



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Dipartimento di Chimica e Farmacia

Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie Chimiche

Indirizzo Scienze Farmaceutiche

XXVII ciclo

**Progettazione e Sviluppo di Sistemi di Veicolazione Non Invasivi per Neuro-
farmaci**

Tesi di dottorato di

Dott.ssa *Elena Soddu*

Direttore

Prof. Stefano Enzo

Supervisore

Prof.ssa Elisabetta Gavini

Anno Accademico 2013-2014

Καθε εμποδιο στο καλο

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Ringraziamenti

Desidero ringraziare tutte le persone che hanno contribuito direttamente alla realizzazione di questo lavoro tramite suggerimenti, critiche ed osservazioni. La Prof.ssa Elisabetta Gavini, relatrice e guida nella progettazione e sviluppo di tutto il lavoro; la Dott.ssa Giovanna Rassa, fonte di consigli ed aiuti; il Sig. Massimo Cossu per il suo preziosissimo aiuto nella pratica di laboratorio; i colleghi di dottorato, per i suggerimenti e la compagnia, con un particolare ringraziamento ad Andrea per l'aiuto, i consigli, le risate ed il supporto morale e psichico. Grazie a tutto il gruppo di ricerca tecnologico-farmaceutico coordinato dal Prof. Giunchedi e dalla Prof.ssa Gavini.

Un grazie doveroso e di cuore a tutta la mia famiglia e soprattutto ai miei genitori Pina e Giovanni, che hanno contribuito indirettamente alla realizzazione di questo lavoro.

Niki, ma maman Belge et Grecque, merci beaucoup! Merci pour tous ces jours où tu as été à mes côtés, merci de ta compréhension et de tout ce que tu as fait pour moi! Merci Léopold!

Stefano, grazie!!! Grazie per la tua costante presenza, la pazienza e l'affetto. Non posso che dedicare questo lavoro a te ed a tutta la mia famiglia.

“La gratitudine, è il paradiso di per se stessa.”

Rumi

Indice

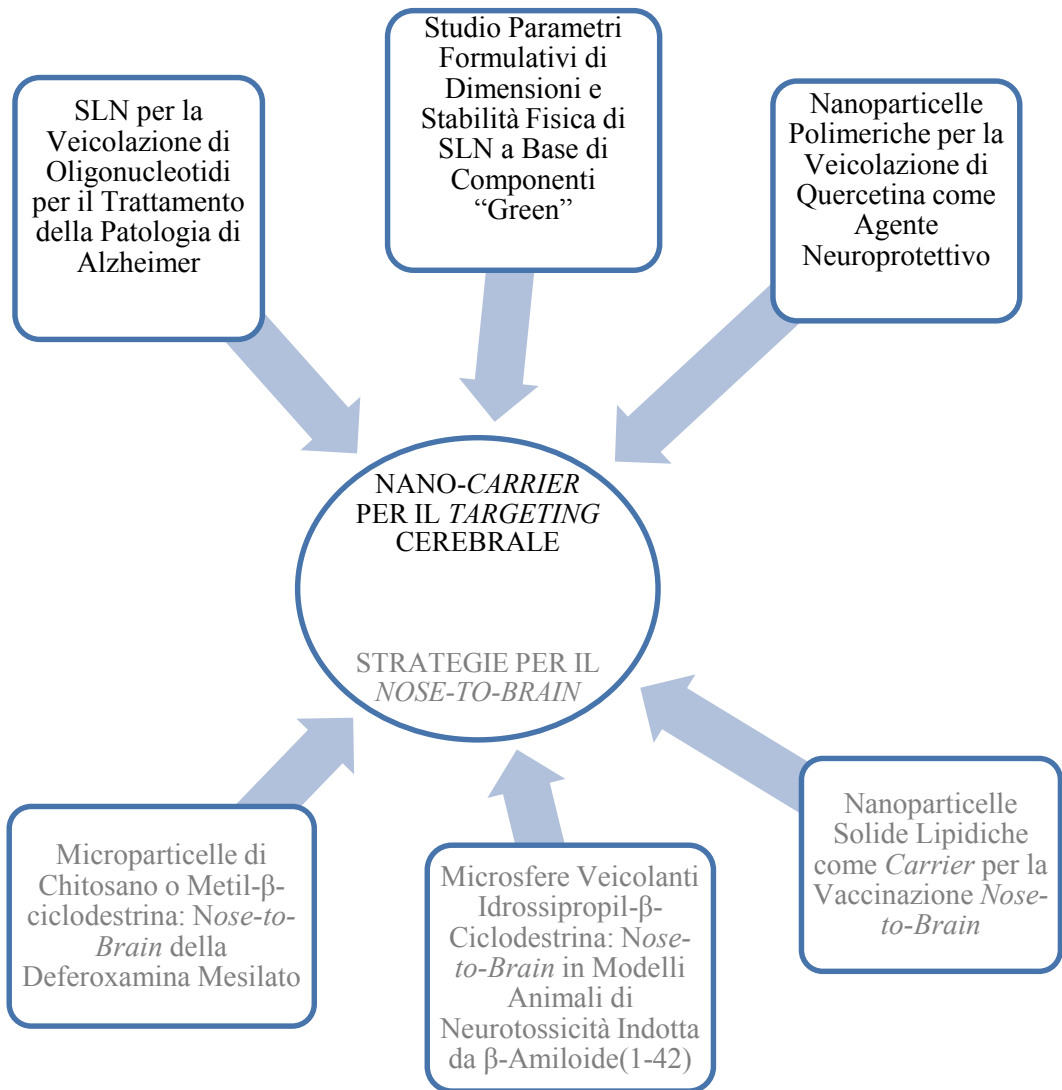
<u>Introduzione</u>	1
<u>Il SNC: barriere</u>	2
<u>La BEE: anatomia</u>	2
<u>La BEE: funzione</u>	5
<u>Il trasporto dei farmaci al SNC: problematiche</u>	6
<u>Il trasporto dei farmaci al SNC: strategie</u>	7
<u>Elenco delle abbreviazioni</u>	15
<u>Bibliografia</u>	16
<u>PARTE I: TARGETING CEREBRALE MEDIATO DA VETTORI SITO-SPECIFICI E STRATEGIA NOSE-TO-BRAIN: RASSEGNE BIBLIOGRAFICHE</u>	21
<u>Capitolo I.</u> Da Agenti Neurotossici a <i>Shuttle</i> per il Trasporto di Farmaci al SNC	22
<u>Abstract</u>	23
<u>Introduzione</u>	24
<u>Shuttle virali</u>	26
<u>Shuttle batterici</u>	31
<u>Shuttle animali</u>	38
<u>Conclusioni e prospettive future</u>	42
<u>Bibliografia</u>	44
<u>Tabelle</u>	53
<u>Figure</u>	56
<u>Capitolo II.</u> Polveri Farmaceutiche a Base di Chitosano per la Veicolazione di Farmaci mediante Strategia <i>Nose-to-Brain</i>	57
<u>Abstract</u>	58
<u>Introduzione</u>	59
<u>Farmaci contenuti in formulazioni nasali impieganti chitosano</u>	61
<u>Chitosano</u>	66

	Indice
Chitosano non modificato	67
Sali del chitosano	70
Derivati del chitosano	71
Metodi di preparazione	72
Conclusioni e prospettive future	74
Bibliografia	76
Tabelle	84
Figure	86
PARTE II: PROGETTAZIONE E SVILUPPO PRELIMINARE DI NANO-CARRIER PER IL <i>TARGETING</i> CEREBRALE	87
Capitolo I. Influenza dei Parametri Formulativi sulle Dimensioni e sulla Stabilità Fisica di SLN a Base di Componenti “Green”	88
Abstract	89
Introduzione	90
Metodi	94
Risultati	97
Discussione	103
Conclusioni	105
Ringraziamenti	106
Bibliografia	107
Tabelle	112
Figure	114
Capitolo II. Nanoparticelle Polimeriche per la Veicolazione di Quercetina come Agente Neuroprotettivo	120
Abstract	121
Introduzione	122
Metodi	124
Risultati	128

Discussione	132
Conclusioni	133
Bibliografia	134
Tabelle	137
Figure	140
Capitolo III SLN come <i>carrier</i> per la Veicolazione di Materiale Oligonucleotidico come Agente nel Trattamento della Patologia di Alzheimer	145
Abstract	146
Introduzione	147
Metodi	150
Risultati	153
Discussione	156
Conclusioni	157
Bibliografia	159
Tabelle	162
Figure	163
Parte III : PROGETTAZIONE E SVILUPPO DI STRATEGIE PER IL <i>NOSE-TO-BRAIN</i>	166
Capitolo I Progettazione e Sviluppo di Nanoparticelle Solide Lipidiche come <i>Carrier</i> per la Vaccinazione <i>Nose-to-Brain</i>	167
Abstract	168
Introduzione	169
Metodi	171
Risultati	177
Discussione	180
Conclusioni	181
Bibliografia	182
Tabelle	185

Figure	187
Capitolo II Somministrazione Nasale di Microsfere Veicolanti Idrossipropil- β -Ciclodestrina in Modelli Animali di Neurotossicit� Indotta da β -Amiloide (1-42): Effetto Neuro-Protettivo	191
Abstract	192
Introduzione	193
Metodi	196
Risultati	200
Discussione	202
Conclusioni	204
Ringraziamenti	204
Bibliografia	205
Figure	210
Capitolo III Microparticelle Solide di Chitosano o Metil- β -ciclodestrina per il Trasporto <i>Nose-to-Brain</i> della Deferoxamina Mesilato: il Primo Approccio Formulativo	214
Abstract	215
Introduzione	216
Metodi	220
Risultati	228
Discussione	233
Conclusioni	236
Bibliografia	238
Tabelle	244
Figure	245

Schema delle principali fasi del lavoro “Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”



Introduzione

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Il SNC: barriere

Il sistema nervoso centrale (SNC) è un delicato distretto dell'organismo nel quale vengono dirette molteplici funzioni vitali. Affinché esso possa funzionare correttamente, è necessario che l'ambiente circostante venga finemente controllato. Il SNC si trova così protetto da tre barriere di cui due barriere epiteliali: la barriera emato-liquorale (BEL) e la barriera aracnoidea ed una barriera endoteliale: la barriera emato-encefalica (BEE). La BEL è composta dalle cellule epiteliali del plesso corioideo a diretto contatto con il liquido cerebrospinale (LCS), o liquor, prodotto nei ventricoli cerebrali. L'aracnoide, invece, è una delle tre meningi insieme alla dura madre ed alla pia madre a circondare completamente il SNC. Questa è interposta tra le altre due meningi, ed è nel suo strato esterno localizzato in prossimità della dura madre, in cui viene esercitata la funzione di barriera [Abbott 2010; Nieuwenhuys *et al.*, 2010].

La BEE: anatomia

Il termine *Blut-Hirn-Schranke* indicante la barriera emato-encefalica (BEE) fu coniato da Lewandowsky nel 1900 [Lewandowsky, 1900], e l'esistenza della BEE fu ufficialmente riconosciuta solo negli anni '60 benché Edwin Goldmann ne ipotizzò la presenza già nel 1913 [Goldmann, 1913; Ribatti *et al.*, 2006].

A Broman (1941) e Frieman (1942) spetta il merito di aver riconosciuto che la sede anatomica della BEE fosse localizzata nella parete dei capillari cerebrali. Essa è infatti composta dalle cellule endoteliali formanti la vasta rete di capillari che irrorano il cervello ed ha un'area superficiale di 180 cm² per grammo di cervello [Pardridge, 2001]. La sua localizzazione è compresa tra la membrana luminale ed abluminale delle cellule endoteliali, separate dal citoplasma endoteliale per una distanza di 200 nm [Brightman and Reese, 1969]. A differenza della maggior parte dei capillari sanguigni dell'organismo, le cellule endoteliali che formano la parete dei capillari cerebrali sono fortemente unite da giunzioni serrate e da giunzioni aderenti, meglio conosciute rispettivamente come *tight junctions* (TJ) ed *adherens junctions* (AJ). Il complesso giunzionale delle AJ è collocato sul lato basolaterale ed è composto per lo più dalle proteine caderine e catenine. Le caderine ne sono i costituenti transmembrana principali ed il loro dominio citoplasmatico è messo in comunicazione con l'actina del citoscheletro per via del legame con le catenine. Le AJ hanno il compito di assicurare l'adesione tra le cellule endoteliali dei capillari cerebrali, di garantire un supporto cellulare e di avere un ruolo essenziale per il mantenimento delle TJ, in quanto una loro rottura porta alla rottura della barriera stessa [Wolburg and Lippoldt, 2002]. Sono coinvolte anche in funzioni differenti quali l'inibizione da contatto durante la crescita ed il

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

rimodellamento vascolare, l'avvio della polarità cellulare e la regolazione della permeabilità paracellulare [Cardoso *et al.*, 2010]. Le TJ si trovano invece sul versante apicale e consistono di un complesso di proteine transmembrana (occludine, claudine, molecole di adesione cellulare (JAM)) e di proteine citoplasmatiche (zonula occludens [ZO] e cinguline), queste ultime creano l'ancoraggio con il citoscheletro. Le claudine sono fondamentali per la funzione di barriera, ed i loro livelli di espressione ne determinano l'integrità. Le claudine e le occludine sono collegate tra loro attraverso le [ZO] le quali, in seguito al legame con la cingulina, interagiscono con l'actina e la miosina del citoscheletro [Alyautdin *et al.*, 2014]. Sono principalmente le TJ a limitare il movimento di ioni attraverso la BEE e quindi a determinare l'elevato valore di resistenza elettrica ($\sim 1800 \Omega \text{ cm}^2$) dell'endotelio cerebrale [Butt *et al.*, 1990]. In realtà, le TJ sono delle complesse strutture delle quali fanno parte più di 40 proteine, includendo in queste quelle transmembrana, di supporto e di segnale [González-Mariscal *et al.*, 2003]. Oltre alla funzione essenziale di barriera paracellulare, si ritiene che le TJ siano implicate in differenti compiti quali controllo dell'espressione genica, della proliferazione e della differenziazione cellulare [González-Mariscal *et al.*, 2008].

Tra le cellule endoteliali microvascolari cerebrali (BMVEC: *brain microvascular endothelial cells*) che costituiscono la BEE (unità vascolare) ed il tessuto nervoso (unità nervosa) si creano delle interazioni che nell'insieme formano l'unità neuro-vascolare (NVU) [Hawkins and Davis, 2005]. Queste interazioni partecipano alla regolazione delle funzioni del SNC [Abbott, 2006] nonché della barriera. I compiti principali della NVU sono quelli di limitare l'accesso degli xenobiotici, tra cui i farmaci, nel SNC ed esercitare un controllo sul flusso sanguigno cerebrale [Neuwelt *et al.*, 2011] dimostrando come, attraverso la NVU, il cervello sia in grado di regolare il suo flusso sanguigno, il metabolismo e l'ambiente elettrofisiologico [Neuwelt *et al.*, 2011]. La NVU è formata dalle BMVEC, dalla matrice extracellulare e dalle circostanti cellule della glia (periciti e microglia), dai peduncoli astrocitari e da neuroni [Abbott, 2006].

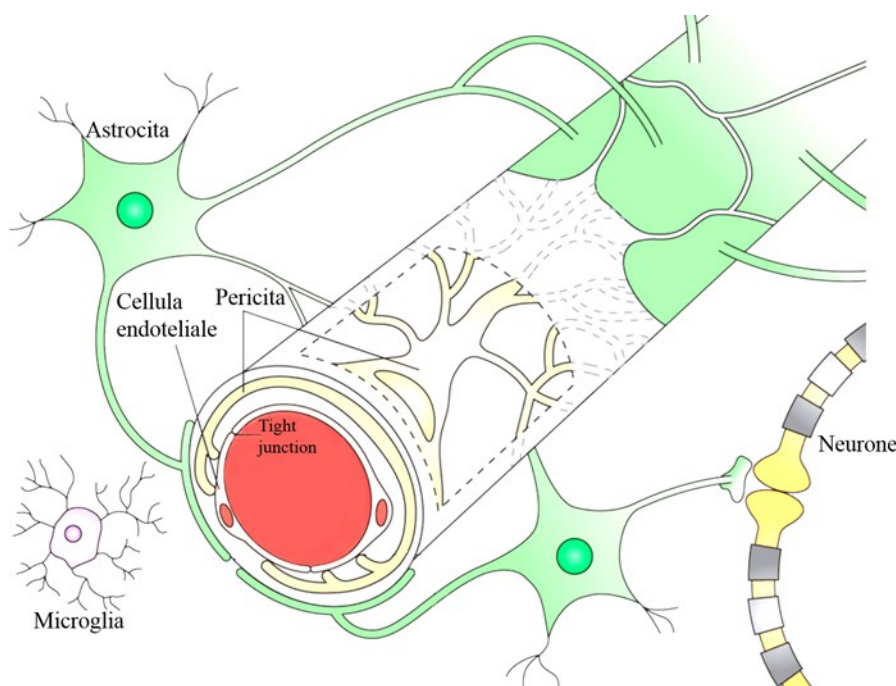


Figura 1. Unità neurovascolare. Relazione tra la componente neuronale (astrociti, periciti, microglia e neuroni) e quella vascolare (*tight junction* delle cellule endoteliali). Immagine adattata (Obermeier B *et al.*, *Nature Medicine*. 2013;19, 1584-96).

