo prestabiliti è stata rilevata la quantità di farmaco come precedentemente descritto.

#### **4.3.8 test di permeazione attraverso il monostrato cellulare**

Il test è stato condotto utilizzando colture cellulari immortalizzate di tipo CACO2 derivanti da adenocarcinoma del colon in grado di differenziarsi e simulare l'epitelio intestinale e perciò ampiamente usate per verificare l'assorbimento di farmaci destinati al target colon specifico.

Il monostrato cellulare è stato fatto crescere all'interno di appositi inserti porosi collocati nelle piastre di coltura. Le cellule sono state ricoperte del mezzo di crescita costituito da DMEM addizionato con 9.7% di siero fetale bovino, 1.4% di una soluzione di penicillina e streptomina e 1.4% di aminoacidi non essenziali. La stessa quantità di terreno è stata disposta anche all'interno dei pozzetti in modo tale da tenere immersi i supporti contenenti le cellule e garantire un adeguato ambiente di crescita. Prima di iniziare il test, il terreno di coltura è stato sostituito con lo stesso volume di soluzione tampone di Hank (HBSS) a pH 6.8 sia al di sopra dello strato cellulare sia al di sotto del supporto in modo tale da costituire due zone : una contenente il liquido donatore e una contenente il liquido accettore.

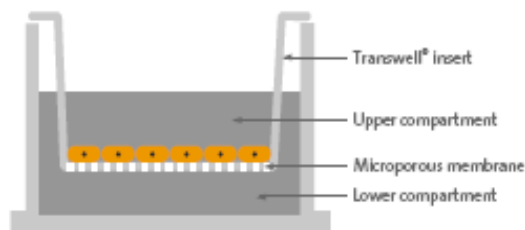


Fig 2: Rappresentazione schematica del sistema di permeazione attraverso il monostrato cellulare

Una quantità di nanoparticelle esattamente pesate pari a 10 mg/ml di D vengono uniformemente disperse sopra il monostrato cellulare. Ad intervalli di tempo prestabiliti 100µL di tampone vengono prelevati dal liquido accettore disposto al di sotto del supporto all'interno del pozzetto e sostituiti con tampone fresco al fine di mantenere le condizioni sink. La quantità di D permeata attraverso il monostrato cellulare è stata analizzata mediante tecnica HPLC secondo la metodica precedentemente descritta. La vitalità cellulare è stata valutata tramite TEER e MTT test. Ciascun test è stato fatto in triplicato e i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

## 5 RISULTATI

### 5.1 *valutazione delle dimensioni particellari*

Le SLN, ottenute col metodo dell'hot homogenization process, si trovano disperse all'interno della fase acquosa sottoforma di dispersione nanoparticellare. In tale fase esse possono restare in maniera stabile per diversi mesi senza modificare le loro caratteristiche dimensionali. In Tabella sono riportati i valori dimensionali dei lotti analizzati subito dopo la fine del processo di preparazione. Le analisi sono state condotte mediante l'impiego del Dinamic Light Scattering e sono stati valutati sia il diametro medio sia l'indice di polidispersività (PI) delle nanoparticelle; tale valore indica la formazione di una o più popolazioni di nanoparticelle differenti fra loro per il range dimensionale di appartenenza.

Tutte le formulazioni prodotte hanno dimensioni comprese fra 150 e 255 nanometri. I PI misurati sono tutti inferiori di 0.45, tale valore indica che tutte le formulazioni prodotte fanno parte di popolazioni monodimensionali.

	<b>Diametro medio (nm)</b>	<b>IP</b>
<b>HPDL1</b>	201.3±0.0	0.454±0.029
<b>DL1</b>	198.9±5.323	0.438±0.023
<b>HPDL2</b>	255.7±8.881	0.413±0.032
<b>DL2</b>	142.33±1.989	0.428±0.095

Tabella 3: Diametro medio e PI delle SLN prima del processo di liofilizzazione

Le formulazioni in sospensione acquosa sono state sottoposte a processo di liofilizzazione al fine di ottenere particelle essiccate. La prima formulazione sottoposta a tale processo è stata la HPDL1, il processo è stato condotto in assenza di crioprotettore. Dai risultati riportati in Tabella 4 è possibile dedurre che essa è stata danneggiata dalla tecnica utilizzata, infatti, i valori dimensionali ottenuti e il PI indicano che le nanoparticelle si sono aggregate e hanno subito il fenomeno della coalescenza a causa delle drastiche condizioni di operazione. In seguito al risultato ottenuto, le altre formulazioni sono state addizionate con due diversi eccipienti: il Lattosio e il PVP. Entrambi gli eccipienti hanno dimostrato avere caratteristiche di crioprotettori, infatti le formulazioni aumentano le loro dimensioni di circa 100 nm rispetto alle corrispondenti di partenza e hanno valori di IP sempre inferiori a 0.6. La formulazione DLL2 appare un'eccezione poiché l'aggiunta del lattosio non impedisce il fenomeno della coalescenza né l'incremento delle dimensioni né del IP delle nanoparticelle.

	<b>Diametro medio</b>	<b>IP</b>
<b>HPDL1</b>	724.1±177.5	1.245±0.436
<b>DLL1</b>	341.7±23.03	0.579±0.188
<b>DLP1</b>	455.7±11.58	0.625±0.055
<b>HPDLL2</b>	338.0±31.38	0.576±0.216
<b>HPDLP2</b>	367.2±34.57	0.533±0.057
<b>DLL2</b>	1018±136.2	1.206±0.162
<b>DLP2</b>	271.1±2.621	0.276±0.059

Tabella 4: Diametro medio e IP delle SLN dopo il processo di liofilizzazione

### 5.2 *determinazione del drug content e dell' efficacia di incapsulazione*

Le formulazioni prodotte sono state sottoposte a valutazione della quantità di farmaco caricato all'interno delle SLN.

Dalla tabella di seguito riportata è possibile osservare che tutte le formulazioni composte da C e da HP contengono al loro interno una quantità di farmaco superiore all'88%, al contrario le formulazioni prive di HP contengono una percentuale di farmaco che oscilla fra il 75 e il 76%.

<b>Formulazione</b>	<b>Efficacia di incapsulazione %</b>
<b>HPDL1</b>	88.14
<b>DLL1</b>	76.93
<b>DLP1</b>	76.53
<b>HPDLL2</b>	100.5
<b>HPDLP2</b>	102.4
<b>DLL2</b>	75.53
<b>DLP2</b>	75.53

Tabella 5: Efficacia di incapsulazione del Diclofenac Sodico all'interno delle SLN

### 5.3 *test di dissoluzione in vitro*

Il test di dissoluzione in vitro è stato condotto secondo le modalità citate in USP24 e precedentemente descritte. Dai dati ottenuti è possibile osservare che tutte le formulazioni prodotte sono in grado di trattenere parte del farmaco al loro interno durante la permanenza nel fluido gastrico simulato. Le formulazioni HPDLL2 (rapporto farmaco:polimero 1:2) e DLL1 permettono la cessione di circa il 40% del farmaco incapsulato a pH 1.2. La formulazione HPDL1 differente da HPDLL2 esclusivamente per il diverso rapporto farmaco:polimero, garantisce in ambiente acido il trattenimento di circa il 90% di D contro il 60% di farmaco trattenuto da HPDLL2, tuttavia a pH 6.8 HPDL1 continua a trattenere al suo



interno circa il 40% di farmaco, ciò appare come una probabile conseguenza della cattiva formazione delle SLN.HPDLL2 cede completamente il farmaco incapsulato.

La formulazione HPDLP2, ha comportamento differente rispetto a HPDLL2, essa in ambiente acido inibisce il rilascio di circa il 90% di D. Inseguito al cambiamento di pH HPDLL2 è in rilascia la quasi totalità del farmaco, invece HPDLP2 non è in grado di premettere il rilascio di più del 40% di D.

La formulazione DLL1 mostra un rilascio di farmaco costante durante tutto il test, tale fenomeno non appare influenzato dal cambiamento di pH. Al contrario la formulazione DLP1 ha un rilascio dipendente dal valore di pH; a pH 6.8 la formulazione DLL1 rilascia circa il 90% di farmaco, invece DLP1 permette il rilascio di circa il 75% di D.

Particolare comportamento hanno le formulazioni DLL2 e DLP2, infatti, esse non sono in grado di rilasciare il farmaco né a pH acido né a pH6.8.

Questo comportamento potrebbe essere influenzato dalla matrice unicamente lipidica che costituisce le nanoparticelle la quale, a causa della sua non completa dissoluzione in ambiente acquoso, trattiene al suo interno il farmaco.

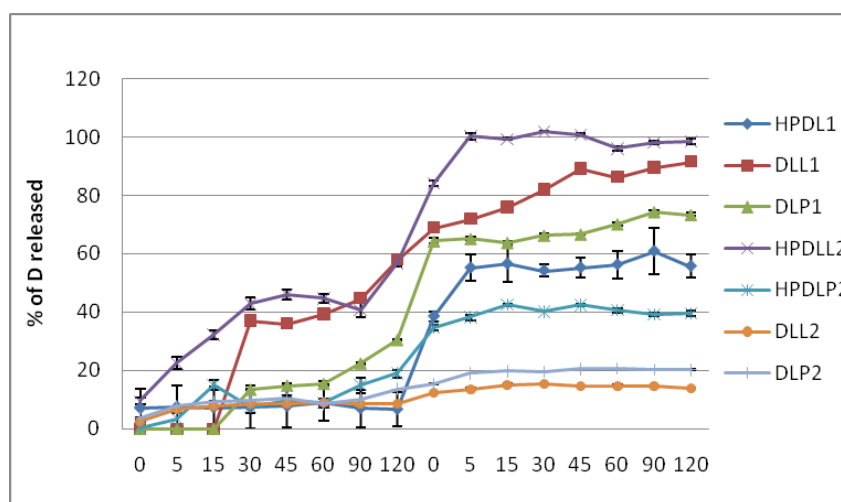


Tabella 6 : Test di rilascio del D in fluido garstro-intestinale simulato

#### 5.4 test di permeazione in vitro

Durante lo svolgimento del test di permeazione in-vitro si è voluta verificare la capacità di ciascuna formulazione di regolare la permeazione del farmaco attraverso una membrana

sintetica. Il test è stato condotto sia a pH 1.2 sia a pH 6.8. A pH acido tutte le formulazioni sono in grado di inibire la permeazione di D e possono essere considerate gastroprotettive.

Le formulazioni DLL2 e DLP2 presentano lo stesso comportamento mostrato durante il test di rilascio in vitro, esse non sono in grado di far permeare il farmaco né a pH 1.2 né a pH 6.8. La formazione del complesso farmaco ciclodestrina all'interno della formulazione HPDL1 e cattiva formazione della particelle sono la causa della mancata permeazione di D attraverso la membrana.

Le formulazioni HPDLL2 e HPDLP2 hanno lo stesso comportamento sia in ambiente acido che in ambiente basico; esso non appare influenzato dalla presenza dei due diversi crioprotettori né dal rapporto farmaco/lipide. Entrambe le formulazioni inibiscono la permeazione a pH acido mentre circa il 90% di D viene ritrovato nel liquido accettore in seguito al cambiamento di pH.

Le formulazioni DLL1 e DLP1 si comportano in maniera differente l'una dall'altra: infatti in ambiente basico la formulazione contenente PVP favorisce la permeazione costante del 55% di D incapsulato; al contrario DLL1 è in grado di favorire il passaggio attraverso la membrana di quasi tutto il farmaco incapsulato (Tabella 7), tale comportamento è legato alla presenza del diverso crioprotettore che appare essere determinante in tutti i test condotti sulle formulazioni DLL1 e DLP1.