I periciti si distribuiscono in modo discontinuo lungo i capillari cerebrali, circondando parzialmente l'endotelio cerebrale. I periciti e le BMVEC cooperano per controllare meccanismi di sviluppo, stabilità, rimodellamento e maturazione vascolare [Choi and Kim, 2008]. Gli astrociti, con i loro peduncoli, ricoprono circa il 98% della parete vascolare [Neuwelt *et al.*, 2011], formando una rete complessa attorno ai capillari, importante nell'indurre ed aumentare la funzione di barriera fisica (formazione di TJ più serrate), di trasporto (espressione di specifici trasportatori, tra cui la glicoproteina-P di efflusso_P-gp) e metabolica (presenza di un numeroso sistema enzimatico) [Abbott, 2006]. Le proiezioni assonali dei neuroni che vanno sulla muscolatura liscia arteriolare, per mezzo del rilascio di neurotrasmettitori e peptidi, regolano il flusso sanguigno cerebrale e la permeabilità della BEE [Hawkins and Davis, 2005]. Le cellule della microglia sono le cellule immunocompetenti del SNC [Kreutzberg, 1996]. La matrice extracellulare, prodotta dalle cellule della membrana basale, è un sito di ancoraggio e regolazione del segnale tra le cellule [Abbott, 2006]. Neuwelt *et al.* (2011) include nella NVU anche cellule ematiche circolanti quali cellule polimorfonucleate, linfociti e monociti che svolgono un controllo del segnale neuronale e dell'attività cellulare.

Nell'insieme le cellule della NVU partecipano nel regolare finemente l'influsso dei nutrienti e l'efflusso di sostanze di scarto, tossine e farmaci in modo da assicurare l'omeostasi del SNC.

La BEE: funzione

Le complesse caratteristiche anatomo-fisiologiche possedute dalla BEE e dalla NVU, portano a molteplici e differenti funzioni di barriera schematicamente raggruppate in: barriera fisica, metabolica, immunologica e di trasporto [Alyautdin *et al.*, 2014].

Il compito di barriera fisica è riconducibile alla presenza delle TJ e delle AJ le quali prevengono il trasporto paracellulare di macromolecole e composti polari idrofili; si comportano, così, da filtro altamente selettivo impedendo un libero scambio tra soluti presenti nel sangue ed il fluido cerebrospinale. Solo piccole molecole lipofile (peso molecolare (PM) inferiore a 400 Da) come O₂ e CO₂ diffondono liberamente attraverso la membrana plasmatica seguendo il loro gradiente di concentrazione [Grieb *et al.*, 1985; Pardridge, 2001]. Il trasporto transcellulare viene limitato dalle cellule perivascolari presenti attorno ai capillari della barriera, quali astrociti, microglia, periciti, che creano un ulteriore strato lipidico cellulare ed aumentano l'ingombro spaziale che una sostanza deve sormontare per passare attraverso la BEE [Bernacki *et al.*, 2008]. Inoltre, il passaggio transcellulare è sfavorito a causa dell'assenza di fenestrature [Fenstermacher *et al.*, 1988] e per la scarsità di canali transendoteliali e vescicole endocitotiche [Sedlakova *et al.*, 1999] nell'endotelio capillare.

La funzione di barriera metabolica è data dalla presenza di numerosi enzimi intra- (monoamminoossidasi, citocromo P450) ed extracellulari (nucleasi, peptidasi) [El-Bacha, 1999] e di un elevato numero di organelli mitocondriali [Oldendorf *et al.*, 1977], mentre cellule quali microglia, mastociti e macrofagi creano una barriera immunologica limitando il passaggio di linfociti ed altri componenti del sistema immunitario. Nella membrana dell'endotelio capillare e dei peduncoli astrocitari sono inoltre espressi elevati livelli di proteine di efflusso ABC (ATP-binding cassette) responsabili del riconoscimento e della successiva estrusione di vari substrati. Tra queste proteine di trasporto ATP-dipendenti vi è la glicoproteina P (P-gp), espressa soprattutto nella membrana apicale di numerose cellule epiteliali, tra cui quelle dell'endotelio capillare cerebrale. È responsabile dell'allontanamento di numerosi farmaci (ivermectina, ciclosporina A e loperamide), che una volta riconosciuti, vengono rimandati nel circolo ematico ed impedito il loro accesso al parenchima cerebrale [Schinkel *et al.*, 1994; Schinkel *et al.*, 1995; Schinkel and van Deemter, 1996], esercitando così la funzione di barriera di trasporto.

La BEE è una struttura dinamica [Carvey *et al.*, 2009] che funziona come un sistema di filtraggio neurovascolare con il compito fisiologico di garantire un ambiente omeostatico indispensabile per il corretto funzionamento del SNC, ostacolando l'ingresso di sostanze tossiche o agenti infettivi presenti nel sangue e permettendo il passaggio selettivo delle molecole essenziali. Il passaggio di queste ultime nel cervello è garantito dalla presenza di trasportatori selettivi, quali trasportatori degli amminoacidi [Hawkins, *et al.*, 2006], di acidi organici, di cationi, di nucleosidi, del glucosio e degli esosi ed ormoni [Pardridge, 1981;1991].

Alcune sedi del SNC sono tuttavia prive della BEE che si interrompe a livello di particolari strutture chiamate organi circumventricolari (CVO), collocati nelle regioni ventricolari paramediane. Fanno parte dei CVO l'area postrema, l'eminenza mediana, la neuroipofisi, la ghiandola pineale, l'organo subfornicale e la lamina terminale. I vasi sanguigni dei CVO sono caratterizzati da un maggiore spazio perivascolare, dall'assenza di TJ tra le cellule endoteliali e dalla presenza di fenestrature. Per tali caratteristiche, molecole polari e con elevato PM, possono diffondere indisturbate dal sangue allo spazio perivascolare e perciò i CVO vengono spesso indicati come “finestre del cervello” [Johnson and Gross, 1993;Ballabh *et al.*, 2004]. Grazie alla loro collocazione e alle caratteristiche anatomiche, i CVO tengono sotto controllo i livelli degli ormoni circolanti e di altre sostanze trasportate dal sangue o dal LCS, fungendo quindi da organi chemosensitivi e neuroematici [Nieuwenhuys *et al.*, 2010]

Il trasporto dei farmaci al SNC: problematiche

Se, da un punto di vista fisiologico, il ruolo della BEE è di fondamentale importanza, questo diventa un impedimento dal punto di vista terapeutico e/o diagnostico in quanto limita il raggiungimento del SNC alla maggior parte dei farmaci. Circa il 98% di piccole molecole (PM>400 Da) farmacologicamente attive e la totalità di quelle con grosse dimensioni (PM>1 kDa) è incapace di attraversare la BEE [Pardridge, 2001].

Affinché un medicinale diretto al SNC (neuro-farmaco) possa avere una selettività ottimale, biodisponibilità e perciò attività, questo deve superare la BEE e pertanto sormontare la barriera fisica, metabolica, immunologica e di trasporto che vi viene esercitata [Alyautdin *et al.*, 2014]. Accade spesso, però, che molti dei neuro-farmaci sviluppati non possano essere impiegati poiché incapaci di attraversare la BEE, portando ad un'ingente perdita sia in termini di tempo (12-16 anni, tempo medio per lo sviluppo) che economica (0,8-1,7 miliardi di dollari USA) [Matschay *et al.*, 2008].

Nel 2013, il *Center for Drug Evaluation* della *Food and Drug Administration* (FDA) ha approvato 27 nuovi principi attivi di cui solo 11% neuro-farmaci (Tab. 1), in particolare 7% rientranti nell'area terapeutica neurologica e 4% in quella psichiatrica [Mullard, 2014]. Tali risultati indicano come la maggior parte della ricerca sia indirizzata verso lo sviluppo di altre categorie di farmaci, come quelle degli antitumorali e dei farmaci orfani, che rappresentano rispettivamente il 30% ed il 33% della lista delle molecole approvate.

Tabella 1. Elenco dei nuovi neuro-farmaci approvati dalla FDA nel 2013.

Farmaco	Principio attivo	Utilizzo
Dotarem	Gadoterato di meglumina	Risonanza magnetica del cervello (MRI), spina dorsale e tessuti associati in pazienti con età uguale o superiore ai due anni.
Tecfidera	Dimetilfumarato	Terapia forme recidive sclerosi multipla.
Brintellix	Vortioxetina	Terapia disturbi depressivi nell'adulto.
Aptiom	Eslicarbazepina acetato	Terapia aggiuntiva crisi convulsive epilessia.

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/developmentapprovalprocess/druginnovation/ucm381803.pdf>

A ciò va aggiunto che, attualmente, le patologie della sfera centrale che godono di un maggior trattamento terapeutico riguardano i disturbi dell'umore e del comportamento (depressione, schizofrenia, epilessia) in quanto prevedono l'utilizzo di principi attivi a basso PM, mentre la terapia di patologie neurodegenerative (Parkinson, Alzheimer, Huntington, sclerosi multipla) o di tumori a carico del SNC, è limitata dal fatto che le molecole, che hanno dimostrato un potenziale terapeutico, sono caratterizzate da elevati PM e spesso elevata idrofilia, fattori che ne complicano l'applicazione clinica [Pardridge, 2005].

Una maggiore comprensione dei meccanismi fisiologici, della funzione e dinamiche della BEE, della comunicazione intercellulare nella NVU, della biologia di trasporto, del neurosviluppo e dell'*imaging* strutturale potrebbero contribuire all'evoluzione delle strategie atte al trasporto di neuro-farmaci al cervello per garantirne una loro applicazione [Neuwelt *et al.*, 2012].

Il trasporto dei farmaci al SNC: strategie

Gli approcci esistenti per il trasporto dei farmaci al SNC derivano dalla conoscenza delle caratteristiche anatomiche e fisiologiche della BEE.

I sistemi attualmente utilizzabili per superare la BEE rientrano in due principali categorie: metodi invasivi e metodi non invasivi [Jones and Shusta, 2007; Lu *et al.*, 2014; Upadhyay, 2014], (Fig. 2).

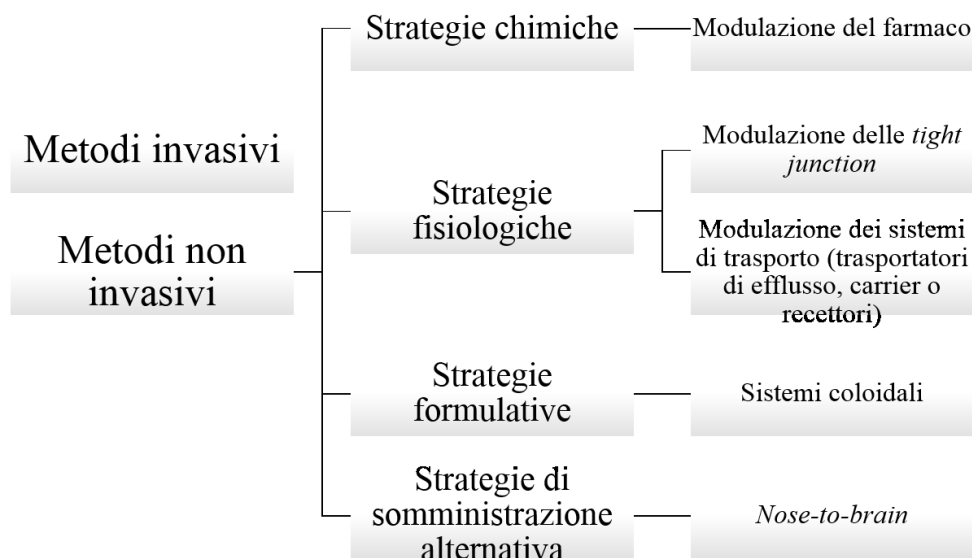


Figura 2. Rappresentazione schematica sui principali metodi di veicolazione di farmaci destinati al SNC.

Metodi invasivi

I metodi invasivi permettono un superamento meccanico della barriera, fisicamente sormontata mediante somministrazione diretta del farmaco nel SNC, ciò permette l'utilizzo di basse concentrazioni di principio attivo e la riduzione nella comparsa di eventuali effetti collaterali indesiderati dovuti ad un'azione periferica. Tuttavia, a causa della loro natura invasiva presentano numerosi svantaggi, quali: scarsa idoneità per patologie croniche richiedenti ripetute somministrazioni di farmaco; danneggiamento della BEE; alto rischio ed aumentata suscettibilità del SNC ad infiammazioni ed infezioni; intervento da parte di personale medico specializzato; elevati costi; uso di anestesia; ospedalizzazione e bassa *compliance* da parte dei pazienti.

L'infusione intracerebro-ventricolare, l'iniezione intracerebrale e l'utilizzo di impianti intracerebrali sono alcuni esempi di metodi invasivi per la somministrazione di farmaci al SNC. In tutti questi, però, si evidenzia un altro grosso svantaggio di tali strategie legato alla lenta diffusione del farmaco verso il sito di azione. La somministrazione locale del principio attivo prevede che questo migri nel parenchima cerebrale attraverso il LCS. Nonostante il

passaggio di un farmaco dal LCS al torrente circolatorio avvenga velocemente attraverso un moto di tipo convettivo, il passaggio dal LCS al tessuto cerebrale avviene per lenta diffusione: la diffusione di un farmaco dal LCS al tessuto cerebrale diminuisce con il quadrato della distanza [Pardridge, 2012]. Più esattamente, la concentrazione cerebrale di un farmaco di piccole dimensioni diminuisce in maniera logaritmica ogni mm di distanza percorso dalla superficie del LCS. Se una piccola molecola di principio attivo è liposolubile, questa subisce una diminuzione nella concentrazione cerebrale di circa dieci volte ogni 500 μm percorsi, mentre se il farmaco di piccole dimensioni è idrosolubile, la diminuzione nella concentrazione è di circa 10 volte ogni mm percorso. Di conseguenza, man mano che aumenta l'idrofilia o il peso molecolare di un farmaco diminuisce il suo coefficiente di diffusione [Pardridge, 2012]. Se da un lato per risolvere il problema diffusivo si potrebbe pensare di utilizzare elevati quantitativi di principio attivo tali da permettere che questo raggiunga sedi del cervello poste a differente distanza, dall'altro si favorirebbe l'insorgenza di tossicità acuta nel SNC.

Un altro metodo di somministrazione invasivo diretto, il *convection-enhanced diffusion*, è stato concepito con lo scopo di ovviare al problema della lenta diffusione del farmaco. I sistemi *reservoir*, contenenti un principio attivo e collegati con cateteri transcraniali furono inizialmente progettati ipotizzando che con questa strategia il farmaco potesse muoversi con un flusso in *bulk*. In realtà, anche con questo metodo il farmaco si sposta lentamente per diffusione [Pardridge, 2012].

Metodi non invasivi

Un farmaco che viene somministrato per via vascolare, ed in grado di passare la BEE, si distribuisce velocemente nell'intero cervello annullando così il fenomeno della lenta diffusione che si manifesta quando il passaggio avviene dal LCS piuttosto che dal sangue [Pardridge, 2012]. Grazie alla vasta area superficiale della barriera ed al fatto che la distanza massima tra una cellula cerebrale e l'endotelio della BEE è di circa 25 μm , il raggiungimento del target avviene tempestivamente [Abbott, 2010].

I metodi non invasivi sono molteplici e possono venire distinti in differenti categorie basate su strategie chimiche, fisiologiche, formulative (uso di sistemi colloidali) e su alternative vie di somministrazione (nasale).

Strategie chimiche

Agiscono sulla chimica del farmaco.

Modulazione del farmaco: lipidizzazione. In letteratura è una tecnica che viene talvolta indicata come un approccio del tipo farmacologico [Gabathuler, 2010] causando una certa ambiguità. Di fatto, si potrebbe intendere una modifica sulla farmacologia del principio attivo, mentre in realtà si agisce sulla chimica del farmaco, senza cambiarne l'azione terapeutica. Spesso, la strategia si basa sulla sintesi di profarmaci ottenuti dalla coniugazione del principio attivo con un vettore di natura lipidica (ad esempio esterificazione di gruppi –COOH, –OH e –SH). In seguito alla dissociazione *in vivo* del profarmaco, raggiunto il target d'azione, il farmaco rimane qui intrappolato grazie alla riconquistata idrofilia.

Il loro sviluppo deriva dal principio che una sostanza più lipofila ha maggiore possibilità di passare attraverso la BEE per trasporto transcellulare. Per una buona permeazione nel SNC i valori di log P richiesti dovrebbero essere compresi tra 1,5 e 2,5 [Lu *et al.*, 2014]. Soddisfare il solo requisito di liposolubilità non è tuttavia sufficiente poiché la BEE può essere attraversata solo da molecole che rispondano anche alle caratteristiche dimensionali (PM<400 Da). Infatti, la diffusione di un soluto in un lipide è in dipendenza del volume molecolare che è proporzionale al PM [Levin, 1980;van de Waterbeemd *et al.*, 1998]. Sono pochi i farmaci attualmente disponibili che rispettano entrambe le caratteristiche così come lo sono i farmaci in cui un aumento della lipofilia porti ad un effettivo incremento nel passaggio cerebrale, che viene in realtà ridotto a causa di un'umentata affinità nei confronti del sistema di efflusso P-gp [Gabathuler, 2010] e dalla maggiore distribuzione tissutale.

Strategie fisiologiche

Agiscono sui meccanismi fisiologici della barriera.

Modulazione della BEE: modulazione delle *tight junction*. Strategia spesso indicata con il termine *disruption*, comporta l'apertura temporanea e reversibile delle TJ. Il fenomeno viene promosso in seguito all'utilizzo di mezzi chimici tra cui soluzioni iperosmotiche di mannitolo, capaci di creare una contrazione delle cellule endoteliali, [Kroll and Neuwelt, 1998;Doolittle *et al.*, 2000] ed analoghi della bradichinina, capaci di modulare il recettore B2 della bradichinina il quale è responsabile di cambiamenti nell'architettura delle claudine e delle occludine e quindi delle TJ [Dean *et al.*, 1999;Borlongan and Emerich, 2003] o fisici, quali gli ultrasuoni o le onde elettromagnetiche che aumentano la permeabilità delle TJ [Hynynen *et al.*, 2001;2006]. La *disruption* può essere responsabile di stress fisiologici, aumento temporaneo della pressione intracranica ed il passaggio di sostanze indesiderate.

Modulazione dei sistemi di trasporto. Un tipo di modulazione dei sistemi di trasporto prevede la regolazione dei trasportatori di efflusso implicati nell'allontanamento di un

farmaco dal SNC. La sovra-espressione delle proteine di estrusione riscontrata in alcune condizioni patologiche come l'ictus, l'epilessia, i tumori cerebrali, la neuro-AIDS e le patologie neurodegenerative [Miller *et al.*, 2008] è responsabile di una mancata o minore efficacia terapeutica, in quanto limita la concentrazione del farmaco al sito di azione. La P-gp è una delle proteine principalmente coinvolta in questo meccanismo ed è uno dei fattori predominanti nel fallimento della terapia chemioterapica del SNC [Miller *et al.*, 2008].

La co-somministrazione di sostanze quali la ciclosporina A, il verapamil, il tamoxifene, il diltiazem, in grado di inibire l'attività della P-gp, è stata utilizzata per incrementare il trasporto di farmaci antivirali, antifungini ed antitumorali [Alyautdin *et al.*, 2014].

Tuttavia, anche tale strategia non è priva di svantaggi. I modulatori della P-gp di prima generazione (verapamil, ciclosporina) inibiscono gli enzimi epatici metabolici CYP3A e sono causa di tossicità da elevate dosi di somministrazione vista la loro bassa affinità con P-gp. Con i modulatori delle generazioni successive si sono ridotte tali problematiche, ma è risultata ambigua la loro capacità di favorire il raggiungimento del SNC dei farmaci substrato dei sistemi di efflusso [Miller *et al.*, 2008]. Inoltre, l'utilizzo cronico degli inibitori della P-gp potrebbe favorire il passaggio anche di sostanze indesiderate e tossiche per il SNC.

Un altro tipo di modulazione dei sistemi trasportatori consiste nello sfruttare i *carrier* o i recettori espressi nella BEE per le sostanze endogene in modo da ottenere, tramite un trasporto mediato da *carrier* (CMT) o da recettori (RMT), il passaggio di un farmaco nel SNC. Nei sistemi CMT, le proteine di trasporto permettono il movimento bidirezionale sangue-cervello di ioni, piccole molecole idrosolubili e nutrienti. Sono saturabili e specifici per una categoria di substrati: vengono distinti in CMT per glucosio, amminoacidi, acidi carbossilici, colina, nucleosidi, ormoni tiroidei e vitamine liposolubili [Pardridge 2002]. Alcuni farmaci terapeuticamente in uso (L-DOPA, gabapentin, melphalan) vengono internalizzati nell'endotelio cerebrale con un meccanismo CMT grazie alla similitudine strutturale con un substrato endogeno [Pardridge, 2012]. La coniugazione di un principio attivo con un vettore dotato di affinità per un determinato *carrier* è un'altra strategia ampiamente indagata nel campo dei sistemi CMT [Pardridge, 2012]. A causa della natura stereospecifica dei *carrier*, la strategia CMT è limitata all'impiego di piccole molecole [Jones and Shusta, 2007].

Sia nel lato luminale che abluminale dell'endotelio cerebrale, sono espressi specifici sistemi di trasporto recettoriali responsabili del passaggio bidirezionale di proteine e peptidi circolanti come l'insulina e la transferrina (Tf). Nel RMT l'interazione del ligando con uno

specifico recettore porta all'internalizzazione del complesso ligando-recettore per transitosi con il conseguente rilascio del ligando all'interno della cellula endoteliale.

L'identificazione e la comprensione dei meccanismi fisiologici di RMT ha portato allo sviluppo dei sistemi di veicolazione in cui i composti terapeutici vengono coniugati o con ligandi endogeni per il recettore o con ligandi modificati ma dotati di affinità recettoriale oppure ancora con anticorpi in grado di riconoscere con specificità una struttura recettoriale della BEE [Pardridge, 2002]. La coniugazione tra la molecola terapeutica ed il vettore può essere del tipo covalente (via ammine primarie o legame tioestere) o non covalente (streptavidina/biotina, PEG); l'interazione non deve comunque modificare l'attività del farmaco. L'ampia espressione del recettore della transferrina (Tfr) a livello dell'endotelio cerebrale [Jefferies *et al.*, 1984], ha permesso che questo venisse ampiamente indagato nello sviluppo di sistemi RMT. Per prevenire la competizione con il substrato endogeneo ed evitare la saturazione del Tfr, i sistemi di veicolazione documentati in letteratura riguardano l'uso di anticorpi diretti contro il Tfr tra cui uno dei maggiormente impiegati è l'anticorpo monoclonale murino diretto contro il Tfr di ratto (OX26). Questo ha inizialmente dimostrato di avere azioni di *targeting* cerebrale senza alterare l'attività farmacologica del cargo ad esso associato; ciononostante, il suo impiego nel garantire l'accumulo del farmaco nel parenchima cerebrale è risultato spesso fallimentare. Una giustificazione potrebbe essere ricercata nel fatto che l'espressione del Tfr si estende anche ai tessuti periferici il che ne limita la sito-specificità e l'accumulo nel cervello [Gabathuler, 2010]. Tale svantaggio si manifesta ugualmente nei sistemi RMT aventi come target il recettore dell'insulina (Ir). Anche in questi, il vettore è rappresentato da anticorpi poiché il ligando endogeno è instabile a livello ematico (emivita 10 min) ed è causa di un effetto ipoglicemizzante. Molteplici studi su modelli animali hanno comunque confermato l'efficacia nel trasportare un neuro-farmaco al cervello attraverso il recettore dell'insulina [Pardridge, 2012; Boado *et al.*, 2014].

Strategia formulativa: uso dei sistemi colloidali

Le nanoparticelle (NP), i liposomi, le emulsioni, le micelle e i dendrimeri sono alcuni esempi di sistemi colloidali (SC) accomunati tutti dall'aver dimensioni rientranti nel *range* nanometrico (1-1000 nm).

Il più delle volte, il passaggio dei nanosistemi nel SNC viene promosso dalla presenza di agenti che operano sui meccanismi di trasporto fisiologicamente presenti nella BEE (sistemi di efflusso, TJ, RMT, CMT); l'attraversamento spontaneo per transitosi e/o endocitosi è infatti limitato a causa delle scarse proprietà di permeazione della barriera.

La versatilità nella natura delle NP, dettata dalla composizione della matrice quale elemento costitutivo, e le numerose modifiche di superficie apportabili, permettono alle NP di poter essere adattate nell'impiego di una ampia gamma di farmaci, e quindi di patologie, rendendole strutture appetibili nell'ambito della ricerca dei sistemi per il trasporto cerebrale di farmaci. Uno degli svantaggi principali associati all'uso delle NP è la loro rapida rimozione ematica (*clearance*) ad opera del sistema reticolo endoteliale (RES), fenomeno che influenza negativamente la biodistribuzione particellare ed il raggiungimento del target d'azione. D'altro canto, una risposta alla problematica viene data mediante il controllo delle caratteristiche dimensionali e di superficie delle NP che consente di aumentarne l'emivita plasmatica. In riferimento a ciò, è stato appurato che le dimensioni medie ideali cadono nel *range* dei 200-500 nm e che il fenomeno di *clearance* splenico, con passaggio nelle fessure dei seni venosi, si riduce se, le particelle vicine al limite massimo dei 500 nm, sono capaci di deformarsi. Per dimensioni minori di 200 nm prevale invece la *clearance* renale [Gastaldi *et al.*, 2014]. In aggiunta, la presenza nella superficie particellare di surfattanti e/o polimeri rende le NP *stealth*, cioè meno riconoscibili da parte dei componenti del RES poiché meno soggette a fenomeni fagocitotici o di opsonizzazione promossi dalla lipofilia e dalla carica negativa superficiale del colloide.

La manipolazione delle caratteristiche di superficie consente di assolvere ad un altro importante compito: il *targeting* sito-specifico. La scelta del ligando sito-specifico viene effettuata a seconda della *a)* problematica del passaggio legata al farmaco; *b)* via preferenziale per l'attraversamento della BEE (RMT, CMT, transcitosi per adsorbimento, inibizione dei sistemi di efflusso, fluidizzazione di membrana ed apertura delle TJ); *c)* patologia (condizioni alterate della BEE, durata, tipologia ed entità del trattamento). Largo impiego trovano i ligandi destinati ad un RMT; questi raramente sono i substrati endogeni dei recettori, che creerebbero competizione con gli stessi presenti fisiologicamente nel plasma, ma piuttosto anticorpi o molecole che interagiscono in siti allosterici [Kreuter, 2014].

Tra le NP studiate per la veicolazione di farmaci al cervello rientrano quelle a matrice polimerica e quelle a matrice lipidica, passate recentemente in rassegna rispettivamente da Kreuter (2014) e Gastaldi *et al.* (2014). Il polimero dell'acido lattico (PLA) ed il co-polimero dell'acido lattico con l'acido glicolico (PLGA) trovano ampia applicazione nella preparazione di NP polimeriche poiché biodegradabili, atossici, approvati dalla FDA; essi inoltre, tramite semplici metodi preparativi quali l'emulsione con evaporazione del solvente, portano facilmente all'ottenimento di NP [Lu *et al.*, 2014]. NP lipidiche, meglio conosciute come SLN, sono ottenute impiegando lipidi solidi a temperatura ambiente

(gliceridi, acidi grassi, cere), principalmente mediante la tecnica di omogeneizzazione a caldo, che può venire sostituita da altre che prevedono meno stress meccanici e termici, come l'emulsione seguito da evaporazione del solvente. Le SLN, rispetto alle polimeriche hanno maggiori capacità di caricamento di farmaco e stabilità, minore costo e tossicità; numerosi studi hanno comunque dimostrato che entrambe sono capaci di veicolare al SNC molecole terapeuticamente problematiche quali peptidi, proteine, materiale genico, oligonucleotidi [Alyautidin *et al.*, 2014], anche se finora, le concentrazioni di farmaco rinvenute nel cervello, sono state sempre troppo basse per rendere i sistemi farmacologicamente applicabili [Masserini, 2013].

Strategia della via di somministrazione: il nose-to-brain

È una strategia che unisce i vantaggi dei metodi invasivi, aggirando la BEE, con quelli dei metodi non invasivi, evitando la messa in atto di interventi chirurgici. La BEE viene bypassata in quanto è il naso, l'unico distretto dell'organismo, ad essere a diretto contatto con il SNC. Dal bulbo olfattivo, sito nelle regioni limbiche cerebrali, si diramano i filamenti nervosi del XII nervo cranico (nervo olfattivo) che vanno a proiettarsi nella mucosa olfattiva nasale collocata nella parte postero-superiore dell'omonima cavità [Lochhead and Thorne, 2012]. Il naso è in comunicazione con il SNC anche per mezzo del V nervo cranico (trigemino) di cui il ramo oftalmico e quello mascellare innervano rispettivamente la mucosa olfattiva e quella respiratoria. Grazie al trigemino si crea una diretta comunicazione con il tronco encefalico. Dalla cavità nasale si origina così una via di accesso per il trattamento mirato delle patologie localizzate nelle sedi limbiche (disordini mentali, neurodegenerazione) e nel tronco encefalico.

La validità e la rapidità della strategia *nose-to-brain* nel garantire il passaggio di farmaci al SNC è stata ampiamente dimostrata da più di un centinaio di studi riguardanti la sperimentazione animale [Djupesland *et al.*, 2014]. Da questi sono stati ottenuti risultati incoraggianti per la successiva applicazione in campo umano. Tuttavia, la pratica clinica è stata rallentata da differenti fattori tra cui soprattutto una difficile traslazione agli umani dei risultati degli studi animali per le differenze anatomiche/fisiologiche intercorrenti tra le specie, [Lochhead and Thorne, 2012]. Inizialmente si è ritenuto che la mucosa olfattiva dei ratti e topi avesse una più ampia superficie rispetto a quella umana. Dettagliate analisi anatomiche su campioni di biopsie umane hanno però dimostrato come il *nose-to brain* si possa estendere anche alla mucosa respiratoria abbondantemente innervata dal trigemino. La complessa anatomia e fisiologia nasale dell'uomo richiede maggiori accorgimenti. Per evitare un effetto sistemico ed avere un'azione mirata al SNC, le modalità di

somministrazione, le proprietà chimico fisiche del materiale somministrato (dimensione, morfologia, aerodinamicità, ecc.) così come i dispositivi di dispensazione sono da considerarsi fattori determinanti al successo.

Il meccanismo del rapido passaggio dei farmaci al SNC si compie tramite una migrazione extra-cellulare in cui si ha inizialmente l'attraversamento dei canali creati dalle cellule di rivestimento disposte lungo il nervo trigemino ed olfattivo, il conseguente raggiungimento del bulbo olfattivo, da cui si osserva, infine, una migrazione alle varie aree cerebrali per mezzo della forza di spinta impartita dalle pulsazioni arteriorali, la così detta pompa perivascolare [Djupesland *et al.*, 2013]. Il movimento nel LCS, che bagna il bulbo olfattivo, giocherebbe quindi un ruolo marginale in quanto, a causa del fenomeno della lenta diffusione, impedirebbe ad un farmaco di raggiungere le sedi distanti dalle aree limbiche [Djupesland *et al.*, 2013; Pardridge, 2011]. Anche il meccanismo della lenta migrazione intra-assonale, dovuto all'*up-take* da parte dei neuroni sensoriali olfattivi, sembra non avere peso [Chapman *et al.*, 2013]. Tuttavia, rimangono ancora dei punti oscuri nel percorso di un farmaco al SNC mediante questa modalità di trattamento [Lochhead and Thorne, 2012].

La via nasale è una via non priva di svantaggi tra i quali attiva *clearance* mucociliare, pseudo metabolismo di primo passaggio per la presenza di sistemi enzimatici metabolici nonché variabilità interindividuale ed una possibile alterazione della mucosa nasale in seguito alla somministrazione stessa del farmaco. Numerosi sono i vantaggi quali sicurezza, rapidità, facilità di esecuzione, possibilità nell'evitare il metabolismo di primo passaggio epatico, ricca vascolarizzazione e presenza di cellule immuno-competenti. Inoltre si presta alla veicolazione di differenti categorie di farmaci come ormoni [Nathan, 2011], fattori neurotrofici [Alcalá-Barraza *et al.*, 2010], cellule staminali [Joyce *et al.*, 2010] e peptidi [Brown and Liu, 2014], macrolidi [Gavini *et al.*, 2011], derivati purinici [Dal Piaz *et al.*, 2008] e triptani [Gavini *et al.*, 2013].

Elenco delle abbreviazioni

AJ: *adherens junctions*; BEE: barriera ematoencefalica; BMVEC: cellule endoteliali micro vascolari cerebrali; CMT: trasporto mediato da *carriers*; CVO: organi circumventricolari; JAM: molecole di adesione cellulare; LCS: liquido cerebrospinale; NP: nanoparticelle; NVU: unità neuro vascolare; P-gp: glicoproteina-P; PLA: acido polilattico; PLGA: acido polilattico-co-glicolico; RES: sistema reticolo-endoteliale; RMT: trasporto mediato da recettori; SC: sistemi colloidali; SLN: nanoparticelle solide lipidiche; SNC: sistema nervoso centrale; Tf: transferrina; Tfr: recettore della transferrina; TJ: *tight junctions*; ZO: zonula occludens.