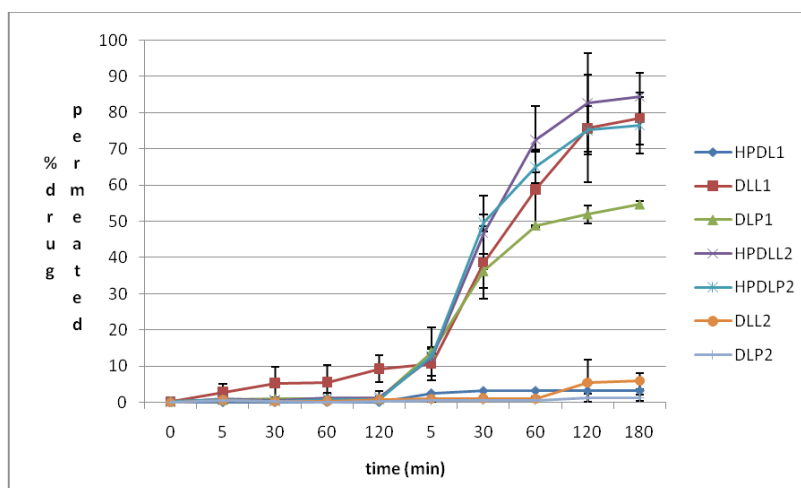


Tabella 7: Test di permeazione in vitro attraverso membrana sintetica in ambiente gastro-intestinale simulato

### 5.5 test di permeazione ex-vivo

La sostituzione della membrana sintetica con un frammento di mucosa intestinale determina la variazione del comportamento delle nanoparticelle durante il test di permeazione a pH 6.8.

La formulazione HPDL1 migliora il profilo di permeazione del farmaco rispetto test condotto in-vitro. Al contrario le formulazioni HPDLL2 e HPDLP2 non appaiono essere in grado di garantire la permeazione di più del 35% di D. Le formulazioni DLL2 e DLP2 mantengono inalterato il profilo di permeazione, l'interazione fra la matrice lipidica e la mucosa non pare influenzare la capacità di permeazione del farmaco attraverso la mucosa stessa. Le formulazioni DLL1 e DLP1 sono in grado di permeare rispettivamente circa il 90% e il 60% di farmaco e il loro comportamento appare influenzato dal tipo di crioprotettore impiegato (Tabella 8).

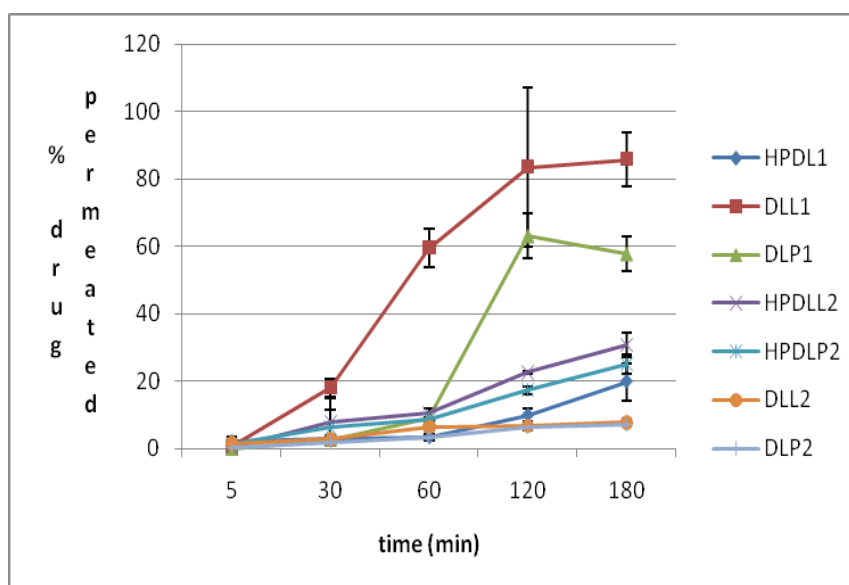


Tabella 8: test di permeazione ex-vivo attraverso mucosa intestinale condotto a pH6.8.

### 5.6 permeazione attraverso il monostrato cellulare

La permeazione del farmaco attraverso il monostrato cellulare presenta risultati simili a quelli ottenuti durante il test di permeazione ex-vivo. Le formulazioni DLL1 e DLP1 favoriscono la permeazione di circa il 70% del farmaco, al contrario le formulazioni HPDLL2 e HPDLP2, così come nei test ex vivo trattengono al loro interno circa il 70% del farmaco incapsulato. Le formulazioni HPDL1, DLL2 e DLP2, invece, contrariamente ai dati ottenuti durante il test ex-vivo appaiono in grado di rilasciare rispettivamente il 60%, 80% e 100% di farmaco.

Durante il test è stata valutata anche la vitalità cellulare mediante TEER e MTT; le formulazioni testate non presentano effetti citotossici sui monostrati cellulari.

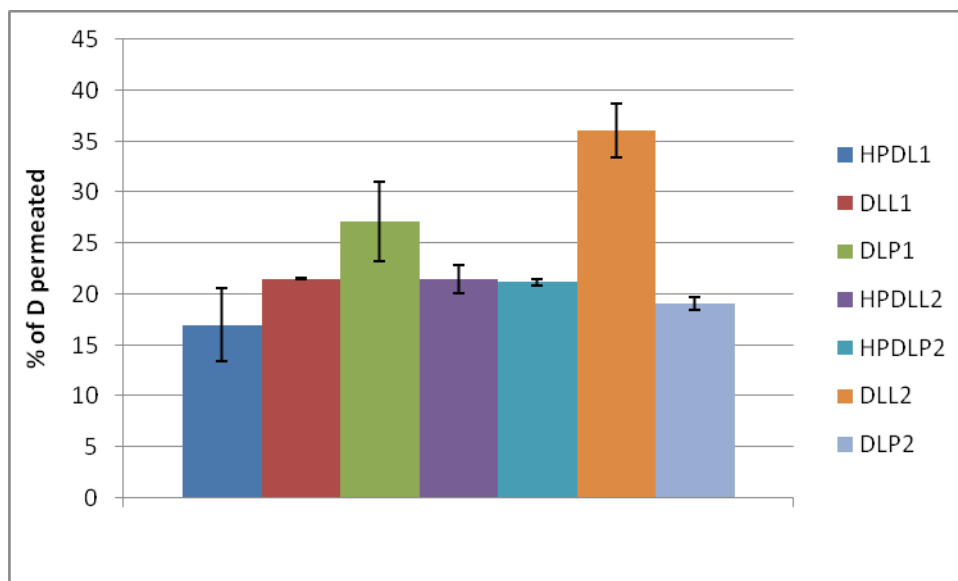


Tabella 9: Test di permeazione attraverso monostrato cellulare

### Discussione

Le SLN sono in grado di incapsulare buone quantità di farmaco e allo stesso tempo di garantire il rilascio e la permeazione all'interno del fluido gastro-intestinale simulato. Tali capacità sono strettamente dipendenti dalla presenza di HP nella matrice, dalla presenza del crioprotettore e allo stesso tempo anche dalla quantità di farmaco incorporato. L'uso di crioprotettori appare influenzare notevolmente il comportamento delle SLN prive di HP ma non di quelle invece che la contengono. Tale fattore potrebbe essere determinato da una diversa interazione del crioprotettore con le SLN in presenza o meno di HP, tuttavia non si hanno elementi sufficienti né pratici né bibliografici per avvalorare tale ipotesi.

Ulteriori studi sull'effetto dei crioprotettori sulla formulazione HPDL sarebbero necessari al fine di valutare se il mancato rilascio del farmaco sia dovuto alla cattiva formazione delle SLN o all'effettiva formazione del complesso farmaco ciclodestrina.

### **CAPITOLO 3: OTTIMIZZAZIONE DEL PROCESSO DI ADSORBIMENTO DI ANTIGENI PROTEICI SU NANOPARTICELLE A BASE DI PLA E PLGA**

Questa parte del lavoro è stata svolta presso i laboratori del Center o Drug Delivery Researche sotto la supervisione della Prof Oya Alpar.

## 6 MATERIALI e METODI

### 6.1 Materiali

Materiale	Produttore
Acido DL polilattico-co-glicolico PLG 2A Peso molecolare:14kDa inherent viscosity: 0.15-0.25 dL/g	Lakeshore Biomaterials USA. Numero di lotto: LP353
Acido L-polilattico Medisorb 100 DL Low IV Peso molecolare:100kDa, inherent viscosity: 0.50-0.65 dL/g	Lakeshore Biomaterials USA. Numero di lotto: LX00111-158.
POLIVINILALCOL,PVA, 98% Hydrolyzed	Aldrich, Germany. Lotto n°: 348406-500G
Chitosano G213 Peso molecolare: 470kDa, grado di de acetilazione: 70-90%, viscosità apparente 20 mPas,	Protasan Ultra-pure, Pronova Biomedical, Norway Lotto n° FP 123-05
D-(+)-Trealosio diidrato	Sigma Germany. Lotto n° T3663
Protamina Solfato	Sigma Germany. Lotto n° 047K1618
Sample Buffer, Laemmli 2x concentrate	Sigma Germa. Lotto n° 107K6121
Precision Plus Protein All blue standards	Biorad, Germany, Lotto n° 310005396
InstantBlue (Comassie Based StainingSolution for Protein Gels)	Prodotto da Expedeon. Lotto n° ISB01L.
Bio-Rad Protein Assay Dye reagent concentrate	Bio-Rad, Germany. Lotto n° 024579

### 6.2 Apparecchiature

Apparecchiature	produttore
Bio-Rad power –pol 1000	Bio-Rad,Germany
Soniprep 150	da Sanyo, Japan
Ultraturrax T25 Basic	IKA-Werke, Swisse
Zetamaster 5Laser Doppler velocimetry (LDV)	Malvern UK
Zetasizer 1000 nano particles analyser by light scattering process.	Malvern UK
Victor 1420 Multilabel counter	Wallac
Sigma laboratories centrifuges 3K30.	SciQuip, Germany
Freeze dryer VIRTIS AdVantage (USA).	

### 6.3 Metodi

I metodi di produzione impiegati per la preparazione delle nanoparticelle sono stati modificati in base alle differenti caratteristiche chimico-fisiche dei due polimeri utilizzati, infatti, essi si differenziano fra loro non solo per il loro peso molecolare ma anche per il tipo di monomeri che li costituiscono. Il PLGA 2A è composto dal 50% di acido lattico e dal 50% di acido glicolico e il suo peso molecolare complessivo è pari a 14kDa. Il PLA 100K è ottenuto unicamente da acido lattico e ha un peso molecolare di 100kDa.

Entrambe le serie sono state ottenute con il metodo dell'emulsione Olio in Acqua in cui la fase oleosa è composta da una soluzione del polimero in diclorometano (DCM); la fase acquosa è costituita da una soluzione di PVA a concentrazione nota. Sono state prodotte due diverse serie di nanoparticelle costituite da diversi lotti: tutte le quantità di polimeri e reagenti utilizzate sono state indicate nelle tabelle riassuntive di seguito esposte (Tabelle 1 e 2)

### 6.3.1 Preparazione della formulazione a base di PLGA

Una soluzione di PLGA 2A in concentrazione 5% p/v in diclorometano (DCM) è stata versata goccia a goccia all'interno di una soluzione acquosa di PVA 0.5% p/v e mantenuta in agitazione magnetica per 5 minuti a temperatura ambiente. La pre-emulsione è stata quindi agitata in vortex per 30 secondi e sottoposta a sonicazione per 2 minuti mediante l'utilizzo di un Sonicatore a immersione (Tabella 1).

Al fine di stabilire il corretto rapporto polimero/surfactante sono state fatte diverse prove atte a garantire

1. La stabilità dell'emulsione,
2. Il *range* dimensionale delle nanogocce compreso fra i 20 e i 200nm.
3. L'indice di polidispersione inferiore a 0.6.

La Tabella 1 riporta schematicamente la composizione della formulazione F scelta tra tutte quelle preparate, essa ha mostrato il pieno raggiungimento degli obiettivi prefissati

Batch	PLGA (p/v%)	PVA (p/v%)	O/A ml	Metodo di emulsione
F	0.5	0.50	5/10	(vortex +sonicazione)

Tabella1: Composizione e parametri preparativi della formulazione contenente il polimero PLGA

### 6.3.2 Preparazione di formulazioni a base di PLA

La serie a base di PLA è stata prodotta sciogliendo 0.125g di polimero all'interno della fase organica composta da 5 ml di DCM. Al fine di ottenere l'emulsione omogenea la soluzione di

PLA in DCM è stata fatta gocciolare all'interno della soluzione acquosa di PVA 2.5% (p/v), tenuta in agitazione costante per 5 minuti a temperatura ambiente e infine è stata omogeneizzata utilizzando un Ultraturrax IKA alla velocità di 17500rpm per 8 minuti. Seguendo tali parametri è stata ottenuta l'emulsione E riportata in Tabella 2.