Bibliografia

- Alcalá-Barraza SR, Lee MS, Hanson LR, McDonald AA, Frey WH 2nd, McLoon LK. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. *J Drug Target*. 2010;18(3):179-90.
- Alyautdin R, Khalin I, Nafeeza MI, Haron MH, Kuznetsov D. Nanoscale drug delivery systems and the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:795-811.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood–brain barrier: an overview Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis*. 2004;16(1):1-13.
- barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1999;31(1):149-61.
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, Malecki A. Physiology and pharmacological role of the blood–brain barrier. *Pharmacol Rep*. 2008;60:600-22.
- Boado RJ, Lu JZ, Hui EK, Pardridge WM. Insulin receptor antibody-sulfamidase fusion protein penetrates the primate blood-brain barrier and reduces glycosaminoglycans in Sanfilippo type A cells. *Mol Pharm*. 2014;11(8):2928-34.
- Borlongan CV, Emerich DF. Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood–brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Res Bull*. 2003;60(3):297-306.
- Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*. 1969;40:648-77.
- Broman T. The possibilities of the passage of substances from the blood to the central nervous system. *Acta Psych Neurol* 1941;16:1-16.
- Brown V, Liu F. Intranasal Delivery of a Peptide with Antidepressant-Like Effect. *Neuropsychopharmacology*. 2014;39, 2131-41.
- Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood–brain barrier in anaesthetised rats: a developmental study. *J Physiol*. 1990;429:47-62.
- Cardoso FL, Brites D, Brito MA. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*. 2010;64(2):328-63.
- Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ. The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *J Neurochem*. 2009;111:291-314.
- Chapman CD, Frey WH 2nd, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, Schiöth HB, Benedict C. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res*. 2013;30(10):2475-84.
- Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:640.

Dalpiaz A, Gavini E, Colombo G, Russo P, Bortolotti F, Ferraro L, Tanganelli S, Scatturin A, Menegatti E, Giunchedi P. Brain uptake of an antiischemic agent by nasal administration of microparticles. *J Pharm Sci.* 2008;97(11):4889-903.

Dean RL, Emerich DF, Hasler BP, Bartus RT. Cereport (RMP-7) increases carboplatin levels in brain tumors after pretreatment with dexamethasone. *Neuro Oncol.* 1999;1(4):268-74.

Djupesland PG, Mahmoud RA, Messina JC. Accessing the brain: the nose may know the way. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(5):793-4.

Djupesland PG, Messina JC, Mahmoud RA. The nasal approach to delivering treatment for brain diseases: an anatomic, physiologic, and delivery technology overview. *Ther Deliv.* 2014;5(6):709-33.

Doolittle ND, Miner ME, Hall WA, Siegal T, Jerome E, Osztie E, McAllister LD, Bubalo JS, Kraemer DF, Fortin D, Nixon R, Muldoon LL, Neuwelt EA. Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer.* 2000;88(3):637-47.

El-Bacha RS, Minn A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1999;45(1):15-23.

Fenstermacher J, Gross P, Sposito N, Acuff V, Pettersen S, and Gruber K. Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;529:21-30.

Friedemann U. Blood-brain barrier. *Physiol Rev.* 1942;22:125-45.

Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis.* 2010;37:48-57.

Gastaldi L, Battaglia L, Peira E, Chirio D, Muntoni E, Solazzi I, Gallarate M, Dosio F. Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: current state of the art. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(3):433-44.

Goldmann E. Vitalfärbung am zentralnervensystem. *Abhandl Konigl preuss Akad Wiss;* 1913.

Gavini E, Rassu G, Ferraro L, Generosi A, Rau JV, Brunetti A, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of chitosan glutamate on the in vivo intranasal absorption of rokitamycin from microspheres. *J Pharm Sci.* 2011;100(4):1488-502.

Gavini E, Rassu G, Ferraro L, Beggiato S, Alhalaweh A, Velaga S, Marchetti N, Bandiera P, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of polymeric microcarriers on the in vivo intranasal

uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;83(2):174-83.

González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003;81(1):1-44.

González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys. Acta.* 1778;729-56.

Hawkins BT, Davis TP, The blood–brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005;57: 73-85.

Hawkins RA, O’Kane RL, Simpson IA, Viña JR. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr.* 2006;136(1 Suppl):218S-26S.

Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood–brain barrier in rabbits. *Radiology.* 2001;220(3):640-6.

Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Raymond S, Weissleder R, Jolesz FA, Sheikov N. Focal disruption of the blood-brain barrier due to 260-kHz ultrasound bursts: a method for molecular imaging and targeted drug delivery. *J Neurosurg.* 2006;105(3):445-54.

Jefferies WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature.* 1984;312:162-3.

Johnson AK, Gross PM. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.* 1993;7(8): 78-86.

Jones AR, Shusta EV. Blood-Brain Barrier Transport of Therapeutics via Receptor-Mediation. *Pharm Res.* 2007;24(9):1759-71.

Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolte JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med.* 2010;5(6):933-46.

Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;71:2-14.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):312-8.

Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood–brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery.* 1998;42(5):1083-99.

Levin VA. Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J Med Chem.* 1980;23:682-4.

Lewandovsky M. Zur lehre von der cerebrospinal flüssigkeit. *Z Klin Med* 1900;40:480-94.

Lochhead JJ, Thorne RG. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;15;64(7):614-28.

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

Lu CT, Zhao YZ, Wong HL, Cai J, Peng L, Tian XQ. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:2241-57.

Masserini M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochemistry*. 2013: Consultabile al: (<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/238428/cta/>).

Matschay A, Nowakowska E, Hertmanowska H, Kus K, Czubak A. Cost analysis of therapy for patients with multiple sclerosis (MS) in Poland. *Pharmacol Rep*. 2008;60(5):632-44.

Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:225-36.

Miller DS, Bauer B, Hartz AMS. Modulation of P-glycoprotein at the Blood-Brain Barrier: Opportunities to Improve CNS Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 2008;60(2):196-209.

Mullard A. 2013 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:85-9.

Nathan RA. Intranasal steroids in the treatment of allergy-induced rhinorrhea. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011;41(1):89-101.

Neuwelt EA, Bauer B, Fahlke C, Fricker G, Iadecola C, Janigro D, Leybaert L, Molnár Z, O'Donnell ME, Povlishock JT, Saunders NR, Sharp F, Stanimirovic D, Watts RJ, Drewes LR. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci*. 2011;12(3):169-82.

Nieuwenhuys R, Voogd JD, Huijzen C [II ed. ita. A cura di Papa M]. *Il sistema nervoso centrale*. Springer-Verlag Italia; 2010: p.97-99.

Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol*. 1977;1(5):409-17.

Pardridge WM. Blood-brain barrier transport of glucose, free fatty acids, and ketone bodies. *Adv Exp Med Biol*. 1991;291:43-53.

Pardridge WM. *Brain drug targeting: the future of brain drug development*. Cambridge: Cambridge University Press; 2001.

Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain with molecular trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:131-9.

Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(11):1959-72.

Pardridge WM. Drug transport in brain via the cerebrospinal fluid. *Fluids Barriers CNS*. 2001;8(1):7.

Pardridge WM. *The Blood-Brain Barrier: Bottleneck in Brain Drug Development*. *NeuroRx*. 2005;2(1):3-14.

Pardridge WM. Transport of nutrients and hormones through the blood-brain barrier. *Diabetologia*. 1981;20 Suppl:246-54.

Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood–brain barrier: a historical point of view. *Anat Rec B New Anat*. 2006;289(1):3-8.

Rip J, Schenk GJ, de Boer AG. Differential receptor-mediated drug targeting to the diseased brain. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6(3):227-37.

Schinkel AH and van Deemter. L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Investig*. 1996;97:2517-24.

Schinkel AH, Smit JJ, van Tellingen O, Beijnen JH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, van der Valk MA, Robanus-Maandag EC, te Riele HP, *et al*. Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. 1994;77:491-502.

Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Investig*. 1995;96:1698-705.

Sedlakova R, Shivers RR, and Del Maestro RF. Ultrastructure of the bloodbrain

Upadhyay RK. Drug Delivery Systems, CNS Protection, and the Blood Brain Barrier. *Biomed Res Int* 2014; ID 869269. Consultabile al: (<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/869269/>)

van de Waterbeemd H, Camenisch G, Folkers G, Chretien JR, Raevsky OA. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J Drug Target*. 1998;6:151-65.

Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(6):323-37.

Parte Prima

TARGETING CEREBRALE MEDIATO DA VETTORI SITO-SPECIFICI E STRATEGIA *NOSE-TO-BRAIN*: RASSEGNE BIBLIOGRAFICHE

Le rassegne bibliografiche trattate di seguito sono frutto di un mirato approfondimento di parte della letteratura raccolta ed impiegata durante la Parte Sperimentale del lavoro (*Parte seconda e terza*).

Capitolo I

Da Agenti Neurotossici a *Shuttle* per il Trasporto di Farmaci al SNC

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Abstract

Le patologie situate nel sistema nervoso centrale (SNC) sono un difficile bersaglio terapeutico e diagnostico. In tal senso, la barriera emato-encefalica (BEE) gioca un ruolo fondamentale perché impedisce alla maggior parte dei farmaci di raggiungere il loro sito d'azione all'interno del SNC. I sistemi per il trasporto di farmaci al cervello sono stati concepiti per rispondere a questa problematica. Molti originano dall'analisi anatomico-funzionale della BEE e sono stati sviluppati in modo da sfruttare la fisiologia della membrana endoteliale cerebrale e consentire l'accesso dei farmaci. Sia delle sostanze endogene che esogene posseggono recettori o *carrier* che mediano il loro ingresso nel SNC. Una strategia ampiamente utilizzata per il trasporto al cervello di rimedi terapeutici consiste nel combinare i principi attivi con sostanze in grado di sfruttare i meccanismi di internalizzazione cerebrali. Si ottiene il vantaggio di disporre di un metodo indiretto che consente di superare la BEE senza invasività e quindi con minor pericolo e costo.

Tra le sostanze presenti in natura come potenziali vettori di neuro-farmaci si distinguono le neurotossine. Questa *review* passa in rassegna i principali sistemi di veicolazione, attualmente presenti, composti da frammenti atossici di neurotossine usate per permettere il passaggio della BEE ed il raggiungimento del SNC. L'obiettivo è stato quello di stimolare la ricerca nello sviluppo di nuove tipologie di sistemi di trasporto improntati all'uso di sostanze comunemente considerate pericolose, ma dietro alle quali si nascondono anche numerosi vantaggi.

Introduzione

Le patologie del SNC sono spesso una sfida terapeutica e diagnostica dal momento che la BEE nega l'accesso alla maggior parte dei farmaci. La BEE è un sistema cerebrovascolare altamente complesso composta nel totale da circa 100 miliardi di capillari le cui cellule endoteliali sono strettamente unite da *tight junction* (TJ) [Brightman, 1969], circondate da astrociti, periciti e macrofagi che nell'insieme formano la complessa barriera che protegge il SNC. È responsabile della protezione fisiologica di quest'ultimo ma al contempo la sua presenza impedisce il passaggio di molecole terapeutiche. A causa di quest'ostacolo, è risaputo che più del 98% di farmaci con peso molecolare inferiore a 400 Da e la totalità di quelli aventi un peso superiore non attraversano la barriera [Pardridge, 2003;2005]. Il trattamento di patologie quali l'emicrania, l'insonnia, i disturbi dell'umore, il dolore e l'epilessia è basato su agenti ben caratterizzati ed a basso peso molecolare. D'altra parte, le patologie più devastanti del SNC come i tumori cerebrali, l'ictus e la neurodegenerazione sono in attesa di una cura o trattamento. Ciò è da ricondurre al fatto che, molecole che hanno mostrato di essere attive contro lo sviluppo di queste malattie, sono di grosse dimensioni e quindi incapaci di superare la BEE. In tal contesto, vi è un'urgente necessità nello sviluppo di strategie che consentano a nuovi composti terapeutici di raggiungere il SNC. Di fatto, la ricerca nell'ambito dei neuro-farmaci da parte dell'industria farmaceutica è fortemente rallentata e le sperimentazioni cliniche si fermano alla fase I o II, dopo ingenti costi di sviluppo, principalmente a causa dello scarso raggiungimento del tessuto nervoso [Khrestchatisky and Tokay, 2014]. In aggiunta, sono insufficienti gli investimenti volti al progresso tecnologico per l'ottenimento di sistemi atti al trasporto sito-specifico di questa categoria farmaceutica.

Teoricamente la strategia più immediata per arrivare alle sedi nervose centrali consiste nel superamento fisico dell'ostacolo attraverso la somministrazione diretta di un farmaco nel SNC per via intratecale, intraventricolare od intracerebrale [Alam *et al.*, 2010]. In tal modo si ricorre all'uso di metodi invasivi e quindi dolorosi, pericolosi e costosi, perché richiedono personale specializzato ed idonea strumentazione, pertanto di complessa applicazione. La somministrazione nasale rappresenta un approccio non invasivo per trasportare farmaci al cervello; in realtà, la comunicazione diretta tra naso e cervello può offrire la possibilità di aggirare la BEE. Il passaggio dal naso al cervello può avvenire attraverso il neuro-epitelio olfattivo tramite una via di trasporto paracellulare, transcellulare o neuronale [Pires *et al.*, 2009]. Nell'ultimo decennio sono stati studiati diversi sistemi di veicolazione, come le micro e le nanoparticelle, per la somministrazione nasale di un neuro-farmaco, in alternativa alla via orale o parenterale. È stato documentato un aumento della quantità di farmaco nelle sedi

centrali rispetto allo stesso libero [Dalpiaz *et al.*, 2008;Gavini *et al.*, 2011;2013;Fazil *et al.*, 2012;Josea *et al.*, 2013;Kumar *et al.*, 2013].

D'altra parte, con gli approcci indiretti è necessario che il farmaco sia capace di attraversare la BEE. Questi possono venire classificati in: *I*) Metodi farmaceutici. Adattano le caratteristiche chimico-fisiche della molecola per assicurare il passaggio della barriera. Possono essere basati su modifiche strutturali del farmaco (profarmaco) o sulla formulazione in sistemi quali liposomi e nanoparticelle [Witt *et al.*, 2000;Tiwari and Amiji, 2006]; *II*) Metodi di modifica della barriera. Cambiano la struttura della BEE aumentando temporaneamente la sua permeabilità tramite l'impiego di agenti osmotici, biochimici, ultrasuoni o onde elettromagnetiche [Doolittle *et al.*, 2000;Plank *et al.*, 2011;Huang *et al.*, 2012]. *III*) Metodi fisiologici. Sfruttano la presenza fisiologica nella BEE di trasportatori e recettori che mediano l'ingresso dei loro substrati.

Grazie alla loro versatilità, i metodi fisiologici si rendono le strategie tra le più interessanti. Di fatto, possono essere impiegati con diversi stratagemmi per veicolare farmaci di varia natura per il *targeting* selettivo, sicuro e non invasivo del SNC. Sfruttare le strutture fisiologicamente presenti significa utilizzare meccanismi di trasporto endogeni che permettono alle sostanze di passare indisturbate indipendentemente dalle loro caratteristiche chimico-fisiche (Fig. 1). Con il tempo sono stati sviluppati sistemi di trasporto come “cavalli di Troia”, peptidi chimerici, proteine cationiche, profarmaci e vettori. La tecnologia del “cavallo di Troia” molecolare utilizza proteine geneticamente ingegnerizzate per muovere un farmaco alla superficie della BEE; il complesso viene quindi trasportato con meccanismo mediato da recettore [Pardridge, 2006]. Il sistema del peptide chimerico viene ottenuto tramite legame covalente di una sostanza farmaceutica con un peptide o proteina vettoriale abile nell'attraversare la BEE per trascitosi di adsorbimento, recettore o trasportatore mediata [Prokai and Prokai-Tatrai, 2003]. Il sistema delle proteine cationiche è stato disegnato per favorire la penetrazione encefalica di farmaci proteici tramite un'interazione elettrostatica con i gruppi funzionali negativi presenti nella barriera e successiva internalizzazione per endocitosi transcellulare da adsorbimento [Bradbury *et al.*, 2000]. I profarmaci vengono ottenuti accoppiando un farmaco con uno spezzone vettoriale sito-specifico in modo da ottenere un sistema privo di attività intrinseca, ma, che in seguito a una bio-reazione, rigenera *in vivo* l'agente farmacologicamente attivo. Questo viene reso possibile dalla presenza di specifici enzimi sull'endotelio cerebrale. Un farmaco può venire coniugato con sostanze che passano normalmente la BEE e venire internalizzato con queste: si ottiene la strategia conosciuta come trasporto mediato da vettori. Tra le sostanze vettoriali che provengono dalla natura e capaci di varcare la BEE vi sono le neurotossine. Queste

hanno come bersaglio il sistema nervoso ed agiscono modificando i segnali di trasmissione chimica tra i neuroni. Bloccano il rilascio di vari agenti od interferiscono nella ricezione della trasmissione nervosa spingendo, talvolta, i neuroni all'invio di falsi segnali; nel complesso danneggiano seriamente o distruggono le cellule nervose. Le neurotossine possono avere un'azione pre- o post-sinaptica e possono venire classificate in neurotossine agenti sui canali ionici, sui recettori dei neurotrasmettitori o su meccanismi enzimatici [Tipton and Dajas, 1994]. Pochi sono gli sforzi fatti nello sviluppo di vettori di questa natura nell'ambito dei sistemi di neuro-veicolazione. Questa review indaga sull'uso delle neurotossine nei sistemi di veicolazione di farmaci al cervello. Esse sono state classificate in base alla loro origine: microbica (virus e batteri) (Tab. 1.2) o animale (Tab. 3).

Shuttle virali

Virus dell'Herpes

L'*Herpes simplex virus* 1 e 2 (HSV1 e HSV2) e *varicella-zoster virus* (VZV) sono virus neurotropici umani con DNA lineare a doppio filamento. Andando dall'esterno all'interno si compongono di pericapside o *envelope*, tegumento, capside e *core*. Il pericapside è il rivestimento esterno provvisto di un doppio strato lipidico dove sono inserite glicoproteine responsabili del legame con specifici recettori cellulari e del passaggio del virus nel citoplasma. Il tegumento è formato da proteine della matrice implicate nell'assemblaggio del virione, nello *shut-off* proteico dell'ospite e nell'induzione dei geni virali. Il capside ha una struttura icosaedrica simmetrica circondata dal tegumento e contenente il *core* al quale è associato il genoma virale. Successivamente alla prima infezione, HSV1, HSV2 e VZV possono persistere in uno stato di latenza principalmente nelle radici dorsali dei gangli e nel nervo trigemino. In presenza di particolari stimoli (ambientali o soggettivi), il virus può venire riattivato e migrare lungo i terminali nervosi per raggiungere i siti di infezione primaria come le aree cutanee e le membrane mucosali [Steiner *et al.*, 2007].

Un peptide a 19 residui amminoacidici (gH625) derivato dalla glicoproteina di fusione gH (da aa 625 a 644) del HSV1 facilita la fusione dell'*envelope* virale con la membrana plasmatica della cellula ospite agendo come un dominio di perturbazione di membrana. Similmente ai CPP (*cell penetrating peptide*), il gH625 ha la capacità di trasportare molecole cargo attraverso le membrane cellulari. È stato utilizzato nella funzionalizzazione di nanoparticelle (NP) come *quantum dot*, dendrimeri e liposomi, per promuovere e studiare il meccanismo di ingresso cellulare [Falanga *et al.*, 2013; Smaldone *et al.*, 2013]. Nel contesto del trasporto di farmaci al cervello, gH625 è stato legato covalentemente sulla superficie di particelle di polistirene amminato (gH625-NP) [Guarnieri *et al.*, 2013]. Differenti densità di

peptide sono state utilizzate per investigare il ruolo da questo giocato nella caratterizzazione delle gH625-NP e del loro *trafficking* intracellulare; le densità superficiali peptidiche impiegate sono state di 3, 4 e 6 peptide/nm² con la formazione di NP funzionalizzate rispettivamente del 25%, 35% e 50%. Poiché le NP funzionalizzate per il 35% hanno mostrato di non subire aggregazione particellare, di essere stabili in mezzo acquoso e capaci di penetrare nelle cellule con un meccanismo *random walk*, queste sono state utilizzate per gli studi di passaggio attraverso la BEE *in vitro*. Utilizzando modelli di BEE con cellule cerebrali immortalizzate di topo (bEnd3), le gH625-NP sono state soggette ad un maggiore *up-take* rispetto alle NP non funzionalizzate e capaci di sfuggire ai meccanismi di cattura endocitotici. Il sistema si è perciò rivelato un mezzo utile per aumentare l'ingresso di un farmaco nel SNC. Tuttavia andrebbe presa in considerazione la sua mancanza di sito-specificità.

Virus della rabbia

È un virus neurotropico di forma bastoncellare o a proiettile, a singolo filamento negativo di RNA [Rupprecht, 1996]. Dopo infezione periferica, raggiunge il SNC tramite trasporto retrogrado [Rupprecht, 1996;Klingen *et al.*, 2008].

RVG29 è un peptide di 29 amminoacidi derivato dalla glicoproteina del virus della rabbia [Kumar *et al.*, 2007]. Si lega a specifici recettori dell'acetilcolina (AChR): i recettori nicotinici $\alpha 7$ abbondantemente espressi nel SNC. Il primo lavoro basato sull'uso di questo peptide come vettore per il *targeting* cerebrale è stato pubblicato nel 2007 da Kumar *et al.* Gli autori hanno documentato la possibilità di ottenere un sistema non invasivo e sicuro per il raggiungimento del SNC dopo somministrazione endovenosa (e.v.). Con questo scopo, hanno sintetizzato un peptide chimerico mediante aggiunta di 9 residui di arginina in modo da rendere possibile il legame con un oligonucleotide. Il sistema di veicolazione è stato creato complessando elettrostaticamente il peptide con un oligonucleotide siRNA. Il complesso ha mostrato la capacità di raggiungere selettivamente le cellule neuronali, di trasportarvi il siRNA all'interno e garantire l'effetto di silenziamento sia in sperimentazioni *in vitro* che *in vivo*. Considerata l'origine del peptide, ne è stata valutata la tossicità *in vitro* attraverso studi di vitalità cellulare ed, *in vivo*, attraverso l'analisi della risposta immunitaria prodotta. Il sistema (RVG-9R) si è dimostrato sicuro, ma con stabilità ematica limitata (8 h). Per risolvere questo problema, gli autori hanno suggerito di utilizzare RVG-9R come ligando in: 1) NP inglobanti siRNA in modo da proteggere l'oligonucleotide, aumentarne il trasporto e diminuirne la quantità necessaria per un efficiente silenziamento genico; 2) NP inglobanti altro materiale genico o farmaci a basso peso molecolare; 3) sistemi ottenuti dalla diretta

coniugazione del siRNA al posto della complessazione elettrostatica tra l'oligonucleotide ed i 9 residui di arginina del peptide virale. Nonostante l'evidenza della ridotta stabilità ematica, il complesso privo di qualsiasi protezione è stato utilizzato comunque con successo per il trasporto di siRNA al cervello [Kumar *et al.*, 2007].

Il P137 RNA, RNA virale non codificante in grado di prevenire la morte di neuroni dopaminergici, è stato complessato con RVG-9R per il potenziale trattamento del morbo di Parkinson. Dopo somministrazione endovenosa in ratti, il coniugato ha conferito azioni di prevenzione del danno dopaminergico nigrostriatale, permettendo al cargo RNA di superare la BEE e raggiungere il SNC [Kuan *et al.*, 2012].

L'azione di trasporto sito-specifico del pDNA in cellule neuronali da parte di RVG-9R è stata dimostrata misurando l'efficienza di trasfezione del complesso pDNA/RVG-9R in linee cellulari esprimenti il AchR (Neuro2a) o non esprimenti (HeLa), prendendo il GFP come gene *reporter* [Gong *et al.*, 2012]. I risultati hanno stabilito che RVG-9R trasporta il pDNA (pGL3) esclusivamente nelle cellule Neuro2a ma non in quelle HeLa con, in aggiunta, una maggiore utilità rispetto ad un comune agente di trasfezione. Per provare *in vivo* l'utilizzo e l'efficacia del sistema, il complesso pGL3/RVG-9R (contenente 50 µg di DNA) è stato testato in topi per somministrazione parenterale e dopo 24, 48, 72 e 120 h, è stata valutata l'espressione della luciferasi in vari tessuti [Gong *et al.*, 2012]. L'espressione genica più elevata è stata ritrovata nel tessuto cerebrale dopo 72 ore dalla somministrazione, con un incremento di circa 3 volte rispetto al gruppo di controllo (plasmidi pGL3 liberi). Al contrario, l'espressione della luciferasi non ha mostrato nessun cambiamento in altri tessuti (fegato, cuore, reni, muscoli) suggerendo come la somministrazione periferica di pDNA/RVG-9R porti al raggiungimento mirato del cervello [Gong *et al.*, 2012].

I sistemi di veicolazione impieganti RVG29 come ligando per il *targeting* cerebrale sono stati oggetto di un maggior numero di studi rispetto ai complessi non formulati, come di seguito riportato.

Liposomi cationici nanoparticellari contenenti siRNA sono stati funzionalizzati con RVG-9R per avere complessi siRNA-liposoma-peptide (LSPC), preparati incubando dapprima liposomi cationici con il siRNA e quindi con il peptide RVG-9R. I liposomi hanno garantito la protezione dell'oligonucleotide dalla degradazione sierica e RVG-9R il raggiungimento selettivo del SNC grazie all'abbondante espressione di $\alpha 7$ nAChR nell'endotelio cerebrale. È stata inoltre confermata, per mezzo di studi *in vitro* ed *in vivo*, la capacità nel trattare infezioni prioniche previo utilizzo del LSPC veicolante siRNA per la proteina prionica (PrP): è stata quindi osservata una riduzione dell'infezione prionica in cellule N2a e NCerP precedentemente infette da prioni. Il silenziamento genico cerebrale è stato provato tramite

iniezione endovenosa in topi FBV. L'espressione nelle cellule cerebrali della proteina prionica cellulare (PrP^c) è stata ridotta di circa il 75% nei topi trattati con LPSC [Pulford *et al.*, 2010].

NP a base di Pluronic e coniugate con RVG29 sono state studiate per il trasporto cerebrale di un farmaco modello proteico. La coniugazione è stata fatta mediante il gruppo tiolico del RVG29-Cys ed il gruppo maleimmidico del MAL dei *nanocarrier* (MAL-PEG_NC) [Kim *et al.*, 2013]. Il cervello è stato raggiunto dopo somministrazione endovenosa in topo nudo e l'attività biologica del farmaco è stata mantenuta. Gli autori hanno suggerito quindi l'utilizzo dei *nanocarrier* sviluppati come mezzo diagnostico e/o terapeutico nei disordini cerebrali [Kim *et al.*, 2013].

Dendrimeri di poliammidoimina (PMAM) sono stati concepiti come *carrier* per materiale genico destinato a patologie cerebrali. Con questo scopo, PMAM sono stati funzionalizzati con RVG29 con PEG come *spacer* bifunzionale ottenendo PAMAM-PEG-RVG29 successivamente complessato con DNA per avere NP di PAMAM-PEG-RVG29/DNA [Liu *et al.*, 2009]. Attraverso studi di *imaging in vivo* gli autori hanno dimostrato l'accumulo delle NP nel cervello con specificità nei confronti delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali (BCEC); dopo internalizzazione nelle BCEC, consentono un aumento dell'espressione genica rispetto a NP di PAMAM/DNA [Liu *et al.*, 2009].

Hwang *et al.* (2011) hanno studiato il ruolo di RVG29 nel promuovere il trasporto cerebrale di microRNA neurogenico (miR-124a) mediante NP modificate. Gli autori hanno dapprima mostrato come ottimizzando il polimero polietilenimina (PEI), attraverso l'introduzione di un legame a ponte zolfo (eSeSe) e l'ottenimento di SSPEI, si migliori la biocompatibilità e la biodegradazione polimerica per merito dell'azione di enzimi endogeni come la glutatione reduttasi. Per funzionalizzazione con il peptide RVG, hanno utilizzato SSPEI come *carrier* per il trasporto cerebrale di miRNA. Come risultato, i *nanocarrier* RVG-SSPEI, rispetto a quelli privi di peptide, hanno incrementato la concentrazione cerebrale di miR-124a, ulteriormente accresciuta con la co-somministrazione di soluzioni di mannitolo [Hwang *et al.*, 2011]. Gli stessi autori hanno sviluppato in aggiunta NP bioriducibili del co-polimero PEG-PEI covalentemente legate con RVG29, destinate alla veicolazione genica al cervello. I polimeri bioriducibili sono dei *carrier* ideali per il trasporto genico grazie alla presenza del ponte zolfo che viene scisso dalla glutatione reduttasi nel citosol cellulare. La degradazione porta al rilascio del materiale genico contenuto nella struttura polimerica. È stata chiaramente dimostrata la capacità del ligando RVG, associato al vettore PEG-PEI, di raggiungere con specificità la BEE e di attraversarla per trasporto mediato da recettore: il peptide coniugato con le NP di PEG-PEI ha portato ad un selettivo trasporto del

pDNA nel cervello di topo. L'*up-take* cellulare nelle linee Neuro2a è stato garantito dalla presenza dei recettori $\alpha 7$ nAChR, l'espressione dei quali nell'endotelio cerebrale giustifica anche il passaggio al cervello nei modelli *in vivo* [Son *et al.*, 2011].

Recentemente il ruolo del RVG29 come vettore per il *targeting* cerebrale di siRNA è stato oggetto di ulteriori indagini. Il peptide è stato covalentemente legato a complessi siRNA/chitosano trimetilato (TMC) usando un PEG bifunzionale [Gao *et al.*, 2014]. Dopo somministrazione endovenosa in topo, si è osservato il passaggio della barriera e sito-specificità cerebrale con accumulo dei complessi TMC in questo tessuto [Gao *et al.*, 2014].

Nello studio di un'ideale terapia per il trattamento di infezioni micotiche cerebrali, NP di albumina cariche con itraconazolo (ITZ-NP) sono state funzionalizzate con il vettore cerebrale RVG29. Questo è stato coniugato alle NP attraverso un legame biotina/streptavidina [Chen *et al.*, 2011]. RVG29 ha promosso il passaggio intracellulare (studi di *up-take in vitro*) e ha aumentato la concentrazione cerebrale di ITZ a discapito di ITZ-NP non funzionalizzate [Chen *et al.*, 2011].

RDP è un altro peptide derivato dalla glicoproteina della rabbia con una differente sequenza amminoacidica rispetto a RVG-9R (YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRA-SNGGGGRRRRRRRRR), ma ugualmente fuso con 9 residui di arginina, RDP-9R (KSVRTWNEIIPSKGCLRVGGRCHPHVNGGGRRRRRRRRR). RDP è stato impiegato in strategie non invasive per il trasporto cerebrale di proteine (β -galattosidasi (β -Gal), luciferasi (Luc) e fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF)) aventi diversi punti isoelettrici e pesi molecolari [Fu *et al.*, 2012]. Dopo somministrazione periferica in topo, β -Gal, Luc e BDNF hanno raggiunto il SNC grazie a RDP. Inoltre, i sistemi testati in modelli animali di ictus, hanno mostrato che le azioni di neuroprotezione del BDNF non sono state alterate dalla coniugazione con il vettore. Tuttavia, il coniugato con RDP ha mostrato un'emivita di solo 1 h suggerendo la necessità di opportune strategie di protezione [Fu *et al.*, 2012]. Successivamente è stata testata la capacità di RDP per il passaggio di plasmidi attraverso la BEE. Plasmidi contenenti il gene *reporter* Lac Z (pVAX-Lac Z) e il gene BDNF (pVAX-BDNF) sono stati funzionalizzati con RDP in modo da ottenere i complessi RDP/pVAX-Lac Z e RDP/pVAX-BDNF [Fu *et al.*, 2013]. Dopo aver stabilito la capacità di RDP di complessare i plasmidi e la stabilità in siero dei complessi stessi, RDP/pVAX-Lac Z e RDP/pVAX-BDNF sono stati iniettati per via endovenosa in topo. I risultati hanno indicato che la concentrazione ideale per la formazione del complesso è risultata essere di 4:1 e 2:1 (espressa come rapporto in grammi tra peptide/plasmide) rispettivamente per pVAX-Lac Z e pVAX-BDNF [Fu *et al.*, 2013]; entrambi i complessi si sono mantenuti stabili sino a 8 h nel siero di topo. Dopo somministrazione *in vivo* RDP/pVAX-Lac Z è stato capace di penetrare

nelle cellule neuronali come complesso RDP/DNA e regolare selettivamente nel cervello e non in altri tessuti (reni, fegato, polmoni, cuore e milza) l'espressione del gene β -Gal. Dopo iniezione di RDP/pVAX-BDNF non si è palesata nessuna espressione periferica (fegato e reni) del gene BDNF a discapito di una evidente espressione cerebrale. Inoltre, RDP/pVAX-BDNF si è mostrato efficace nel migliorare alcuni sintomi Parkinsoniani (*rotation behavior*) in modelli animali del morbo, senza causare tossicità riconducibile alla somministrazione sistemica di RDP. È stata pertanto confermata l'attitudine di RDP di agire come vettore plasmidico per il *targeting* cerebrale e la sua capacità di mantenere inalterata l'attività biologica del farmaco trasportato dopo somministrazione periferica [Fu *et al.*, 2013].