	PLLA (p/w%)	PVA (p/v%)	O/A (ml)	Metodo di emulsione
E	2.50	2.0	5/5	Omogenizzazione a 17500rpm

Tabella 2: composizione quali e quantitativa e parametri preparativi della formulazione E contenente il polimero PL(L)A

### 6.3.3 Modifica delle serie F ed E per ottenere Nanoparticelle cariche positivamente

Le formulazioni F ed E sono state prese come punto di partenza per la preparazione di nuove formulazioni caratterizzate da una carica superficiale positiva.

A partire da esse sono state prodotte le formulazioni FC ed EC seguendo il metodo di preparazione precedentemente descritto e aggiungendo alla soluzione acquosa di PVA una quantità iniziale pari a 0.3%p/v di Chitosano glutammato (C).

Sempre a partire dalle formulazioni F ed E sono stati prodotti i campioni FP e EP ottenuti attraverso l'aggiunta della proteina di origine cationica Protamina solfato in concentrazione iniziale 0.3p/v.

In base ai risultati ottenuti si è ritenuto opportuno produrre nuovi lotti di nanoparticelle denominati EC/2, contenente 1.5% di C, FP/2 e EP/2 contenenti rispettivamente 0.9 e 2.5% di P, EC/3 contenente 3% di C e infine FP/3 e EP/3 contenenti 2% e 5% di P. Tutte le emulsioni prodotte sono state analizzate in termini dimensionali in triplicato.

### 6.3.4 Prospetto riassuntivo delle formulazioni prodotte.

Serie F

Formulazione F

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
10	PVA 98%		PLGA 2A	DCM	5



	0.5		0.5	5	
--	-----	--	-----	---	--

#### Formulazione FC

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
10	PVA 98% 0.5%	Chitosano G213 0.3	PLGA 2A 0.5	DCM 5	5

#### Formulazione FP

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
10	PVA 98% 0.5%	Protamina 0.3	PLGA 2A 0.5	DCM 5	5

## Series E

### Formulazione E

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
5	PVA 98% 2.5%	_____	PLLA 100K 2.5	DCM 5	5

### Formulazione EC

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
5	PVA 98% 2.5%	Chitosano G213 0.3	PLLA 100K 2.5	DCM 5	5

### Formulazione EP

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
5	PVA 98% 2.5%	Protamina sulfato 0.3	PLLA 100K 2.5	DCM 5	5

## Series F/2

### Formulazione FP/2

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
10	PVA 98% 0.5%	Protamina solfato 0.9	PLGA 2A 0.5	DCM 5	5

## Series E/2

### Formulazione EC/2

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
5	PVA 98% 2.5%	Chitosano G213 1.5	PLLA 100K 2.5	DCM 5	5

### Formulazione EP/2

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
5	PVA 98% 2.5%	Protamina solfato 2.5	PLLA 100K 2.5	DCM 5	5

### Series F/3

#### Formulazione FP/3

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
10	PVA 98% 0.5%	Protamina solfato 2	PLGA 2A 0.5	DCM 5	5

### Serie E/3

#### Formulazione EC/3

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
5	PVA 98% 2.5%	Chitosano G213 3	PLLA 100K 2.5	DCM 5	5

#### Formulazione EP/3

Fase acquosa			Fase organica		
Volume ml	concentrazione del surfactante (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	concentrazione del polimero (m/v%)	volume del solvente (ml)	Concentrazione del surfactante(m/v)
5	PVA 98% 2.5%	Protamina solfato 5	PLLA 100K 2.5	DCM 5	5

### 6.3.5 Analisi delle dimensioni particellari prima e dopo l'essiccamento

Le nanoemulsioni prodotte sono state sottoposte al processo di evaporazione del solvente organico al fine di ottenere una sospensione acquosa di nanoparticelle le cui dimensioni sono

state misurate mediante Dinamic light scattering (Zetasizer 1000 prodotto da Malvern) previa dispersione di alcune gocce di sospensione in acqua. Le sospensioni prodotte sono state sottoposte a liofilizzazione e al termine del processo una punta di spatola di nanoparticelle viene dispersa in 2ml di acqua, agitata in vortex per due minuti e sottoposta ad analisi dimensionale al fine di valutarne le dimensioni e l' IP. Ogni analisi è stata eseguita tre volte e i dati ottenuti sono stati espressi come media  $\pm$  Deviazione Standard.

### **6.3.6 Processo di essiccamento mediante liofilizzazione**

Prima del processo di essiccamento condotto mediante la tecnica del freeze-drier una quantità nota di una soluzione acquosa di trealosio al 5%p/v viene aggiunta alla sospensione nanoparticellare in qualità di crioprotettore. Il rapporto in volume fra la soluzione di trealosio e la sospensione di nanoparticelle è di 1:1 v/v.

Le nanosospensioni ottenute sono state congelate a -80 gradi prima di essere disposte all'interno del freeze drier. Il processo è stato condotto ad una temperatura di -20 gradi durante la prima fase di essiccamento al fine di rimuovere la maggior parte dell'acqua e a +2 gradi durante la seconda fase per favorire l'evaporazione totale dell'acqua attraverso il trasferimento di massa; la pressione interna del sistema era stata selezionata a 80 mBar

### **6.3.7 Valutazione del Potenziale Z delle particelle prima e dopo l'adsorbimento della proteina**

Il valore di potenziale Z è stato misurato al fine di valutare la carica superficiale delle nanoparticelle prodotte e l'eventuale influenza del C e di P sulla carica delle nanoparticelle a base di PLGA e PLA. Tale fattore è infatti determinante nel processo di adsorbimento a causa dell'attrazione e repulsione delle cariche presenti sia sulla proteina che sulle nanoparticelle.

L'analisi del potenziale Z delle nanoparticelle prodotte è stata fatta disperdendo uniformemente 2mg di nanoparticelle in 0.2 ml di acqua. Le condizioni operative in cui il test è stato eseguito sono le stesse utilizzate per le prove di adsorbimento della proteina. Tale accorgimento è stato adottato al fine di simulare il valore di potenziale Z misurabile durante il test di adsorbimento. La sospensione nanoparticellare prodotta viene a sua volta dispersa nel mezzo d'analisi costituito da 1ml di KCl 0.1M.

### **6.3.8 Studio sul processo di adsorbimento della proteina BSA sulla superficie nano particellare**

Le nanoparticelle prodotte ed essiccate hanno lo scopo di veicolare proteine ed in modo particolare antigeni con attività terapeutica. Il metodo classico per la veicolazione di tali sostanze è l'incapsulazione della proteina all'interno della nanoparticella durante la fase di emulsione. Tuttavia al fine di evitare il contatto di quest'ultima con solventi organici che potrebbero determinarne la degradazione si è voluto approfondire il metodo dell'adsorbimento non ancora del tutto conosciuto.

Diversi fattori devono essere presi in considerazione al fine di ottenere il totale adsorbimento della proteina:

- Rapporto fra la concentrazione della proteina e delle nanoparticelle
- Punto isoelettrico della proteina, che è rappresentato da quella concentrazione di ioni idrogeno del mezzo e quindi del pH, tale da far assumere al protide una forma zwitterionica, quindi di doppia carica che corrisponde al valore di minima solubilità della proteina.
- Carica molecolare della proteina e della nanoparticella.

Durante lo sviluppo del processo sono stati studiati

1. i mezzi acquosi (NaCl 0.2M, tampone fosfato pH 5 e acqua) idonei per l'adsorbimento,
2. temperatura ideale per il processo di adsorbimento (4°C, 25°C e 37°C),
3. il tempo necessario per garantire il massimo adsorbimento,
4. eventuali trattamenti atti a favorire il contatto tra le due specie come per esempio utilizzo del vortex e di piattaforme basculanti. I
5. In modo particolare è stato studiato il rapporto migliore fra la concentrazione della BSA e quella delle nanoparticelle atto a garantire il massimo adsorbimento della proteina sulla superficie nano particellare.

Il test è stato condotto mettendo a contatto 1 ml di una soluzione 1mg/ml di BSA con 5mg di nanoparticelle; successivamente le sospensioni così formate sono state agitate in vortex per 1 minuto e posizionate su una piastra basculante alla velocità di 50rpm a temperatura ambiente o a 37°C, oppure conservate in frigorifero. Ad intervalli di tempo di 5, 15, 30 60 e 90 minuti sono stati fatti dei prelievi al fine di valutare l'avvenuta reazione fra le nanoparticelle e la proteina, alcune sospensioni sono state lasciate in incubazione per tutta la notte e analizzate il mattino successivo. Le analisi condotte durante gli intervalli di tempo indicati sono state fatte

valutando la quantità di proteina contenuta nel surnatante prelevato attraverso il metodo Bradford.

Al termine del processo di adsorbimento, la sospensione è stata centrifugata a 3°C per 30 minuti alla velocità di 21000 rpm. La centrifugazione a temperatura controllata è necessaria per evitare la degradazione del PLGA osservata in seguito a centrifugazione in ambiente non termostato.

Il surnatante ottenuto è stato utilizzato per verificare, mediante analisi Bradford per metodo indiretto, la quantità di BSA non adsorbita.

Le nanoparticelle sedimentate sono state sottoposte a digestione in NaOH 2N al fine di ottenere la degradazione del polimero e il passaggio in soluzione della BSA adesa alla superficie nano particellare.

### **6.3.9 Valutazione della quantità di BSA adsorbita**

I test sulla valutazione della quantità di BSA adsorbita sono stati fatti utilizzando il metodo spettrofotometrico di *Bradford*.

Il test si basa sulla determinazione quantitativa per via spettrofotometrica della proteina presa in analisi. La procedura prevede la formazione di un complesso fra il colorante e la proteina in soluzione. Esso causa un'assorbanza allo spettrofotometro UV del colorante compresa fra 465 e i 595nm. Interazioni sia idrofobiche e ioniche stabilizzano la forma anionica del colorante causando un visibile cambiamento di colore. La quantità di complessi che si formano misurano la quantità di proteina effettivamente legata col colorante.

- *Metodo Indiretto*

Il surnatante ottenuto dalla centrifugazione della sospensione contenente nanoparticelle caricate con la proteina viene separato dalla porzione sedimentata: 10 µl di liquido vengono prelevati e fatti reagire con 200µl di colorante in modo da garantire la formazione del complesso che è stato in seguito analizzato alla lunghezza d'onda di 470nm.

- *Metodo diretto o digestione*

Il metodo della digestione prevede l'incubazione delle nanoparticelle, separate tramite centrifugazione dal surnatante, in 1 ml di NaOH 2M per due ore, a temperatura ambiente, sotto agitazione meccanica costante a 40 rpm al fine di garantire la loro completa disgregazione e il passaggio in soluzione della proteina.

10 µl di NaOH di digestione sono stati quindi prelevati e fatti reagire con il colorante come precedentemente descritto.

Prima di procedere allo sviluppo dei due metodi è stato necessario verificare che il mezzo acquoso, e i polimeri utilizzati nella produzione delle nanoparticelle non influenzassero la lettura dell'assorbanza del complesso proteico.

#### **6.3.10 Analisi al Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)**

L'analisi al TEM (Microscopio a Trasmissione Elettronica) è stata fatta per verificare le dimensioni e la forma delle nanoparticelle in seguito ad essiccamento e adsorbimento di BSA. L'analisi è stata fatta usando un TEM (Transmission Electron Microscopy) (FEI CM120 BioTwin, USA).

Una goccia di sospensione nanoparticellare è stata depositata su una lastra di carbonio ricoperta con un foglio di rame di 200 mesh e lasciata riposare per circa 1,5minuti; dopo questo periodo, il fluido in eccesso viene rimosso con la carta da filtro. La lastrina è stata ricoperta con una soluzione acquosa di uranilacetato all'1% per alcuni secondi e l'eccesso della soluzione è stato rimosso con la carta da filtro. La lastrina è stata quindi esaminata al microscopio a trasmissione elettronica. Le immagini sono state ottenute con una fotocamera digitale del tipo AMT IK+IK Digital Camera.