Shuttle batterici

Il SNC è una struttura presente in tutti gli organismi, fatto che rende il sito un target ideale per l'azione delle tossine batteriche abili nel riconoscere specifiche strutture ivi presenti.

Le neurotossine agiscono con selettività sulla cellule nervose.

Tossina colerica

Frammento B della tossina colerica (CTB)

Il colera è un'infezione diarroica acuta che può portare a una severa disidratazione. La tossina colerica (CT) è un'enterotossina prodotta dal batterio *Vibrio cholerae*. Si compone di 2 principali subunità: A (2 domini A1 ed A2, attività enzimatica, 240 aa) e B (5 domini di legame, 103 aa). Il dominio A1 è responsabile dell'aumento dei livelli di AMP ciclico per ADP-ribosilazione della proteina G a cui conseguono alterazioni metaboliche. La diarrea ed il vomito, causati da intossicazione da *V. cholerae*, sono dovuti ad uno sbilancio elettrolitico associato ad un efflusso di ioni Cl^- e ridotto influsso di ioni Na^+ , a cui segue elevata perdita di acqua dalle cellule intestinali. La subunità atossica B della tossina colerica presenta il sito di legame per il ganglioside GM1 con il quale interagisce per mezzo delle catene pentassaccaridiche espresse nella sua superficie. GM1 è un glicosfingolipide presente nella superficie dell'endotelio, principalmente negli enterociti e nel sistema nervoso [Vajn *et al.*, 2013].

La subunità B della tossina colerica (CTB) viene attualmente usata in campo scientifico come tracciante del trasporto retrogrado.

Il legame tra la CTB e la saporina (CTB-sap), una proteina di inattivazione ribosomiale, è stato pensato per il raggiungimento selettivo delle cellule produttrici di mielina nel SNC ed esprimenti il ganglioside GM1. CTB-sap ha dimostrato di arrivare con efficienza al SNC ed indurre demielinazione [Ohara *et al.*, 2005].

Dopo somministrazione orale in un modello animale di Alzheimer di topo triplo-transgenico, un agente terapeutico (proteina basica della mielina) è stato in grado di superare la BEE e quella retinica grazie alla coniugazione con CTB, il quale è dotato anche di capacità di attraversamento delle membrane mucosali. Il *carrier* non ha mostrato interferire con le azioni biologiche della proteina [Kohli *et al.*, 2014].

Per potenziare il trasporto del fattore di crescita nervoso (NGF) previa somministrazione nasale, è stato impiegato il coniugato NGF-CTB. Il frammento B colerico legandosi ai recettori GM1 presenti nel nervo olfattivo e nell'epitelio nasale ha permesso il trasporto assonale di NGF ed il suo passaggio al bulbo olfattivo con un meccanismo mediato esclusivamente dal nervo olfattivo. In modelli animali di Parkinson, il coniugato si è mostrato di migliorare le capacità curative di NGF [Zhang *et al.*, 2008].

Frammento DeltaG (DeltaG) del *Vibrio cholerae*

DeltaG (12 kDa) è il frammento biologicamente attivo della proteina (45 kDa) tossinica *zonula occludens* (Zot) prodotta dal *V. cholerae*. Nel piccolo intestino e nel cervello apre temporaneamente le *tight junction* (TJ), ed agendo come *penetration enhancer*, promuove il passaggio delle sostanze. È stato impiegato per migliorare la biodisponibilità orale di farmaci scarsamente biodisponibili caratterizzati da basso assorbimento, elevato metabolismo di primo passaggio e suscettibilità ai sistemi di efflusso (ciclosporina, ritonavir, saquinavir, aciclovir) [Salama *et al.*, 2005].

Menon *et al.* (2005) hanno proposto l'uso di DeltaG per consentire il trasporto di farmaci al SNC. Per sperimentazione *in vivo*, un farmaco modello idrofilico (metotressato) ed uno idrofobico (paclitaxel) con bassa distribuzione cerebrale, sono stati co-somministrati con DeltaG in presenza di un inibitore delle proteasi: è stato evidenziato un aumento della loro concentrazione nel sito cerebrale [Menon *et al.*, 2005].

Tossina difterica

Cross-Reacting Material 197 (CRM197)

È una proteina mutante atossica ottenuta dalla tossina difterica del *Corynebacterium diphtheriae*. Si lega al recettore della tossina difterica (DTR) e dopo il legame, viene internalizzato per transitosi *caveolae*-mediata [Wang *et al.*, 2010]. Il recettore della tossina è conosciuto anche come il fattore di crescita epidermico legante l'eparina (HB-EGF), del quale elevati livelli sono espressi in alcune patologie centrali quali gliomi, ictus ed epilessia. I suoi substrati vengono internalizzati tramite un meccanismo endocitotico non coinvolto nel trasporto di nutrienti essenziali al cervello. Il CRM197 ha la capacità di trasportare e favorire

l'internalizzazione di grosse molecole o cargo come proteine e liposomi. Per queste sue caratteristiche Gaillard *et al.* (2005) ne hanno suggerito l'utilizzo per il *targeting* selettivo e sicuro del cervello. CRM197 è stato usato come *carrier* diretto al DTR. Dopo fusione con una proteina modello di 40 kDa (perossidasi di rafano) gli autori hanno dimostrato il target specifico e l'ingresso del vettore nel cervello. Lavori successivi hanno impiegato CRM197 per il trasporto cerebrale di principi attivi. NP polimeriche di polibutilcianoacrilato (PBCA) funzionalizzate con CRM197 hanno consentito l'attraversamento del farmaco cargo zidovudina in modelli di BEE riprodotti *in vitro* [Kuo *et al.*, 2012]. NP di PEG-PEI/siRNA funzionalizzate con CRM197 ed impieganti il siRNA per il fattore di crescita pleiotrofica (PTNsiRNA), sono state progettate per la terapia dei glioblastomi. Dopo somministrazione intraperitoneale in modelli animali della patologia, è stata documentata l'efficacia terapeutica delle formulazioni CRM197-PEG-PEI/siRNA rispetto ai poliplessi PEG-PEI/siRNA; i composti privi di CRM197 si sono mostrati incapaci di attività antitumorale, evidenziando l'importanza del ligando batterico nel trasporto del farmaco al sito di interesse [Höbel *et al.*, 2011].

Tossine clostridiche

Il *Clostridium botulinum* ed il *Clostridium tetani* producono tossine molto potenti, rispettivamente la tossina tetanica (TeNT) e la tossina botulinica (BoNT). Le tossine clostridiche sono delle metallo-proteasi che agiscono sui terminali nervosi e ne inibiscono i processi esocitotici [Popoff *et al.*, 2010]. La BoNT agisce sui terminali dei motoneuroni mentre la TeNT raggiunge inizialmente i nervi periferici e quindi il SNC per trasporto retrogrado lungo gli assoni.

L'azione specifica sulle cellule nervose giustifica l'uso delle tossine clostridiche nello studio di sistemi di trasporto per neuro-farmaci. In quest'ambito, l'applicazione clinica della TeNT è limitata per il fatto che la maggior parte della popolazione è vaccinata per il *C. tetani* [Singh *et al.*, 2010]. La sua catena pesante atossica è stata comunque usata per il trasporto ai neuroni cerebrali di farmaci e ligandi [Bizzini *et al.*, 1980; Francis *et al.*, 1995]. È stato generalmente affermato che la BoNT agisce sul sistema nervoso periferico, in realtà sono state portate alla luce evidenze di come la neurotossina botulinica A (BoNT/A) sia capace di agire direttamente sul SNC [Mazzocchio and Caleo, 2014]. Il meccanismo rimane tuttavia da chiarire. Le teorie più accreditate ipotizzano un riarrangiamento plastico centrale o un'alterazione dell'input sensoriale; l'attraversamento diretto della barriera sembra essere improbabile a causa dell'elevato peso molecolare del composto [Caleo and Schiavo, 2009].

Neurotossina botulinica (*Clostridium botulinum*)

La BoNT è una proteina formata dal legame a ponte zolfo tra una catena leggera (LC, 50 kDa) ed una catena pesante (HC, 100 kDa) [Singh, 2000]. Agisce sulle giunzioni periferiche neuromuscolari (NMJ), dove blocca il rilascio di Ach provocando il sintomo più caratteristico dell'intossicazione da botulino: la paralisi flaccida. Sono stati identificati 7 sierotipi di BoNT (A-G), tutti con una struttura ed un meccanismo d'azione simili [Li and Singh, 1999]. LC ed HC hanno diverse azioni: HC promuove il legame della neurotossina e la traslocazione della LC. Quest'ultima, con il suo dominio metallo-proteasico, è responsabile della tossicità della neurotossina. La HC della BoNT funziona come un vettore per la LC. È quindi possibile rimuovere la LC ed usare la HC per il trasporto al SNC di molecole farmacologicamente attive. Il frammento neuro-affine della BoNT possiede molteplici caratteristiche che lo rendono un attraente sistema per la veicolazione di farmaci: elevata specificità per cellule neuronali ed elevata affinità recettoriale seguita da internalizzazione nei terminali nervosi. Di fatto, la HC della BoNT contiene un dominio di traslocazione che può permettere il trasporto nel citosol di principi attivi e macromolecole eludendo la captazione da parte delle vescicole endocitotiche. Inoltre, poichè ciascun sierotipo si lega con un differente *pool* recettoriale, le diverse BoNT offrono l'opportunità di avere specifici e selettivi *marker* neuronali.

BoNT chimeriche atossiche, per il loro legame neuroselettivo, sono state impiegate come strumento per il trasporto proteico localizzato [Bade *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009; Band *et al.*, 2010]. Zhang *et al.* (2009) hanno impiegato la HC della BoNT con lo scopo di ricercare un trattamento per l'intossicazione da botulino. Il destrano (10-kDa), molecola modello per inibitori della tossina, è stato legato con una HC atossica ricombinante (rHC) della BoNT/A, ed è stato così sintetizzato un sistema di trasporto per il farmaco (DDV) destinato ai terminali nervosi pre-sinaptici intossicati. Nel DDV, la BoNT/A è stata usata per puntare esclusivamente alle cellule nervose sensibili al botulino e promuovere l'internalizzazione del sistema. In colture cellulari primarie di midollo spinale, è stato studiato il meccanismo di *uptake* del DDV. In aggiunta, per stimare l'idoneità del sistema come *carrier*, è stato valutato se la modalità di rilascio della molecola trasportata fosse simile a quella definita dalla dissociazione tra la LC e la HC della BoNT/A. I risultati hanno mostrato che il DDV è stato internalizzato per endocitosi mediata dal recettore della BoNT/A seguita da intrappolamento endosomico del frammento rHC e rilascio del farmaco nel citosol, in entità correlabile al grado di maturazione cellulare; la scissione dal vettore è stata del 20±3%, 32±5% e 40±5% in cellule in crescita da 1, 2 e 3 settimane. Il fatto che rHC sia rimasto confinato negli endosomi ha confermato di essere privo di azioni intossicanti. D'altra parte, poiché il

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

farmaco non è stato intrappolato nei lisosomi, dove verrebbe distrutto, ma rilasciato nel citosol, ha assicurato la sua libertà di azione. DDV è stato concepito per il trattamento dell'intossicazione da botulino, ma gli autori ne hanno suggerito l'impiego anche come strumento per il trattamento sito-specifico con neuro-farmaci.

La neurotossina botulinica D (BoNT/D) *full-length*, contenente un dominio di legame e di traslocazione, ma proteoliticamente inattiva, è stata proposta per il rilascio al citoplasma neuronale di proteine modello nella loro forma funzionalmente attiva, attaccando queste con lo spezzone ammino terminale di BoNT/D [Bade *et al.*, 2004].

Band *et al.* (2010) hanno isolato molteplici derivati atossici della BoNT/A aventi lo stesso meccanismo d'azione del frammento originale e perciò possibili *carrier* per il trasporto al citoplasma neuronale di molecole attive. In un lavoro recente, gli stessi autori hanno esplorato i meccanismi di internalizzazione e *trafficking* intracellulare del BoNT/A *ad*, un derivato non tossico del BoNT/A naturale, in cellule primarie neuronali di ippocampo. BoNT/A *ad* ha mostrato di raggiungere selettivamente tali cellule a discapito di quelle gliali [Vazquez-Cintron *et al.*, 2014]. Il suo frammento non tossico LC è stato abile nel raggiungere il citoplasma cellulare confermando così un suo potenziale impiego nell'ambito del trattamento mirato al sistema nervoso.

La BoNT, sottoforma di *Botox*[®] *Package Insert* (2000) e *Myobloc*[™] *Package Insert* (2000), ha già ricevuto l'approvazione della FDA, rendendo più semplice il percorso per l'accettazione di suoi nuovi prodotti.

Tossina tetanica (*Clostridium tetani*)

Nel 1980 è stato ipotizzato per la prima volta l'utilizzo della TeNT come veicolo di farmaci per il trattamento di patologie del SNC [Bizzini *et al.*, 1980]. Questa si lega a diverse cellule del sistema nervoso periferico (neuroni sensoriali, motori ed autonomi) ed alle fibre del SNC, sito raggiunto per trasporto retrogrado.

Il frammento C non tossico della TeNT (TTC), derivato dalla porzione C-terminale della HC della neurotossina, raggiunge le NMJ e penetra nei motoneuroni da dove si muove con un trasporto assonale retrogrado; per le sue azioni può perciò facilitare il trasporto di molecole terapeutiche al SNC [Price *et al.*, 1975; Toivonen *et al.*, 2010].

Per il possibile trattamento delle patologie centrali da accumulo lisosomiale, in cui si osserva deficienza enzimatica, TCC indicato anche come B-IIb, è stato coniugato con un enzima modello (glucosio ossidasi). Il coniugato è stato studiato in termini di capacità di raggiungimento dei motoneuroni del midollo spinale mediante trasporto retrogrado dai terminali nervosi. Dopo somministrazione intramuscolo in topo, tale abilità è stata

confermata con in più la dimostrazione che il sistema non altera l'attività enzimatica del farmaco, avvalorando la scelta del B-IIb come vettore per il SNC [Beaude *et al.*, 1990].

TTC è stato associato anche alla superossido dismutasi umana Cu/Zn e somministrato per via intracerebroventricolare (i.c.v.), al fine di aumentare il trasporto, la biodisponibilità e la concentrazione parenchimale nel SNC di farmaci proteici [Benn *et al.*, 2005]. L'aumento osservato nella biodisponibilità proteica cerebrale, non è stato dovuto ad un superamento della BEE, ma al raggiungimento dei neuroni *target* per mezzo del fluido cerebrospinale. Gli autori hanno impiegato una via di somministrazione invasiva, piuttosto che una periferica, per differenti ragioni: è stato in precedenza dimostrato che, nel cervello di topo, TTC ha un'emivita maggiore dopo somministrazione intraparenchimale e che, in tal maniera, si evitano i problemi dovuti all'immunizzazione per il tatano, effettuata nella maggior parte della popolazione. Infatti, gli anticorpi anti-TTC (prodotti della vaccinazione) possono neutralizzare e rendere inattiva la proteina TTC prima che questa si leghi alle NMJ e, fatto ancor più grave, causare indesiderate risposte immunitarie. Per di più, si sostiene che, dopo somministrazione periferica, TTC interagisce con i terminali delle cellule nervose ma non raggiunge il SNC in concentrazioni sufficientemente elevate poiché non tutti i neuroni cerebrali hanno proiezioni al di fuori della BEE [Benn *et al.*, 2005].

Valorizzando la capacità del TTC di muoversi per trasporto assonale dai motoneuroni della NMJ sino ai motoneuroni del midollo spinale e del tronco encefalico, il frammento C è stato pensato anche per il trattamento di patologie neuromuscolari come la SLA o il Parkinson. Per quanto concerne l'ultimo esempio, TTC è stato legato al fattore neurotrofico derivato dalle cellule gliali (GDNF) ed iniettato intramuscolo in topo; come risultato, si è ottenuto un accumulo del farmaco nei motoneuroni ed azioni di neuroprotezione [Larsen *et al.*, 2006].

In vitro, la coniugazione tra cardiotrofina-1 con il TTC ha incrementato la vitalità cellulare di motoneuroni spinali e neuroni cerebrali. La cardiotrofina-1 è un fattore neurotrofico dei motoneuroni con possibili applicazioni in patologie causate da loro disfunzioni; tuttavia la sua applicazione viene limitata dagli effetti collaterali sul cuore e fegato. TTC, grazie alle sue azioni sito-specifiche, permette alla cardiotrofina di subire *up-take* selettivo da parte dei motoneuroni e dei neuroni cerebrali, senza interazione con cellule gliali, epatociti e cardiomiociti evitando così l'insorgenza di effetti collaterali come perdita di peso e ipertrofia cardiaca [Bordet *et al.*, 2001].