#### **6.3.11 Verifica della presenza della proteina sulla superficie delle nanoparticelle e della sua degradazione in seguito al processo di adsorbimento**

Dopo la procedura di adsorbimento, le proteine estratte dalle nanoparticelle mediante digestione in NaOH 2M sono state analizzate con l'SDS-Page per verificare che non siano state degradate durante le varie fasi del test.

Nonostante il metodo dell'SDS-page sia di tipo qualitativo è possibile anche comparare, in base all'ampiezza delle bande ottenute, la quantità di proteina adsorbita dai diversi lotti di nanoparticelle prodotte.

#### **6.3.12 L' SDS-Page**

L'SDS-Page è stata fatta per verificare l'integrità della proteina in seguito al processo di adsorbimento sulle nanoparticelle polimeriche

La separazione della proteina mediante SDS-Page è stata effettuata utilizzando una camera elettroforetica MINI-PROTEAN II Bio-Rad e due lastre di separazione assemblate insieme. Il gel è stato ottenuto mediante la preparazione di due soluzioni che sono state fatte gelificare



nello spazio fra le due lastre. Le soluzioni gelificate formano una fase superiore (stacking) e una fase inferiore (separating).

La fase Stacking, a minore concentrazione, consente a tutte le proteine di posizionarsi sullo stesso fronte di corsa all'inizio della migrazione, mentre la fase Separating, la cui concentrazione è variabile a seconda dei pesi molecolari che si intende visualizzare preferenzialmente, determina la separazione elettroforetica vera e propria. Il gel di separazione è stato versato fra le lastre e ricoperto da un sottile strato di acqua per facilitare la polimerizzazione. Dopo di che su di esso è stato versato lo stacking gel, previa rimozione dell'acqua. Il posizionamento del "pettine" durante la polimerizzazione del ultimo gel ha consentito la formazione dei pozzetti nei quali sono stati caricati i campioni. Prima di essere disposti sul gel, i campioni sono stati miscelati col tampone di caricamento e riscaldati a 95°C per 5 minuti al fine di consentire la completa denaturazione delle proteine. La presenza di un marcatore di pesi molecolari ha consentito l'identificazione delle dimensioni della proteina presa in considerazione.

Alla fine della corsa il gel è stato colorato con blu di comassie per mettere in evidenza le bande relative alla proteina. Dopo circa 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente il colorante esso è stato rimosso dal gel mediante lavaggi con soluzione decolorante fino visualizzare le singole bande blu su fondo chiaro.

#### ***6.4 Processo di adsorbimento di frammenti proteici derivanti dal capsido del Blue Tongue Virus***

Tre diversi frammenti denominati F1, F2, F3 derivanti dal capsido VP2 del Blue Tongue Virus sono stati sottoposti a processo di adsorbimento sulla formulazione FC1

I test sono stati condotti come precedentemente descritto in base ai migliori risultati ottenuti utilizzando la BSA come protein modello. La valutazione della capacità di adsorbimento è stata fatta tramite analisi Bradford ed SDS-Page.

## 7 RISULTATI

### 7.1 Preparazione dell'emulsione

Le nanoparticelle prodotte col metodo dell'emulsione O/A sono state classificate in due serie differenti a causa delle diverse caratteristiche fisiche dei due polimeri impiegati. Tali differenze hanno determinato la necessità di individuare tempi diversi di emulsione e l'utilizzo di diverse concentrazioni di PVA quale agente surfactante.

### 7.2 Analisi dimensionale delle emulsioni e delle nanoparticelle essiccate

Tutte le formulazioni sono state analizzate dal punto di vista dimensionale prima del processo di liofilizzazione (Tabella 3). Esse hanno tutte dimensioni medie inferiori ai 100nm, il valore di IP è inferiore a 0.6. Tali valori indicano che il metodo di produzione determina la formazione di una nanoemulsione composta da famiglie di particelle omogenee e monodimensionali.

lotto	Dimensioni (nm)	IP
E	35.2±3.3	0.354
EC	42.8±2.9	0.397
EP	73.1±7.3	0.382
EC2	37.5±2.6	0.274
EP2	25.1±4.2	0.396
EC3	38.4±2.9	0.528
EP3	22.7±3.7	0.533
F	26.6±2.8	0.321
FC	76.7±3.8	0.012
FP	48.7±2,6	0,438
FP/2	53.6±5.7	0.629
FP/3	52.8±6.3	0.573

Tabella 3: Dimensioni particellari prima del processo di essiccamento.

Le nanoparticelle sottoposte a essiccamento in presenza di trealosio 5%(p/p), quale agente crioprotettore, sono state analizzate nuovamente tramite DLS al fine di valutare il diametro medio delle particelle essiccate, tuttavia le piccolissime dimensioni delle particelle non consentono una ridispersione ottimale della polvere né l'ottenimento di dati verosimili tramite questo tipo di analisi. Al fine di ottenere dati attendibili riguardo alla dimensione e alle caratteristiche morfologiche delle nanoparticelle solide, esse sono state analizzate al TEM, i risultati di tale analisi verranno ampiamente discussi successivamente.

### 7.3 Valutazione dell'adsorbimento della proteina

Come precedentemente descritto, 5mg esattamente pesati di nanoparticelle sono stati messi a contatto con una soluzione acquosa di BSA 1mg/ml.

Sono stati valutati tutti i parametri in grado di influenzare il completo adsorbimento della BSA sulla superficie nanoparticellare. Come è possibile osservare dalla Tabella 4, le formulazioni F ed E sottoposte al test usando come mezzo di dispersione il tampone acetato a pH5 e l'NaCl 0,2M non hanno dimostrato diversità di comportamento al variare del mezzo. Pur mantenendo in contatto la proteina con le nanoparticelle overnight, in piattaforma basculante a 50 rpm, non si osserva una capacità di assorbimento da parte delle nanoparticelle superiore al 50%. Anche la temperatura di reazione non appare essere un parametro in grado di influenzare la capacità di adsorbimento della proteina.

In Tabella 5 sono riportate le percentuali di BSA adsorbita sulle formulazioni serie F ed E messe a contatto nei tre mezzi acquosi sopra citati. Le percentuali sono espresse in termini di Loading Efficiency (LE%), tale valore è dato dal rapporto fra la quantità di proteina adsorbita e la quantità di proteina presente all'interno della sospensione iniziale.

	pH5	NaCl 0.2	H2O
F	39,27	54,73	51,84
FC	37,99	44,76	98,35
FP	41,32	37,2	61,56
E	40,59	43,28	53,71
EC	40,91	55,66	56,01
EP	39,40	42,67	61,07

Tabella 5: Percentuali di BSA adsorbita sulle formulazioni serie F ed ED nei vari mezzi acquosi.

Dal grafico (Figura 1) riportante la quantità di BSA adsorbita in funzione del tempo di incubazione si evince che

- l'unica formulazione in grado di adsorbire il 100% della proteina presente in soluzione è la FC
- l'unico mezzo in cui la reazione avviene in maniera completa è l'acqua
- Il mancato adsorbimento in tampone acetato e in NaCl è dovuto probabilmente all'interazione degli ioni delle soluzioni saline con la superficie nano particellare, tale interazione potrebbe inibire l'adsorbimento completo della proteina.

È possibile dedurre dalla Figura 1 che i tempi di interazione fra nanoparticelle e BSA sono molto brevi: infatti dopo soli 5 minuti la formulazione FC ha adsorbito quasi il 90% della

proteina, dopo 15 minuti il 100% è adesa alle pareti particellari e dopo 60 minuti è già iniziata la fase di desorbimento.

L'analisi preliminare atta a verificare la quantità di proteina adsorbita è stata condotta col metodo Bradford attraverso l'analisi del surnatante.

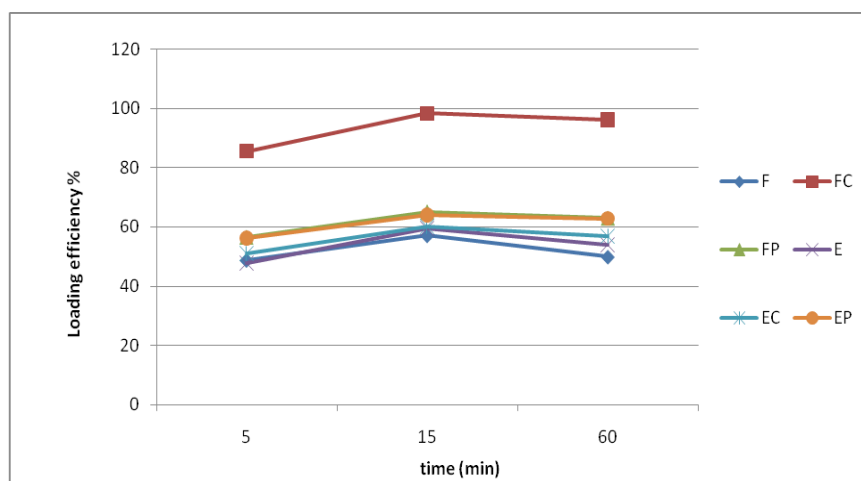


Figura 3: Analisi della percentuale di proteina adsorbita nell'arco di tempo di 60 minuti.

In base ai risultati ottenuti con lo studio del processo di adsorbimento sulle nanoparticelle della prima serie le formulazioni delle serie F/2, E/2, e F/3 ed E/3 sono state sottoposte ad adsorbimento in acqua a temperatura ambiente per 15 minuti. L'unica variabile presa in considerazione durante i test è stata la variazione delle concentrazioni di C o P all'interno delle formulazioni prodotte.

### 7.3.1 Valutazione dell' adsorbimento della proteina mediante analisi del surnatante (metodo indiretto)

In seguito ad analisi indiretta del surnatante si è osservato che le formulazioni della serie 2 non mostrano particolari variazioni nella capacità di interazione fra la proteina e le nanoparticelle nonostante le quantità di C e di P siano state raddoppiate e la carica superficiale delle nanoparticelle sia positiva (Tabella 6). In seguito ad ulteriore aumento della quantità di C e P si osserva un adsorbimento della proteina sulla formulazione EC/3 pari a circa 88% (Tabella 7). Le formulazioni contenenti P non sono in grado di adsorbire più del 45% di BSA. Le formulazioni F e E adsorbono rispettivamente circa il 45% e il 40% di BSA. Tutti valori riportati in tabella sono stati ottenuti attraverso l'analisi del surnatante mediante test di Bradford.

	F	FC	FP/2	FP/3	E	EC/2	EC/3	EP/2	EP/3
%LE	43.83	81.14	44.76	42.41	37.20	55.66	87.98	42.67	43.37±
	±3.27	±5.45	±5.79	±0.154	±2.39	±4.54	±1.03	±1.51	0.12

Tabella 6: Percentuali di BSA adsorbita sulle formulazioni serie F/2 e 3 ed E/2 e 3 in acqua ottenuti tramite analisi indiretta del surnatante.

### 7.3.2 Analisi della quantità di proteina presente sulla superficie nano particellare (Metodo Diretto)

In seguito a digestione delle nanoparticelle in NaOH 2M è stato possibile verificare la quantità di proteina effettivamente legata alla superficie nanoparticellare. Tutti i lotti sottoposti al processo di adsorbimento sono stati analizzati. Dalla Tabella 7 è possibile osservare che le uniche formulazioni in grado di trattenere quasi il 100% di BSA sulla superficie sono FC ed EC/3. La formulazione EP/2 è l'unica contenente P in grado di adsorbire più del 50% di proteina, le formulazioni F e E prive sia di C che di P adsorbono circa il 40% di BSA.

Lotto	F	FC	FP/2	FP/3	E	EC/2	EC/3	EP/2	EP/3
LE%	40.45	95.65	27.32	55.51	33.79	29.23	96.20	60.43	34.98
	±0.06	±0.20	±0.83	±1.27	±0.42	±0.14	±1.43	±0.42	±5.62

Tabella 7: Percentuali di BSA adsorbita sulle formulazioni serie F/2 e 3 ed E/2 e 3 in acqua ottenuti tramite analisi diretta per digestione delle nanoparticelle in NaOH 2M.

### 7.3.3 Comparazione dei risultati ottenuti con i metodi diretto e indiretto

Comparando i dati ottenuti è possibile osservare che le quantità di BSA ritrovata con i due metodi, sono molto simili sia nelle formulazioni della serie F/2 e E/2 che in quelle delle serie F/3 ed E/3, quindi entrambi sono attendibili nella veridicità dei valori ottenuti.