Altri studi hanno impiegato il TTC fuso con la proteina antiapoptotica Bel-xcL [Carlton *et al.*, 2008] o con il fattore di crescita insulino-simile (IGF1) [Payne *et al.*, 2006] oppure ancora con il BDNF [Roux *et al.*, 2006]. In tutti i casi, si è avuta un'internalizzazione specifica ed un trasporto neuronale retrogrado senza alterazione delle proprietà biologiche

delle molecole trasportate. Tenendo conto di tutte queste osservazioni, il TTC si potrebbe considerare di utile impiego per il trattamento di disordini centrali. Sfortunatamente, la sua applicazione rimane ancora limitata a causa dell'elevata percentuale di soggetti umani vaccinati per il tetano [Toivonen *et al.*, 2010].

Tossina epsilon (*Clostridium perfringens*)

Clostridium perfringens è un batterio anaerobico Gram-positivo di forma bastoncellare e sporigeno. È un normale ospite dell'intestino umano ed animale, ma una sua intossicazione può manifestarsi dopo ingestione di cibo contaminato con elevate concentrazioni del batterio, a cui si deve la produzione di tossine attive all'interno dell'intestino [<http://www.cdc.gov/foodsafety/clostridium-perfringens.html>]. Viene categorizzato in 5 diversi ceppi (A-E), e quelli B e D producono una delle più potenti tossine batteriche: la tossina epsilon (ETX).

Elevate concentrazioni di ETX si possono formare nell'intestino dei ruminanti: l'ingestione di elevate quantità di amido aumenta la concentrazione di questi batteri saccarolitici sintetizzanti grosse quantità di prototossina inattiva, resa attiva per scissione proteolitica di piccoli peptidi ad opera della tripsina e della chimotripsina [www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epsilon_toxin_clostridium.pdf]. La tossina, mediante apertura delle TJ, passa alla circolazione sistemica e raggiunge vari organi, incluso il cervello. ETX non viene definita in senso stretto una neurotossina perché agisce su diversi tipi cellulari, ma è comunque capace di attraversare la BEE ed accumularsi nel cervello con elevata affinità (range nM) [Nagahama *et al.*, 1992]. Dopo aver passato la barriera, stimola il rilascio del glutammato che è responsabile dei fenomeni di eccitotossicità osservati negli animali colpiti da enterotossinemia (iperestesia, convulsioni, opistotono, perdita di coscienza, edema cerebrale e dipsnea).

ETX aumenta la permeabilità dei capillari cerebrali. Si lega ad un recettore non ancora identificato sia nei vasi cerebrali che nelle regioni del cervello mielinizzate [Bokori-Brown *et al.*, 2011; Rumah *et al.*, 2013]; successivamente si integra alla membrana plasmatica formando un poro eptamerico. ETX passa la BEE e si concentra nel cervello in modo specifico. L'enterotossina causa danno endoteliale dovuto a perdita dell'albumina endogena che conduce ad osmolisi ed aumento della permeabilità di barriera. Il danno neuronale si caratterizza per progressiva vacuolizzazione citoplasmatica accompagnata da necrosi [Popoff *et al.*, 2010].

La somministrazione, in modello animale di ratto, del precursore della ETX (ETXp) ha mostrato di aumentare la permeabilità della BEE in modo reversibile [Zhu *et al.*,

2001;Hirschberg *et al.*, 2009]. ETXp, veicolante la bleomicina, è stato somministrato per via intraperitoneale nel trattamento di gliomi. L'internalizzazione fotochimica (PCI) è stata scelta nel potenziamento della permeabilità della BEE solo in prossimità del sito esposto alla luce per prevenire azioni estese della prototossina. La bleomicina ha mostrato di raggiungere il sito d'azione grazie all'apertura temporanea e localizzata della barriera; tuttavia, l'applicazione agli umani risulta limitata dalla tossicità del ETXp [Hirschberg *et al.*, 2009].

Di recente, la tossina è stata considerata come un fattore responsabile dell'insorgenza della sclerosi multipla che si caratterizza da permeabilità della BEE e demielinizzazione [Rumah *et al.*, 2013].

Shuttle animali

Candossina (CDX)

La candossina appartiene alle tossine *three-finger* ed è ottenuta dal veleno del serpente *Bungarus candidus*. Consiste di una singola catena polipeptidica di 66 aa con 5 ponti zolfo. Negli esperimenti elettrofisiologici si è mostrata in grado di promuovere un blocco dei $\alpha 7$ nAChR e, perciò, Nirthanan *et al.* (2002,2003) ne hanno consigliato l'utilizzo come *marker* biologico per i recettori $\alpha 7$.

Micelle cariche con paclitaxel (39 nm) costituite dal co-polimero PEG-PLA sono state funzionalizzate con un peptide di 16 aa derivato dal *loop* II della neurotossina CDX [Zhan *et al.*, 2011]. Il peptide ha mostrato di legarsi ai $\alpha 7$ nAChR abbondantemente espressi nell'endotelio cerebrale. In presenza di CDX le micelle hanno dato prova di raggiungere il cervello, a differenza di quelle prive di ligando, e di non alterare l'azione farmacologica del paclitaxel. Più tardi, lo stesso sistema è stato utilizzato al fine di ottenere un potenziamento dell'azione antitumorale mediante la co-somministrazione con NP di RGD-PEG-PEI/pORF-hTRAIL (ligando inducente l'apoptosi, collegato al fattore di necrosi tumorale) [Zhan *et al.*, 2012]. Anche RGD è infatti un vettore sito-specifico cerebrale. È un peptide ciclico che lega i recettori $\alpha_v\beta_3$, sovraespressi nella neovascolatura tumorale. La coniugazione di RGD e CDX, nei loro rispettivi sistemi, ha permesso di trasportare il gene TRIAL ed il paclitaxel nelle cellule di glioblastoma e garantire un effetto antitumorale sinergico.

Tossina B del *Ophiophagus hannah*

La tossina B è contenuta nel veleno del serpente *Ophiophagus hannah*, il serpente velenoso più lungo al mondo. Si compone di 73 aa e contiene 5 ponti zolfo. Nella struttura tridimensionale della tossina B a livello della testa globulare emergono 3 *loop* a forcina, uniti insieme da 4 ponti zolfo. Tra i 3 *loop*, quelli I e III sono i più corti. Il *loop* II (centrale),

compreso tra i residui 19-43, è il più lungo ed ha la più larga struttura terziaria tra tutte le neurotossine. Nelle neurotossine, sia a breve che a lunga sequenza amminoacidica, molti residui dell'estremità del *loop* II sono altamente conservati o solo conservativamente sostituiti. Il *loop* II ha un importante ruolo nella tossicità delle tossine lunghe [Peng *et al.*, 1997].

La tossina B del veleno dell'*Ophiophagus hannah* appartiene alle neurotossine *three-finger* di serpente nelle quali i segmenti del *loop* II sono responsabili dell'interazione con nAChR. Vista l'abbondanza di questa classe recettoriale nel SNC e nella BEE, essa rientra nella categoria delle neurotossine.

KC2S è un peptide sintetico derivato dalla tossina B del *O. hannah*. Micelle di KC2S-PEG-PLA, caricate con il farmaco paclitaxel, sono state formulate per assemblaggio della neurotossina con il materiale co-polimerico veicolante l'agente antitumorale. I *carrier*, somministrati per e.v., sono stati capaci di azioni biologiche in seguito al superamento della barriera dovuto all'interazione con i recettori nicotinici [Zhan *et al.*, 2010].

Polilisina-molossina

È un peptide sintetico bifunzionale di 31 aa di derivazione dal veleno del *Crotalus molossus molossus*. È provvisto di 2 domini principali di cui uno avente una sequenza di 15 aa con al C-terminale un dominio di legame per l'integrina, ed uno costituito da una catena di 16 residui di lisina all'estremità N-terminale per il legame con il DNA [Collins *et al.*, 2000;2003]. Collins *et al.* (2000) hanno dimostrato come questo peptide sia in grado di legarsi in modo estensivo e con forza nel SNC di ratto; nel 2003 gli stessi autori hanno usato il peptide come vettore per il trasporto di materiale genico in colture neuronali primarie. Per lo studio dell'efficienza di trasfezione nella citata linea cellulare, il *carrier* veicolante il materiale genico è stato adoperato in combinazione con un inibitore endocitotico (clorochina) o con un peptide sintetico fusogenico del virus dell'influenza (emoagglutinina) oppure ancora con un agente lipidico di trasfezione (Lipofectamina 2000). Il peptide anche se in grado di veicolare il materiale genico mantenendone inalterate le azioni, ha mostrato di raggiungere altri tessuti e cellule oltre al SNC, mancando quindi di sito-specificità per le sedi centrali.

Clorotossina (CITX)

Originariamente identificata nel veleno dello scorpione giallo *Leiurus quinquestriatus hebraeusis* è attualmente disponibile nella forma ricombinante prodotta da *E. coli*. È un peptide di 4 kDa e 36 aa. Ha come target le MMP-2 (metallo proteasi di matrice di tipo 2) ed

i canali ionici al cloro sovraespressi nei gliomi e tumori di origine neuroectodermica [DeBin and Strichartz, 1991;Deshane *et al.*, 2003;Veiseh *et al.*, 2007]. È tossica per gli invertebrati ma non per i mammiferi, ed è capace di superare la BEE. È stata dapprima studiata con scopi diagnostici come *marker* di cellule gliali maligne, ma successivamente indicata anche per il trattamento di glioblastomi previo utilizzo in sistemi di veicolazione. È capace di distinguere cellule tumorali gliali piuttosto che cellule normali [Soroceanu *et al.*, 1998;Lyons *et al.*, 2002]. Per queste ragioni è stata ampiamente indagata per il trattamento e la diagnosi di tumori con questa origine.

Le sue piccole dimensioni la rendono un mezzo ideale per il trasporto intracraniale e la sua struttura compatta le conferisce capacità di passaggio della BEE.

È stata stilata una *review* [Fu *et al.*, 2012] su sistemi nanoparticellari coniugati alla CITX riguardante tutti i lavori in cui viene messa in risalto la sua efficienza per l'ottenimento di una terapia mirata verso i gliomi. NP rivestite con CITX-Cy5.5 e NP-DNA-CITX sono alcuni esempi di sistemi nanometrici capaci di arrivare selettivamente ai tumori cerebrali *in vivo* e NP-PEI-siRNA-CITX hanno mostrato una simile attitudine in esperimenti *in vitro*.

Liposomi (100 nm) carichi di doxorubicina e funzionalizzati con CITX sono stati proposti ancora una volta per la diagnosi e/o il trattamento di glioblastomi. CITX ha facilitato l'*up-take* dei liposomi da parte di 3 linee cellulari di glioma ed 1 di endotelio, dimostrando in queste che la sua presenza aumenta la citotossicità. *In vivo* ha consentito un accumulo del farmaco in tumori subcutanei ed intracraniali [Xiang *et al.*, 2011]. Tali preparazioni liposomiali sono state proposte anche per il trasporto di farmaci destinati alla terapia del Parkinson. Infatti, in prove *in vitro*, utilizzando come farmaco la levodopa, questa ha subito un maggiore *up-take* da parte dei capillari dell'endotelio cerebrale [Xiang *et al.*, 2012].

Altri progetti hanno mostrato il ruolo centrale della CITX nel *targeting* del glioblastoma. Dopo somministrazione e.v., liposomi (180 nm) incapsulanti siRNA o miRNA e covalentemente accoppiati con CITX, si sono localizzati in tumori intracraniali [Costa *et al.*, 2013]. *Nanoprobe* resi sito-specifici con CITX hanno mostrato ugualmente di raggiungere tumori cerebrali in modelli di topo geneticamente ingegnerizzati [Veiseh *et al.*, 2009].

TM-601 è una versione sintetica della CITX che grazie alla sue comprovate capacità di fungere da spezzone per il *targeting* cerebrale, è entrato nel 2006 a far parte di *trial* clinici (fase I). L'obiettivo è stato quello di stimare se, marcato con ¹³¹I, fosse un utile strumento diagnostico nella visualizzazione radiografica eseguita per identificare tumori solidi primari con un evidente coinvolgimento metastatico [clinicaltrials.gov/show/NCT00379132].

Apamina e melittina (*Apis mellifera*)

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

L'apamina è un polipeptide (18 aa) altamente neurotossico presente nel veleno dell'ape apitossina secreto dall'*Apis mellifera*. I sintomi da intossicazione si manifestano principalmente con convulsioni e paralisi respiratoria. Inibisce i canali del K^+ Ca^{2+} -dipendenti [Hugues *et al.*, 1982] espressi in vari tipi cellulari tra cui quelli del SNC, miociti intestinali, cellule endoteliali ed epatociti.

Oller-Salvia e collaboratori (2013) hanno di recente documentato la capacità dell'apamina e del suo analogo atossico (ApOO) di passare in modelli di BEE. Gli autori hanno escluso il transito della sostanza per semplice diffusione (PAMPA test) e hanno ipotizzato un meccanismo di trasporto attivo con esclusione di fenomeni di transitosi per adsorbimento, a causa della debole carica dei 2 peptidi al pH fisiologico. È stato piuttosto suggerito un passaggio cellulare specifico vista l'incapacità dei peptidi di passare attraverso i comuni modelli cellulari Caco-2. Grazie alla resistenza di apamina ed ApOO a differenti pH, temperature ed all'azione di proteasi sieriche, così come per il coefficiente di permeazione simile a quello di altri *shuttle* peptidici, ne è stato proposto l'impiego come *carrier* per il trasporto al SNC. Tuttavia, non viene menzionata la natura del cargo in grado di essere trasportato e neanche il meccanismo con il quale il fenomeno avverrebbe.

Attualmente, nonostante il grande potenziale, in letteratura non è riportato l'uso di ApOO in *shuttle*, probabilmente per la recente espolarzione nell'ambito del SNC.

Il 40-50% del veleno essiccato dell'*Apis mellifera* è costituito da melittina, un peptide di 26 aa con azione emolitica riconducibile alla formazione di pori nel doppio strato lipidico delle membrane cellulari con un conseguente aumento della permeabilità [Gómara *et al.*, 2003].

Per il trasporto di materiale genico al cervello, sono stati proposti poliplessi ottenuti incubando DNA plasmidico con co-polimeri funzionalizzati con melittina (pHgMelbHK10) [Schellinger *et al.*, 2013]. I poliplessi pHgMelbHK10 sono stati ottenuti da uno spezzone HPMA (N-(2-idrossipropil) metacrilammide) destinato alla coniugazione con la melittina e da un altro spezzone chiamato PDSMA (piridil disulfide metacrilammide) destinato al legame con il DNA. In studi *in vitro* (cellule PC12) di trasporto genico, i poliplessi veicolanti il gene *reporter* luciferasi, aventi un rapporto di carica polimero/DNA (N/P) uguale a 3 e contenenti il 5-15% di pHgMelbHK10, hanno aumentato l'attività luciferasica in entità circa doppia rispetto al controllo trattato con i poliplessi di solo pHK10, non funzionalizzati con melittina. Gli autori hanno indicato definiti rapporti tra le cariche polimero/DNA (N/P) ed una definita percentuale di funzionalizzazione in quanto un aumento nella concentrazione della melittina nei poliplessi non ha portato ad un incremento dell'efficienza di trasfezione, ma piuttosto a citotossicità. Co-polimeri pHK10/pHgMelbHK10 al 15% e pHgMelbHK10

formulati con N/P=3 veicolanti il plasmide della luciferasi, sono stati inoltre iniettati nel ventricolo destro laterale di topo. È stato notato un aumento significativo ($p < 0,02$) nell'attività della luciferasi sia per pHK10/pHgMelbHK10 15% (5 volte maggiore) che per pHgMelbHK10 (35 volte maggiore) rispetto al solo pHK10. Nonostante il sistema venga proposto per il trasporto di materiale genico al cervello, è stata documentata la mancanza di specificità per le cellule neuronali, poiché non è stato infatti in grado di distinguere tra cellule HeLa e PC12; ha mostrato inoltre azioni citotossiche in relazione al contenuto in melittina. L'osservato raggiungimento del sito cerebrale è stato reso possibile dalla somministrazione invasiva intraventricolare. Di conseguenza, anche se gli autori hanno proposto il poliplesso per il trasporto di materiale genico al cervello, questo dovrebbe venire indagato in termini di selettività e tossicità *in vivo*, in quanto i dati a riguardo non sono sufficienti. Come era stato originariamente segnalato dagli autori, l'uso della melittina si dovrebbe basare più sulla sua azione di fuga endosomiale piuttosto che per il direccionamento mirato di un farmaco.

Conclusioni e prospettive future

Nonostante la natura sintetizzata di molte neurotossine, la ricerca volta al loro impiego nei sistemi di veicolazione per neuro-farmaci procede molto a rilento. In letteratura non sono presenti esempi sull'uso di neurotossine di origine vegetale malgrado che numerose piante ne siano produttrici. Alcuni esempi di piante neurotossiche sono *Mandragora officinalis*, *Datura stramonium*, *Conium maculatum*, *Coriaria myrtifolia*, *Ricinus communis*, *Podophyllum peltatum*, *Blighia sapida*, *Cycas circinalis*, *Lathyrus sativus*. Non vi è alcuna evidenza anche a riguardo dell'uso di neurotossine provenienti da funghi come la fumonisin B₁ (*Fusarium moniliforme*), slaframmine e le swainsonine (*Rhizoctonia leguminicola*) o il lolitrem (*Acremonium lolii*).