In Tabella 8 è stata fatta la somma fra le quantità di BSA ritrovata adesa alla superficie nanoparticellare e la quantità di BSA ritrovata nel surnatante. La quantità totale di BSA derivata è molto vicina al valore teorico di 1mg/ml di BSA iniziale contenuto nella sospensione.

	mg di BSA adesa	mg di BSA in surnatante	mg totali
F	0.202	0.627	0.827
FC	0.956	0.188	1.194
FP/2	0.137	0.621	0.758

E	0.169	0.611	0.779
EC/2	0.646	0.146	0.792
EP/2	0.302	0.627	0.929
FP/3	0.278	0.603	0.881
EC/3	0.962	0.120	1.082
EP/3	0.175	0.575	0.750

Tabella 8: Riassunto della quantità di proteina ritrovata nelle formulazioni prodotte.

#### ***7.4 Potenziale Z delle particelle prima e dopo l'adsorbimento della proteina.***

In seguito a valutazione del potenziale Z, le NP composte solo da PLGA o PLA, hanno una netta carica negativa poiché sono formate da due polimeri entrambi carichi negativamente. L'aggiunta del C e della P, il primo un polimero cationico e la seconda una proteina nucleare anch'essa cationica, conferiscono loro carica positiva. Tali materiali sono stati individuati ed utilizzati nella produzione delle formulazioni al fine di variare la carica superficiale e di migliorare conseguentemente l'adsorbimento della BSA carica negativamente attraverso l'attrazione delle cariche opposte fra la proteina e le nanoparticelle.

In Tabella 9 sono riportati i valori di potenziale Z delle NP appartenenti alla prima serie misurati prima e dopo il processo di adsorbimento della BSA sulla superficie nanoparticellare: In Tabella 10 sono stati riportati i valori di potenziale relativi alle formulazioni delle serie 2 in cui è possibile notare che l'incremento della concentrazione di C e P non ha cambiato in maniera sostanziale la carica particellare. In tutte le formulazioni della serie 2 si nota l'incremento del potenziale Z di un punto rispetto alle formulazioni corrispondenti nella serie 1 in seguito all'aggiunta degli eccipienti cationici. Nelle formulazioni della serie 3 (Tabella 11), invece, l'aggiunta di elevate concentrazioni di C e P determina un netto incremento della carica superficiale di tutte le formulazioni eccezion fatta per la formulazione EP/3 il cui valore rimane invariato.

lotto	Potenziale Z	Potenziale Z
	pre-adsorbimento	post-adsorbimento
F	-3.2±0.3	0.5±0.2
FC	22.8±2.9	13.2±1.2
FP	9.8±1.3	-3.3±0.2
E	-3.6±0.2	-1.8±0.9
EC	13±2.3	10.2±0.6
EP	5±1.4	-0.9±0.7

Tabella 9: Valori di potenziale Z delle serie F e ED prima e dopo il processo di adsorbimento

lotto	Potenziale Z	Potenziale Z
	pre-adsorbimento	post-adsorbimento
FP/2	10.8±1.0	-4.3±0.5
EC/2	14.1±0.5	14.9±0.4
EP/2	5.6±0.5	2.5±0.5

Tabella 10: Valori di potenziale Z delle serie F/2 e ED/2 prima e dopo il processo di adsorbimento

lotto	Potenziale Z	Potenziale Z
	pre-adsorbimento	post-adsorbimento
FP/3	27.1±0.7	10.4±0.9
EC/3	18.9±2.	14.4±0.7
EC/3	5±1.4	0.0±0.4

Tabella 11: Valori di potenziale Z delle serie F/3 e ED/3 prima e dopo il processo di adsorbimento

In seguito al test di adsorbimento è possibile osservare le seguenti variazioni di carica:

- Le formulazioni E e F, entrambe cariche negativamente, non subiscono significative variazioni elettriche in seguito all'adsorbimento della BSA.
- FC, contenente 0.3% di C, subisce una variazione di potenziale elettrico pari a circa 10 punti, mentre tali valori non sono stati raggiunti né nella formulazione EC, contenente la stessa quantità di C, né in EC/2 contenente 1.5% di C; ciò è dovuto al fatto che FC è la sola formulazione in grado di adsorbire il 90% di BSA.
- EC/3, composto da 3% di C, raggiunge valore di potenziale pari a 18.9 che varia fino a 14.4 in presenza della proteina adsorbita.

In generale si può affermare che tutte le formulazioni contenenti C, messe a contatto con la BSA diminuiscono di circa 3-10 punti il valore di potenziale Z.

Le formulazioni contenenti protamina hanno potenziale Z compreso fra 5 e 9 in assenza di BSA, in presenza di BSA. Il potenziale diminuisce in tutte le formulazioni di circa 5 punti e di 15 punti nella formulazione FP/2, nonostante esse non siano in grado di adsorbire l'intera quantità di BSA con cui entrano in contatto.

Si può facilmente dedurre che la carica positiva delle nanoparticelle data dalla presenza del C e delle P tende ad essere neutralizzata dalla carica negativa della BSA adesa alla superficie

delle nanoparticelle, mentre la carica negativa delle nanoparticelle a base di solo PLGA o PLA rimane pressoché inalterata.

### ***7.5 Analisi al TEM***

Le dimensioni delle particelle essiccate e sottoposte ad adsorbimento della proteina sono state misurate mediante TEM. Tutte le formulazioni analizzate sono costituite da particelle di dimensioni inferiori ai 100nm e *range* dimensionale molto stretto.

Come si può osservare la Figura 4 a-b riporta le immagini delle formulazioni E ed EC/3. Esse sono costituite da nanoparticelle aventi diametro compreso fra i 27 e i 90 nanometri, sono di forma sferica, ben formate e separate fra di loro. La presenza del C nella formulazione EC/3 non sembra influenzare le caratteristiche morfologiche delle nanoparticelle. Le formulazioni F e FC (Figura 5 a-b) hanno dimensioni comprese fra i 20 e i 90 nm, al contrario delle formulazioni della serie E, le dimensioni variano a seconda del tipo di formulazione, infatti F è costituita da particelle più grandi e aventi forma meno definita, al contrario la formulazione FC è composta da nanoparticelle sferiche ben formate e ben separate fra loro.



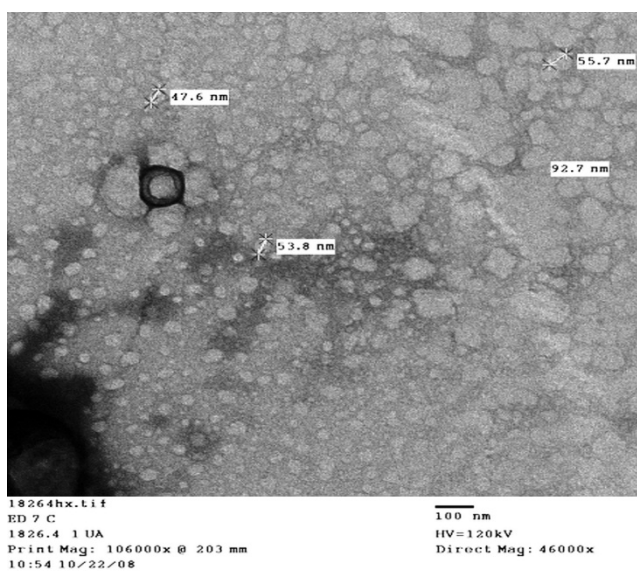
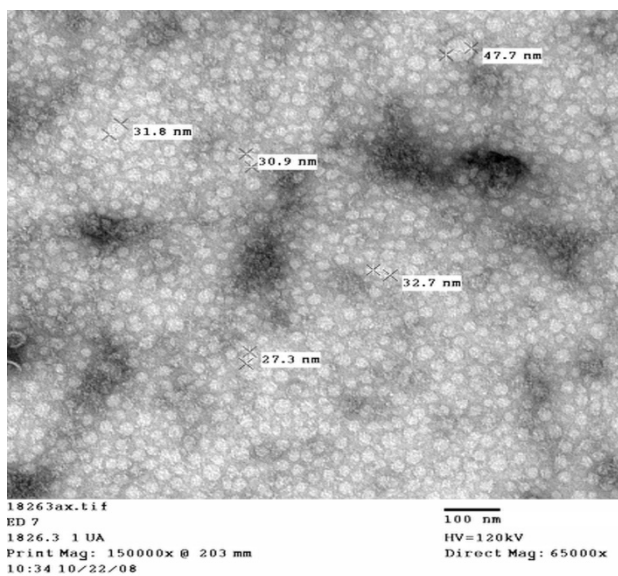


Figura 4: a)Analisi al TEM della formulazione E sottoposta ad essiccamento ed adsorbimento.  
b)Analisi al TEM della formulazione EC sottoposta ad essiccamento ed adsorbimento

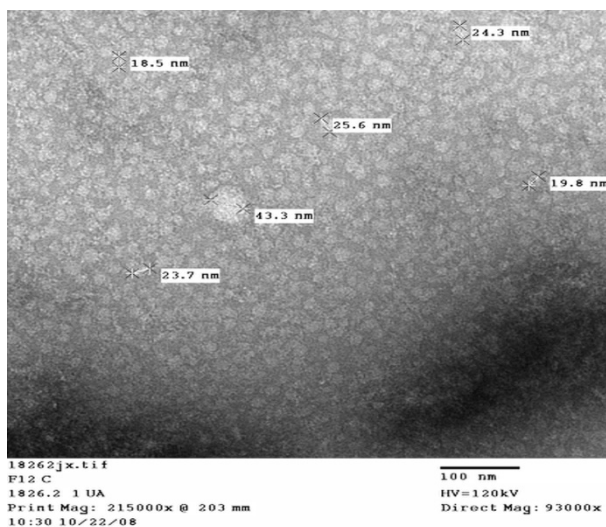
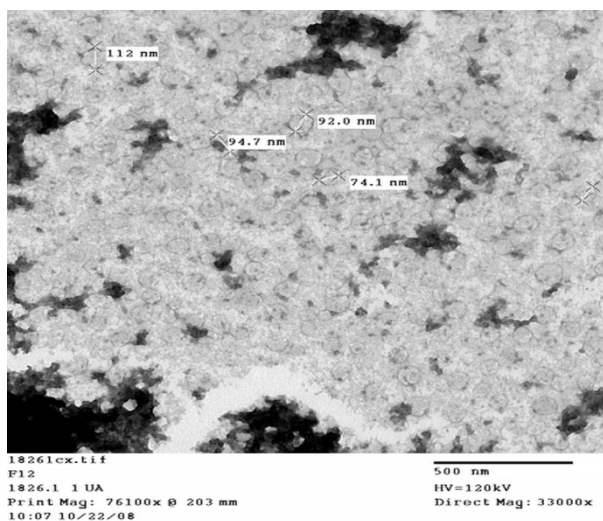


Figura 5: a)Analisi al TEM della formulazione F sottoposta ad essiccamento ed adsorbimento.  
 b)Analisi al TEM della formulazione FC sottoposta ad essiccamento ed adsorbimento

### 7.6 Test di rilascio in vitro

Il test di rilascio in vitro è stato condotto esclusivamente su alcune delle formulazioni prodotte: E, EC; EP; F, FC, FP/3(Figura 6) I dati ottenuti dimostrano che le nanoparticelle F e E rilasciano circa il 25% della BSA nell'arco della prima ora del test e tale valore resta pressoché invariato nell'arco delle 24 ore.

Le formulazioni contenenti Protamina (EP e FP/3) sono in grado di rilasciare una quantità di BSA pari a circa il 60% già nelle prime due ore test e tale valore rimane costante nell'arco dell'intero periodo di analisi.

Le formulazioni F e E FP/3 e EP accomunate fra loro dalla presenza o meno della protamina hanno comportamento simile: infatti entrambe le formulazioni prive di protamina non sono in grado di cedere oltre il 30 % di BSA, invece le formulazioni contenenti la protamina hanno maggiori capacità di rilascio.

Le due formulazioni FP/3 e EP divergono fra di loro per la diversità del polimero utilizzato e per la quantità di protamina presente, tuttavia questi fattori non sembrano influenzare le capacità di cessione della BSA da parte delle nanoparticelle.

Le formulazioni contenenti C rilasciano quantità di BSA diverse, infatti la formulazione EC/3 rilascia circa il 10% in più di proteina rispetto alla formulazione FC, ciò è dovuto probabilmente al fatto che la formulazione contiene il 2,2% in più di Chitosano rispetto alla formulazione FC e si verifica di conseguenza una diversa degradazione della matrice polimerica nano particellare a cui la BSA è adesa.

Dai risultati ottenuti sembra che non ci sia una differenza di comportamento fra il PLGA e il PLA per quanto riguarda la capacità di cessione della proteina. Al contrario l'assenza del Chitosano o della Protamina determinano una diminuzione del rilascio di proteina all'interno del mezzo accettore.

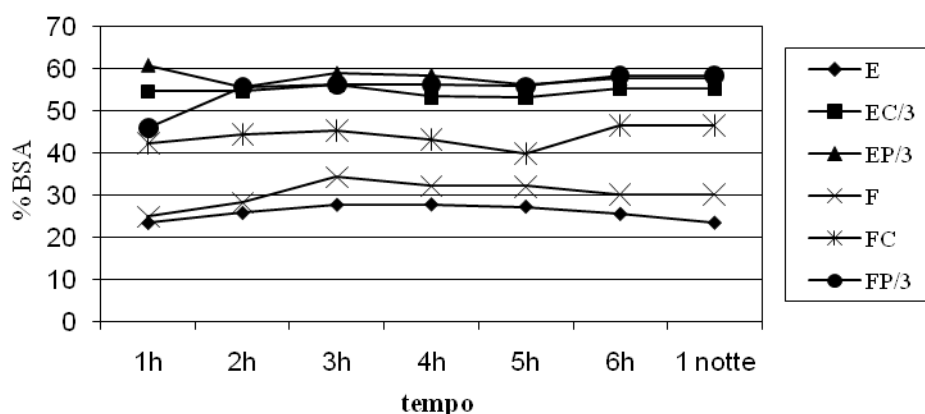


Figura 6: Rilascio in vitro di BSA adsorbita sulle formulazioni della serie 3.

Un nuovo test di rilascio in vitro della durata di 1 mese (Figura 7) è stato fatto per valutare la quantità di proteina rilasciata nell'arco di tempo più lungo e osservare un' eventuale rilascio

controllato della proteina. Dopo 20 giorni di test ,condotto in tampone fosfato a pH7,la quantità di BSA rilasciata non è aumentata rispetto alla quantità rilasciata dopo 1 giorno di incubazione,ma al contrario alcune analisi hanno dimostrato che la BSA tende a formare dei legami reversibili con il polimero dal momento che la percentuale di proteina ritrovata nel mezzo spesso diminuisce di alcuni punti percentuale (Figura 7).

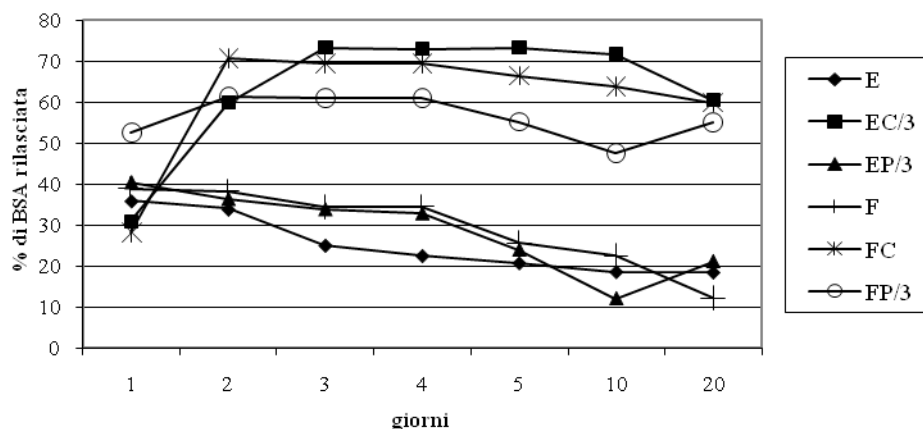


Figura 7: Rilascio in vitro della BSA adsorbita sulle formulazioni della serie3 condotto nell'arco di 20 giorni.

L'analisi al TEM (Figura 8)condotta al termine del periodo di incubazione delle nanoparticelle sottoposte a test di rilascio dimostra che esse hanno perso la loro forma sferica e che quindi sono state soggette a degradazione del polimero come previsto.

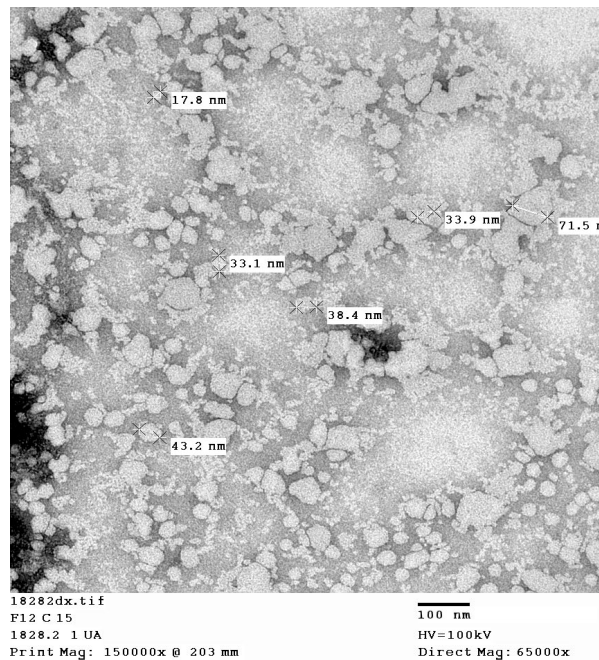
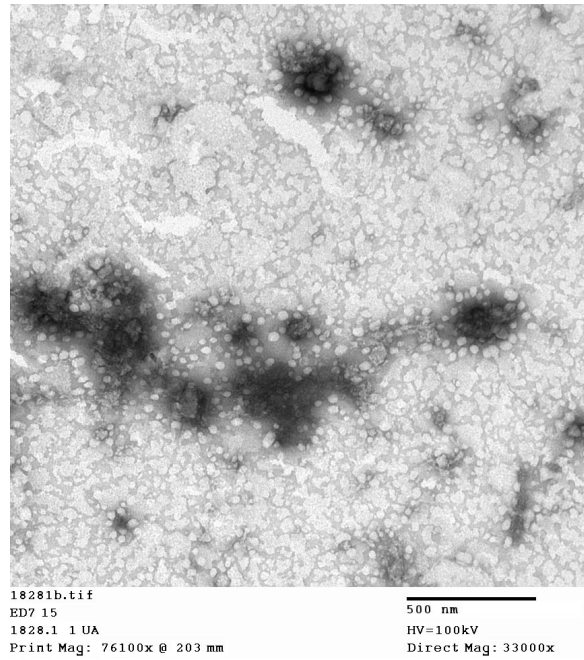


Figura 8: a) Analisi al TEM della formulazione E sottoposta a test di rilascio in vitro b) Analisi al TEM della formulazione FC sottoposta a test di rilascio in vitro.

### 7.7 SDS-Page

Tutte le prove di adsorbimento della BSA sulle nanoparticelle attuate in diversi mezzi acquosi sono state corredate di analisi della proteina mediante SDS-page al fine di stabilire l'effettiva presenza di quest'ultima sulle nanoparticelle e in modo particolare la sua integrità. Dalle fotografie ottenute si può osservare che in seguito ad adsorbimento in tampone acetato pH5, (Figura 9) in NaCl 0.2M (Figura 10) e acqua (Figura 11) la BSA non viene danneggiata, infatti si può notare chiaramente la banda a 66KDa caratteristica per la BSA. L'intensità simile delle bande presenti nei gel indicano che tutte le formulazioni hanno adsorbito, sia in ambiente acido che in NaCl, la stessa quantità di proteina, tale valore è confermato dai dati ottenuti con l'analisi diretta e indiretta attraverso il metodo Bradford. La minore intensità delle bande corrispondenti alla proteina adsorbita confrontata con la banda della BSA standard, avente concentrazione 1mg/ml, indica chiaramente che non tutta la proteina è stata adsorbita dalle nanoparticelle.

Dall'immagine del gel relativo all'adsorbimento della proteina sulle formulazioni della serie 3 condotto in acqua sono chiaramente visibili le bande corrispondenti alla proteina adsorbita su FC e EP/3; esse risultano molto più marcate rispetto alle bande relative alle altre formulazioni. Tale fenomeno è senza dubbio causa di un maggiore adsorbimento della proteina sulla superficie delle formulazioni contenenti Chitosano come dimostrato dai precedenti test di Bradford.

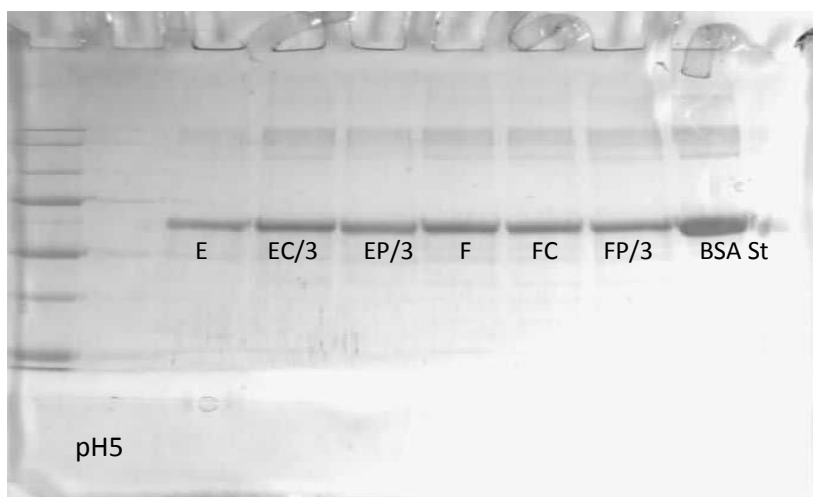


Figura 9: SDS-Page dopo adsorbimento in Tampone acetato pH5

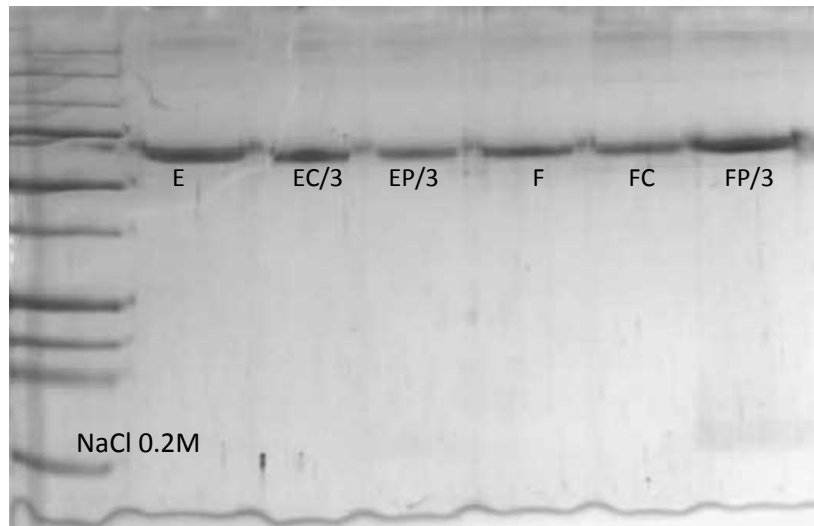


Figura 10: SDS-Page dopo adsorbimento in NaCl 0.2M

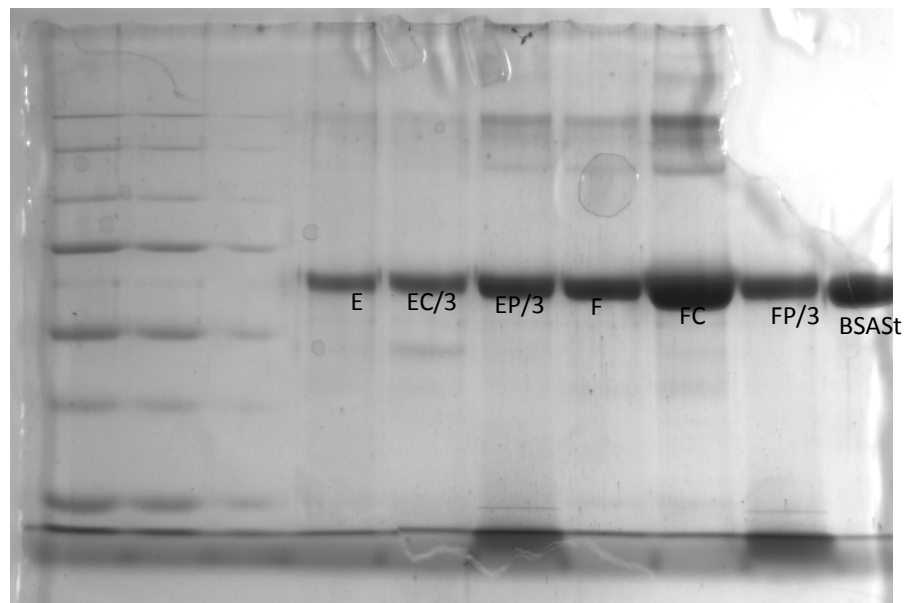


Figura 11: SDS-Page dopo adsorbimento in Acqua

La Figura 8 fa riferimento all'analisi della proteina fatta in seguito al test di rilascio in vitro. La proteina analizzata è quella ritrovata in soluzione dopo quattro giorni di incubazione, come si osserva dalle bande essa non è stata degradata dal processo condotto a 37°C e . Anche in questo gel è possibile notare come le bande riferite a FC ed EC/3 risultano più marcate rispetto alle bande corrispondenti alla proteina rilasciata dalle altre formulazioni.

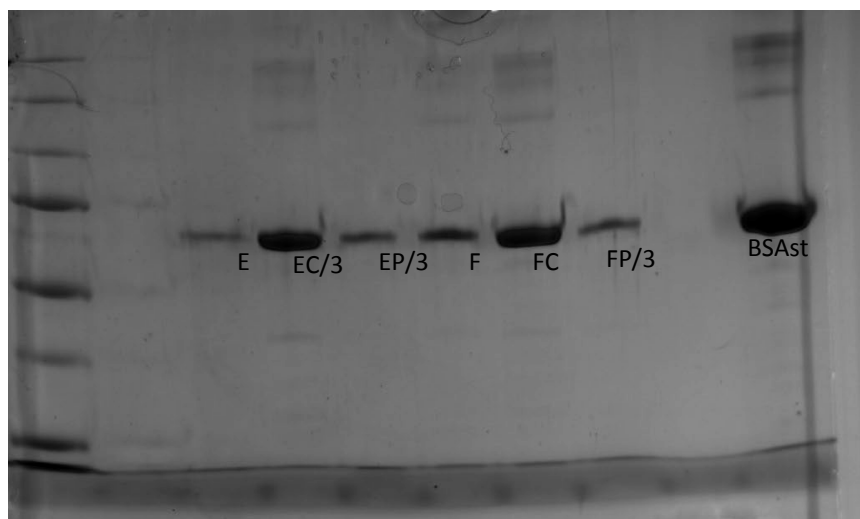


Figura 12: SDS-Page dopo test di rilascio in tampone fosfato a pH7.

### 7.8 Assorbimento di frammenti proteici capsidici di *Blue Tongue Virus*

In seguito ai dati ottenuti con la BSA sono stati fatti dei test per valutare la capacità di adsorbimento di frammenti capsidici derivanti dal BTV come si può osservare dal test di Bradford effettuato sul surnatante e sulle nanoparticelle sottoposte a digestione si osserva che la formulazione FC adsorbe sulla sua superficie circa il 50% di frammenti di tipo F2, mentre non è in grado di adsorbire più del 20% di frammenti di tipo F3. Ciò è probabilmente dovuto al fatto che i frammenti ottenuti non sono puri e non è stato possibile verificare un esatto valore di potenziale Z (Figura 7a-b).

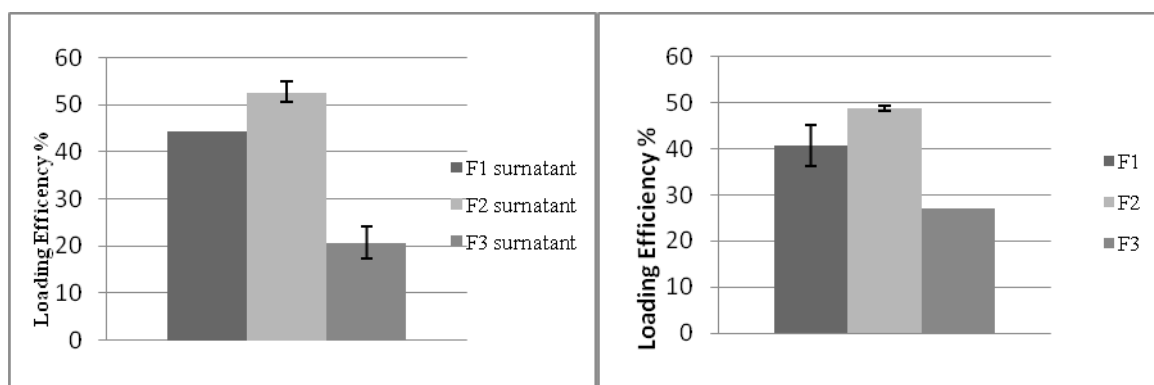


Figura 8 a-b: Valutazione della quantità di frammenti proteici derivanti dal capsido del BTV adsorbiti sulla formulazione FC



La purezza dei frammenti è stata osservata tramite SDS-Page sia prima che dopo il processo di adsorbimento. Dalle immagini ottenute si osserva che il frammento Fr1 è sostanzialmente puro ma di dimensioni molto piccole, il frammento Fr2 è caratterizzato dalla presenza di due bande aventi pesi molecolari molto simili. Le bande facenti riferimento al frammento Fr3 presentano diverse linee indice di notevole impurezza e conseguente causa di basso adsorbimento (Figura 13)

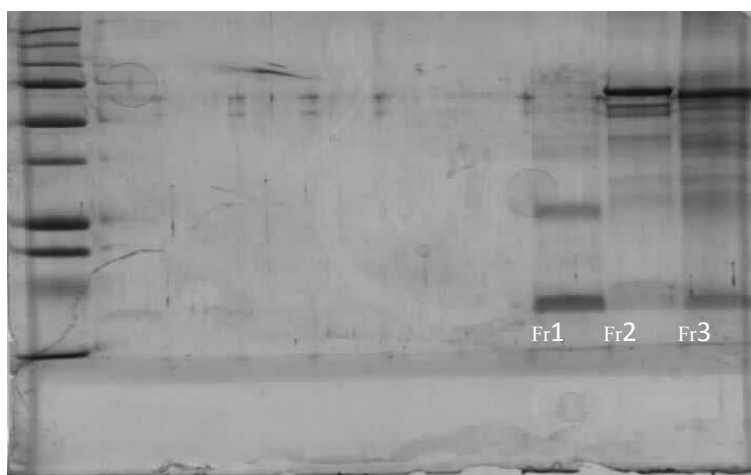


Figura 13: SDS-Page dei frammenti capsidici del BTV

### **Discussione**

Il processo di adsorbimento appare come un nuovo e sicuro metodo per la veicolazione di proteine o farmaci all'interno di sistemi nanoparticellari. Questo metodo infatti evita il contatto diretto della proteina con agenti o processi che possono risultare dannosi. La carica superficiale sia della proteina che delle nanoparticelle, il mezzo di dispersione e il rapporto proteina/nanoparticella sono i fattori fondamentali che garantiscono la massima efficacia di adsorbimento. Tuttavia, a seguito dei risultati ottenuti con i frammenti capsidici di BTV, è necessario osservare che non solo i fattori precedentemente citati ma anche la purezza delle proteine che si vogliono adsorbire è un fattore determinante nella buona riuscita del processo.

## 8 CONCLUSIONI

I dati raccolti durante lo sviluppo della prima parte della tesi hanno dimostrato che è possibile preparare delle nanoparticelle polimeriche contenenti HP mediante la tecnica dell'emulsione sia A/O che O/A. Tuttavia sono indispensabili specifici parametri formulativi e tecnologici per ottenere dispersioni con particelle nanodimensionate e dimensionalmente omogenee. In particolare sembra che il Panda sia più efficiente nella preparazione di formulazioni più complesse e meno stabili quali quelle A/O da cui sono derivate le formulazioni HPDs e HPDEs rispetto al Silverson; ciò è dovuto al fatto che in quest'apparecchio è possibile impostare parametri pressori più elevati e definire in maniera più accurata i parametri di lavoro.

Tuttavia la preparazione di emulsioni più semplici O/A può essere effettuata anche con le altre apparecchiature descritte ottenendo ottimi risultati.

L'HP presenta una certa attività gastro-resistente poiché la formulazione HPDs è risultata in grado di trattenere parzialmente il farmaco a pH acido. Tuttavia la combinazione dell'HP con l'L100 dà origine alla formulazione di origine polimerica denominata HPDEs in cui è presente sia l'attività gastroprotettiva del L100 sia le molteplici funzioni della HP. Tale formulazione non è esclusivamente gastro-resistente, grazie alla presenza del'L100, ma è anche in grado di controllare la velocità di rilascio e permeazione di un farmaco idrofilo attraverso la mucosa intestinale esclusivamente grazie alla presenza dell'HP. L'attività fondamentale di penetration enhancer dimostrata dall' HP è confermata dai risultati ottenuti in seguito all'analisi della formulazione priva di ciclodestrina denominata DEs; tale formulazione, infatti, non è in grado di ottenere un profilo di permeazione simile alla formulazione HPDEs ma anzi il passaggio del farmaco attraverso la mucosa risulta fortemente inibito.

Nel secondo capitolo della tesi è stato verificato che la combinazione dell'HP con eccipienti di origine lipidica può dare origine a formulazioni nano particellari gastro-resistenti. Tuttavia le formulazioni prese in considerazione mostrano come la permeazione del farmaco sia influenzata da diversi fattori:

- La presenza o meno dell'HP: nelle formulazioni prive di HP si osserva il passaggio di D attraverso la matrice lipidica solo se questo è presente in elevate concentrazioni (DLL1 e DLP1). Al contrario le formulazioni DLL2 e DLP2, contenenti quantità inferiori di farmaco rispetto alle precedenti, non ne permettono la diffusione e il passaggio attraverso la matrice.

- La formazione del complesso D:HP: Il complesso farmaco:polimero di tipo 1:1 presente nella formulazione HPDL1 appare essere in grado di influire negativamente sulla liberazione del farmaco dalla formulazione; le formulazioni in cui il complesso farmaco:polimero è di tipo 1:2 (HPDLL2 e HPDLP2) garantiscono una maggiore capacità di permeazione del farmaco attraverso le membrane.
- La presenza di crioprotettori sulla superficie nanoparticellare può influenzare la velocità di rilascio e permeazione del farmaco. Tale fenomeno è osservabile in maniera rilevante nelle formulazioni lipidiche DLL1 e DLP1 e in maniera meno significativa sulle formulazioni contenenti HP( HPDLL2 e HPDLP2).

Nel terzo capitolo della tesi è stato dimostrato che la possibilità di adsorbire proteine o peptidi è strettamente dipendente da alcuni fattori procedurali. I dati ottenuti hanno dimostrato che il valore di carica superficiale sia nanoparticellare che proteica sono fondamentali per l'adesione delle proteine.

Il mezzo, la temperatura e il tempo di reazione sono ugualmente fattori discriminanti l'adsorbimento, infatti la presenza di sali (tampone acetato pH 5 e NaCl 0.2M) nel mezzo di reazione influenza negativamente il processo. Il tempo di reazione deve essere ridotto all'arco di alcuni minuti al fine di evitare il desorbimento della proteina dalla superficie polimerica. La temperatura non risulta essere un fattore influenzante la reazione poiché a 4°C, 20°C, 37°C non si osservano variazioni di rilievo nella quantità di proteina adsorbita. Importanza fondamentale nella riuscita del processo è data anche dalla purezza della proteina che si vuole adsorbire, infatti eventuali impurezze limitano la percentuale di proteina legata alla superficie particellare; tale fenomeno può essere dovuto ad una diretta concorrenza fra le sostanze presenti all'interno del mezzo di reazione.

## 9 BIBLIOGRAFIA

Ali Asghar LF and Chandran S. Multiparticulate Formulation Approach to Colon Specific Drug Delivery: Current Perspectives; J Pharm Pharmaceut Sci (2006) 9 (3): 327-338.

Anderson TG, Tan A, Ganz P, Seelig J. Calorimetric Measurement of Phospholipid Interaction with Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin. Biochemistry. (2004) 43, 2251-2261.

Ashford M, Fell JT.. Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration. J Drug Targ. (1994) 2, 241-258

Aston R, Saffie-Siebert R, Canhan L, Ogden J. Nanotechnology Applications for Drug Delivery. Pharmaceutical Technology Europe. (2005) 17(4), 21–28

Basit AW. [Advances in colonic drug delivery. Review.](#) Drugs. (2005) 65(14):1991-2007.

Benichou et al

[Benoit MA](#), [Baras B](#), [Gillard J](#). Preparation and characterization of protein-loaded poly(epsilon-caprolactone) microparticles for oral vaccine delivery. [Int J Pharm.](#) (1999) 184(1),73-84.

Bibby DC, Davies NM, Tucker IG. Mechanisms by which cyclodextrins modify drug release from polymeric drug delivery systems. Int J Pharm (2000) 197 1–11.

Blanco MD, Alonso MJ. Development and characterization of protein loaded poly(lactide-co-glycolide) nanospheres. Eur J Pharm Biopharm (1997) 43; 287-294

Brunton LL, Lazo JS, Parker KL..Goodman & Gilman, Le basi farmacologiche della terapia. (2007). cap27 p 675.

Bummer PM. Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery-solid lipid nanoparticles.

Cai C, Bakowsky U, Rytting E, Schaper AK, Kissel T, Charged nanoparticles as protein delivery systems: A feasibility study using lysozyme as model protein. *Eur J Pharm Biopharm* (2008) 69; 31-42.

Cattaneo L.: *Compendio di anatomia umana*; Monduzzi editore 1988

Cavalli R, Caputo O, Carlotti ME, Trotta M, Scarnecchia C, Gasco MR. Sterilization and Freeze-Drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* (1997) 148, 47-54.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK.. Cyclodextrins in drug delivery: An Updated review. *AAPS PharmSciTech*, (2005); 6(2),43, 329-357.

Charcosset C, El-Harati A, Fessi H. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor *J. Control. Release* (2005) 108, 112–120.

Cheng G, An F, Zou MJ, Sun J, Hao HY, He YX. Time- and pH-dependent colon-specific drug delivery for orally administered diclofenac sodium. *World J Gastroenterol* (2004) 10(12)1769-1774.

Chesko J, Kazzaz J, Ugozzoli M, O'Hagan D, Singh M, An investigation of the factors controlling the adsorption of protein antigens to anionic PLG microparticles. *J Pharm Sci* (2005) 94,11; 2510-2519.

Chourasia MK, Jain SK. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems; *J Pharm Pharm Sci.* (2003). 6 (1) 33-66.

Cleland JL. Development of stable formulations for PLGA/PLA microsphere vaccines. *Res.Immunol.* (1998) 149 45-47.

Couvreur P, Vauthier C. Nanotechnology: Intelligent Design to Treat Complex Disease, *Pharmaceutical Research*, (2006) 23 (7) 1417-1450.

*Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* (2004) 21 (1) 1-19.

Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nature nanotechnology* (2007) 2, 469-478.

Dûchene D, Ponchel G, Wouessidjewe D. Cyclodextrins in targeting. Application to nanoparticles. *Adv Drug Del Rev.* (1999). 36, 29-40.

El-Harati AA, Charcosset C, Fessi H. Influence of the formulation for solid lipid nanoparticles prepared with a membrane contactor. *Pharm.Dev. Technol.* (2006) 11, 153–157.

El-Sayed YM, Abdel-Hameed ME, Suleiman MS, Najib NM. A rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac sodium in serum and its use in pharmacokinetic studies. *J Pharm Pharmacol.* (1988) 40, 727-729.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.* (1989) 55 R1–R4..

Fetzner A, Bohm S, Schreder S, Schubert R. Degradation of raw or film-incorporated  $\alpha$ -cyclodextrin by enzymes and colonic bacteria. *Eur J Pharm Biopharm* (2004) 58, 91–97.

Florence AT, Hillery AM, Hussain N, Jani PU. Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption: studies on particle uptake and fate. *J Control Release.* (1995) 36, 39-46.

Francis MF, Cristea M, Winnik FM. Polymeric micelles for oral drug delivery: Why and how. *Pure Appl Chem.* (2004) 76 (7–8) 1321–1335.

Freire C, Podczek F, Veiga F, Sousa J. Starch-based coatings for colon-specific delivery. Part II: Physico-chemical properties and in vitro drug release from high amylose maize starch films. *Eur J Pharm Biopharm* (2009) 72(3), 587-94..

Garinot M, Fiévez V, Pourcelle V, Stoffelbach F, des Rieux A, Plapied A, Theate I, Freichels H, Jérôme C, Marchand-Brynaert J, Schneider Y, Préat V. PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination. *J Control Release* (2007), [120,3](#), 195-204.

Gong P, Szleifer I, Competitive adsorption of model charged proteins: the effect of total charge and charge distribution *J Colloid Interface Sci* (2004), 278 81-90.

Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* (2003) 8,360.

Hedges AR. Industrial Applications of Cyclodextrins. *Chem Rev.* (1998) 98, 2035-2044.

Hovgaard L, Bronsted H.. Drug delivery studies in Caco2 monolayers. IV Absorption enhancer effect of cyclodextrins. Pharm Res. (1995) 12 (9) 1328-1332.

[http:// www.gattefossecanada.ca](http://www.gattefossecanada.ca)

[http:// www.gattefosseitalia.it](http://www.gattefosseitalia.it)

<Http://www.beckmancoulter.com>.

<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/CDER/ucm128219.htm>

Hu FQ, Yuan H, Zhang HH, Fang M. Preparation of solid lipid nanoparticles with Clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. Int J Pharm. (2002) 239, 121-128.

Iwata M, McGinity JW, Preparation of multi-phase microspheres of poly(D,L-Lactic acid) and poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) containing a W/O emulsion by a multiple emulsion solvent evaporation technique, J. Microencapsul. 9 (1992) 201-214.

Legrand P., Lesieur S., Bochot A., Gref R., Raatjes W., Barratt G., Vauthier C., Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation, Int. J. Pharm. (2007) 344 33-43.

Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. Int J Pharm. (2001) 225 15–30.

Loftsson T, Olsson JH. Cyclodextrins: new drug delivery systems. Int J Dermatol. (1998) 37, 241-246.

Lombardi Borgia S, Regehy M, Sivaramakrishnan R, Mehnert W., Korting HC, Danker K, Röder B, Kramer KD, Schäfer-Korting M, Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement—correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and parrlectric spectroscopy. J. Control. Release, (2005) 110, 151–163.

Lynch I, Dawson KA. Protein-nanoparticle interaction Nanotoday 3, 1-2(2008) 40-47.

Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY. Overview of gut immunology. Adv Exp Med Biol. (2008) 635:1-14

McI Mowat A. Dendritic cells and immune responses to orally administered antigens. *Vaccine* (2005) 23, 1797–1799 .

Menhert W, Mader K. Solid Lipid Nanoparticles production, characterization and application. *Adv Drug Deliv Rev* (2001) 47, 165-196.

Muller RH, Mader K, Gohla S. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm*, (2000) 50, 161-177.

Muller RH, Olbrich C, Solid Lipid Nanoparticles: Phagocytic uptake, in vitro cytotoxicity and in vitro biodegradation. *Drugs made in Germany* (1999) 42, 49-53.

Muller RH, Runge S, Ravelli V, Mehnert W, Thunemann AF, Souto EB. Oral bioavailability of cyclosporine: Solid lipid nanoparticles(SLN®) versus drug nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics* (2006) 317, 82–89.

Mundargi RC, Babu VR., Rangaswamy V., Patel P., Aminabhavi TM., Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release* 125(2008) 193-209.

O'Hagan DT, Singh M, Gupta RK, Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* (1998) 32 225-246.

[Orive G, Hernández RM, Rodríguez Gascón A, Domínguez-Gil A, Pedraz JL](#) Drug delivery in biotechnology: present and future. *Curr Opin Biotechnol.* (2003) 14(6):659-64.

Pinto-Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine.* (2006). 2 53– 65.

Prego C Garcia M, Torres D, Alonso MJ. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Contr Rel.* (2005) 101, 151-162.



Puglia C, Blasi P, Rizza L, Schoubben A, Bonina F, Rossi C, Ricci M., Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An *in vitro* and *in vivo* investigation. *Int. J. Pharm.* (2008) 357, 295–304

Ravi V, Siddaramaiah TM, Kumar P. Influence of natural polymer coating on novel colon targeting drug delivery system. *J Mater Sci: Mater Med.* (2008) 19 2131–2136.

Sakuma S, Hayashi M, Akashi M. Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery. *Adv Drug Del Rev.* (2001) 47 21-37.

Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Gibin S, Zambito Y, Di Colo G, Caramella C.. Nanoparticles based on N-Trimethylchitosan: Evaluation of absorption properties using *in vitro* (Caco2 cells) and *ex vivo* (excised rat jejunum) models. *Eur J Pharm Biopharm.* (2007) 65, 68-77.

[Saraf S](#), [Mishra D](#), [Asthana A](#), [Jain R](#), [Singh S](#), [Jain NK](#). Lipid microparticles for mucosal immunization against hepatitis B. [Vaccine](#). (2006) 24(1):45-56.

Schwarz C, Mehnert W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm* (1997) 157, 171–179

Shakweh M, Besnard M, Nicolas V, Fattal E, Poly(lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by Peyer's patches in mice. *Eur J Pharm Biopharm.* (2005) 61 1-13.

Shivakumar HN, Desai BG, Deshmukh G. Design and optimization of diclofenac sodium controlled release solid dispersions by response surface methodology. *Indian J Pharm Sci.* (2008) 70(1) 22-30.

Singh M, Sharma R, Banerjee UC.. Biotechnological applications of cyclodextrins.2002. *Biotechnol Adv.*[\(2002\) 20, 5-6](#),341-359.

Trotta M, Debernardi F, Caputo O. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solventemulsification–diffusion technique. *Int J Pharm* (2003) 257 153–160.

Tsamaloukas A, Szadkowska H, Slotte PJ, Heerklotz H. Interactions of Cholesterol with Lipid Membranes and Cyclodextrin Characterized by Calorimetry; *Biophys J.* (2005) 89, 1109–1119.

Tyrer PC, Foxwell AR, Kyd JM, Otczyk DC, Cripps AW.. Receptor mediated targeting of M-cells. *Vaccine.* (2007) 25, 3204–3209.

Uekama K, Hirayama F, Arima H. Recent Aspect of Cyclodextrin-Based Drug Delivery System. *Journal J Incl Phenom Macrocycl Chem.* (2006) 56, 3–8.

United states Pharmacopeia 2000 Edition 24 pag.1947.

Van de Kerkhof E, de Graaf I, Groothuis G. In vitro methods to study intestinal drug metabolism. (2007) pp. 30-66.CDM.

Wissing SA, Kayser O, Muller RH. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv Drug Del Rev.* (2004) 56, 1257–1272.

Zheng Y, Zuo Z, Chow AHL. Lack of effect of  $\beta$ -cyclodextrin and its water-soluble derivatives on in vitro drug transport across rat intestinal epithelium. *Int J Pharm.* (2006) 309, 123–128.

Zhu X, Sun J, Wu J. Study on the inclusion interactions of  $\beta$ -cyclodextrin and its derivative with dyes by spectrofluorimetry and its analytical application. *Talanta* (2007) 72, 237–242

Zimmerman E, Muller RH, Mader K. Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized SLN. *Int J Pharm.* (2000) 196, 211-213.

Zur Muhlen A, Schwrz C, Menhert W. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for controlled release and release mechanism. *Eur J Pharm Biophar*