Il vasto mondo delle neurotossine così come la loro scelta come *shuttle* nei sistemi di veicolazione rimane un campo in cui vi è ancora molto da esplorare. L'uso dei veleni ed analogamente delle neurotossine, è spesso indagato con un interesse terapeutico piuttosto che di trasporto sito-specifico. La ricerca scientifica sul *targeting* cerebrale di farmaci non è molto attiva rispetto ad altri settori ed il cammino da percorrere per raggiungere importanti traguardi in questo campo è ancora lungo. A riguardo dovrebbe venire indirizzato un maggiore interesse, specialmente considerata l'incidenza crescente di neuro-patologie. Per queste ragioni, sarebbero opportuni maggiori sforzi volti alla comprensione del meccanismo d'azione di molte neurotossine già conosciute, nonché alla ricerca di nuovi frammenti atossici dotati di elevata affinità per il SNC. Il lavoro si è posto l'obiettivo di stimolare l'indagine nei confronti di metodi non invasivi in modo da facilitare e validare l'uso di neuro-

farmaci. Infatti, la ricerca condotta sinora con l'uso di neurotossine microbiche e animali ha fornito incoraggianti risultati sia in sperimentazione *in vitro* che *in vivo*.

I meccanismi già presenti in natura possono anche in questo settore favorire il progresso della ricerca scientifica ed aiutarla a saltare grossi ostacoli come la barriera emato-encefalica.

Bibliografia

- Alam MI, Beg S, Samad A, Baboota S, Kohli K, Ali J, Ahuja A, Akbar M. Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2010 ;40(5):385-403.
- Bade S, Rummel A, Reisinger C, Karnath T, Ahnert-Hilger G, Bigalke H, Binz T. Botulinum neurotoxin type D enables cytosolic delivery of enzymatically active cargo proteins to neurones via unfolded translocation intermediates. *J Neurochem.* 2004;91:1461-72.
- Band PA, Blais S, Neubert TA, Cardozo TJ, Ichtchenko K. Recombinant derivatives of botulinum neurotoxin A engineered for trafficking studies and neuronal delivery. *Protein Expres Purif.* 2010;71:62-73.
- Beaude P, Delacour A, Bizzini B, Domuado D, Remy MH. Retrograde axonal transport of an exogenous enzyme covalently linked to B-IIb fragment of tetanus toxin. *Biochem J.* 1990;271:87-91.
- Benn SC, Ay I, Bastia E, Chian RJ, Celia SA, Pepinsky RB, Fishman PS, Brown RH Jr, Francis JW. Tetanus toxin fragment C fusion facilitates protein delivery to CNS neurons from cerebrospinal fluid in mice. *J Neurochem.* 2005;95:1118-31.
- Bizzini B, Grob P, Glicksman MA, Akert K. Use of the B-IIb tetanus toxin derived fragment as a specific neuropharmacological transport agent. *Brain Res.* 1980;193(1):221-7.
- Bizzini B, Stoeckel K, Schwab M. An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides, and retrograde axonal transport in various neuron systems. *J Neurochem.* 1977;28:529-42.
- Bokori-Brown M, Savva CG, Fernandes da Costa SP, Naylor CE, Basak AK, Titball RW. Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J.* 2011;278:4589-601.
- Bordet T, Castelnau-Ptakhine L, Fauchereau F, Friocourt G, Kahn A, Haase G. Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. *Mol Cell Neurosci.* 2001;17:842-54.
- Bradbury M, Begley D, Kreuter J. *The Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS.* New York: Marcel Dekker 2000.
- Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.* 1969;40(3):648-77.
- Caleo M, Schiavo G. Central effects of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon.* 2009;54:593-99.

Carlton E, Teng Q, Federici T, Yang J, Riley J, Boulis NM. Fusion of the tetanus toxin C fragment binding domain and Bcl-xL for protection of peripheral nerve neurons. *Neurosurgery*. 2008;63:1175-82.

Centers for diseases control and prevention. *Clostridium perfringens*. Available at (<http://www.cdc.gov/foodsafety/clostridium-perfringens.html>).

Chaddock JA, Purkiss JR, Friis LM, Broadbridge JD, Duggan MJ, Fooks SJ, Shone CC, Quinn CP, Foster KA. Inhibition of vesicular secretion in both neuronal and non-neuronal cells by a retargeted endopeptidase derivative of *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Infect Immun*. 2000;68:2587-93.

Chen W, Zhan C, Gu B, Meng Q, Wang H, Lu W, Hou H. Targeted brain delivery of itraconazole via RVG29 anchored nanoparticles. *J Drug Target*. 2011;19(3):228-34.

Collins L, Asuni AA, Anderton BH, Fabre JW. Efficient gene delivery to primary neuron cultures using a synthetic peptide vector system. *J Neurosci Methods*. 2003;125(1-2):113-20.

Collins L, Gustafsson K, Fabre JW. Tissue binding properties of a synthetic peptide DNA vector targeted to cell membrane integrins: a possible universal non-viral vector for organ and tissue transplantation. *Transplantation*. 2000;69:1041-50.

Costa PM, Cardoso AL, Mendonça LS, Serani A, Custódia C, Conceição M, Simões S, Moreira JN, Pereira de Almeida L, Pedrosa de Lima MC. Tumor-targeted chlorotoxin-coupled nanoparticles for nucleic acid delivery to glioblastoma cells: a promising system for glioblastoma treatment. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013; 2, e100. Consultabile al: (<http://www.nature.com/mtna/journal/v2/n6/full/mtna201330a.html>).

Dalpiaz A, Gavini E, Colombo G, Russo P, Bortolotti F, Ferraro L, Tanganelli S, Scatturin A, Menegatti E, Giunchedi P. Brain uptake of an antiischemic agent by nasal administration of microparticles. *J Pharm Sci*. 2008;97(11):4889-903.

DeBin JA, Strichartz GR. Chloride channel inhibition by the venom of the scorpion *Leiurus quinquestriatus*. *Toxicon*. 1991;29(11):1403-8.

Deshane J, Garner CC, Sontheimer H. Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2. *J Biol Chem*. 2003;278:4135-44.

Doolittle ND, Miner ME, Hall WA, Siegal T, Jerome E, Osztie E, McAllister LD, Bubalo JS, Kraemer DF, Fortin D, Nixon R, Muldoon LL, Neuwelt EA. Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer*. 2000;88:637-47.

Epsilon Toxin of *Clostridium perfringens*. [Updated 2004 Gen]. Consultabile al: (www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/epsilon_toxin_clostridium.pdf).

Falanga A, Tarallo R, Galdiero E, Cantisani M, Galdiero M, Galdiero S. Review of a viral peptide nanosystem for intracellular delivery. *J Nanophoton* 2013 Jan 16; 7(1). Consultabile al: (<http://nanophotonics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?articleid=1558169>).

Fazil M, Md S, Haque S, Kumar M, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47(1):6-15.

Francis JW, Hosler BA, Brown RH Jr, Fishman PS. CuZn superoxide dismutase (SOD-1): tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells. *J Biol Chem*. 1995;270(25):15434-42.

Fu A, Wang Y, Zhan L, Zhou R. Targeted delivery of proteins into the central nervous system mediated by rabies virus glycoprotein-derived peptide. *Pharm Res*. 2012;29(6):1562-9.

Fu A, Zhang M, Gao F, Xu X, Chen Z. A novel peptide delivers plasmids across blood-brain barrier into neuronal cells as a single-component transfer vector. *PLoS ONE*. 2013. Consultabile al: (<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0059642>).

Fu Y, An N, Li K, Zheng Y, Liang A. Chlorotoxin-conjugated nanoparticles as potential glioma-targeted drugs. *J Neurooncol*. 2012;107:457-62.

Gaillard PJ, Brinka A, de Boer AG. Diphtheria toxin receptor-targeted brain drug delivery. *International Congress Series*. 2005:185-98.

Gao Y, Wang ZY, Zhang J, Zhang Y, Huo H, Wang T, Jiang T, Wang S. RVG-peptide-linked trimethylated chitosan for delivery of siRNA to the brain. *Biomacromolecules*. 2014;15:1010-8.

Gavini E, Rassa G, Ferraro L, Generosi A, Rau JV, Brunetti A, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of chitosan glutamate on the in vivo intranasal absorption of rokitamycin from microspheres. *J Pharm Sci*. 2011;100(4):1488-502.

Gavini E, Rassa G, Ferraro L, Beggiano S, Alhalaweh A, Velaga S, Marchetti N, Bandiera P, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of polymeric microcarriers on the in vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;83(2):174-83.

Gómara MJ, S Nirb, Nieva JL. Effects of sphingomyelin on melittin pore formation. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1612(1):83-9.

Gong C, Li X, Xu L, Zhang YH. Target delivery of a gene into the brain using the RVG29-oligoarginine peptide. *Biomaterials*. 2012;33:345-63.

Guarnieri D, Falanga A, Muscetti O, Tarallo R, Fusco S, Galdiero M, Galdiero S, Netti PA. Shuttle-mediated nanoparticle delivery to the blood–brain barrier. *Small*. 2013;9:853-62.

Hirschberg H, Zhang MJ, H Gach M, Uzal FA, Peng Q, Sun CH, Chighvinadze D, Madsen SJ. Targeted delivery of bleomycin to the brain using photo-chemical internalization of *Clostridium perfringens* epsilon prototoxin. *J Neurooncol*. 2009;95:317-29.

Höbel S, Appeldoorn CCM, Gaillard PJ, Aigner A. Targeted CRM197-PEG-PEI/siRNA complexes for therapeutic RNAi in glioblastoma. *Pharmaceuticals*. 2011;4:1591-606.

Huang Q, Deng J, Xie Z, Wang F, Chen S, Lei B, Liao P, Huang N, Wang Z, Wang Z, Cheng Y. Effective gene transfer into central nervous system following ultrasound-microbubbles-induced opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med Biol*. 2012;38(7):1234-43.

Hugues M, Romey G, Duval D, Vincent JP, Lazdunski M. Apamin as a selective blocker of the calcium-dependent potassium channel in neuroblastoma cells: voltage-clamp and biochemical characterization of the toxin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982;79(4):1308-12.

Hwang do W, Son S, Jang J, Youn H, Lee S, Lee D, Lee YS, Jeong JM, Kim WJ, Lee DS. A brain-targeted rabies virus glycoprotein-disulfide linked PEI nanocarrier for delivery of neurogenic microRNA. *Biomaterials*. 2011;32:4968-75.

Jose S, Ansa CR, Cinu TA, Chacko AJ, Aleykutty NA, Ferreira SV, Souto EB. Thermo-sensitive gels containing lorazepam microspheres for intranasal brain targeting. *Int J Pharm*. 2013;441(1-2):516-26.

Khrestchatsky M, Tokay A. Nervous system diseases: an ever-increasing cost for society. *Pharmaphorum* 2014 Jan 7. Consultabile al: (www.pharmaphorum.com/articles/nervous-system-diseases-an-ever-increasing-cost-for-society).

Kim JY1, Choi WI, Kim YH, Tae G. Brain-targeted delivery of protein using chitosan- and RVG peptide-conjugated, pluronic-based nano-carrier. *Biomaterials*. 2013;34:1170-8.

Klingen Y, Conzelmann K, Finke S. Double-labeled rabies virus: live tracking of enveloped virus transport. *J Virol*. 2008;237-45.

Kohli N, Westerveld DR, Ayache AC, Verma A, Shil P, Prasad T, Zhu P, Chan SL, Li Q, Daniell H. Oral delivery of bioencapsulated proteins across blood-brain and retinal barriers. *Mol Ther*. 2014;22(3):535-46.

Kuan WL, Poole E, Fletcher M, Karniely S, Tyers P, Wills M, Barker RA, Sinclair JH. A novel neuroprotective therapy for Parkinson's disease using a viral noncoding RNA that protects mitochondrial complex I activity. *J Exp Med*. 2012;209(1):1-10.

Kumar M, Pandey RS, Patra KC, Jain SK, Soni ML, Dangi JS, Madan J. Evaluation of neuropeptide loaded trimethyl chitosan nanoparticles for nose to brain delivery. *Int J Biol Macromol.* 2013;61:189-95.

Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature.* 2007;448:39-43.

Kuo YC, Chung CY. Transcytosis of CRM197-grafted polybutylcyanoacrylate nanoparticles for delivering zidovudine across human brain-microvascular endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;91:242-49.

Larsen KE, Benn SC, Ay I, Chian RJ, Celia SA, Remington MP, Bejarano M, Liu M, Ross J, Carmillo P, Sah D, Phillips KA, Sulzer D, Pepinsky RB, Fishman PS, Brown RH Jr, Francis JW. A glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): tetanus toxin fragment C protein conjugate improves delivery of GDNF to spinal cord motoneurons in mice. *Brain Res.* 2006;1120:1-12.

Li L, Singh BR. Structure-function relationship of clostridial neurotoxins. *J Toxicol Toxin Rev.* 1999;8:95-112.

Liu Y, Huang R, Han L, Ke W, Shao K, Ye L, Lou J, Jiang C. Brain-targeting gene delivery and cellular internalization mechanisms for modified rabies virus glycoprotein RVG29 nanoparticles. *Biomaterials.* 2009;30:4195-202.

Lyons SA, O'Neal J, Sontheimer H. Chlorotoxin, a Scorpion-Derived Peptide, Specifically Binds to Glioma and Tumors of Neuroectodermal Origin. *Glia.* 2002;39(2):162-73.

Mazzocchio R, Caleo M. More than at the neuromuscular synapse: actions of botulinum neurotoxin a in the central nervous system. *Neuroscientist* 2014 Feb 26. Consultabile al: (<http://nro.sagepub.com/content/early/2014/02/26/1073858414524633>).

Menon D, Karyekar CS, Fasano A, Lu R, Eddington ND. Enhancement of brain distribution of anticancer agents using DeltaG, the 12 kDa active fragment of ZOT. *Int J Pharm.* 2005;306(1-2):122-31.

Nagahama M, Sakurai J. High-affinity binding of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin to rat brain. *Infect Immun.* 1992;60:1237-40.

NCT00379132. 131-I-TM-601 Study in adults with solid tumors. Consultabile al: (clinicaltrials.gov/show/NCT00379132).

Nirthanan S, Charpantier E, Gopalakrishnakone P, Gwee MC, Khoo HE, Cheah LS, Bertrand D, Kini RM. Codoxin, a Novel Toxin from *Bungarus candidus*, is a Reversible Antagonist of Muscle ($\alpha\beta\gamma\delta$) but a Poorly Reversible Antagonist of Neuronal $\alpha7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *J Biol Chem.* 2002;277,17811-20.

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

Nirathanan S, Charpantier E, Gopalakrishnakone P, Gwee MC, Khoo HE, Cheah LS, Kini RM, Bertrand D. Neuromuscular effects of candoxin, a novel toxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Br J Pharmacol.* 2003;139:832-44.

Ohara PT, Kelley K, Jasmin L. B fragment of cholera toxin conjugated to saporin. *Molecular Neurosurgery with Targeted Toxins.* In: Wiley RG, Lappi DA. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2005:293-306.

Oller-Salvia B, Teixidó M, Giralt E. From venoms to BBB shuttles: Synthesis and blood–brain barrier transport assessment of apamin and a nontoxic analog. *Biopolymers.* 2013;100:675-86.

Pardridge WM. Blood–brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Mol Interv.* 2003;3(2):90-105,51.

Pardridge WM. Molecular Trojan horses for blood-brain barrier drug delivery. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(5):494-500.

Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* 2005;2(1):3-14.

Payne AM, Zheng Z, Messi ML, Milligan CE, González E, Delbono O. Motor neuron targeting of IGF-1 prevents specific force decline in ageing mouse muscle. *J Physiol.* 2006;570:283-94.

Peng SS, Kumar KTS, Jayaraman G, et al. Solution structure of toxin b, a long neurotoxin from the venom of the King Cobra (*Ophiophagus Hannah*). *J Biol Chem.* 1997;272(12):7817-23.

Pires A, Fortuna A, Alves G, Falcão A. Intranasal Drug Delivery: How, Why and What for? *J Pharm Pharm Sci.* 2009;12(3):288-311.

Plank C, Zelphati O, Mykhaylyk O. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-Progress and prospects. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63:1300-31.

Popoff M, Bernard Poulain B. Bacterial toxins and the nervous system: neurotoxins and multipotential toxins interacting with neuronal cells. *Toxins.* 2010;2:683-737.

Price DL, Griffin J, Young A, Peck K, Stocks A. Tetanus toxin: direct evidence for retrograde intraaxonal transport. *Science.* 1975;188:945-7.

Prokai L, Prokai-Tatrai K. Peptide transport and delivery into the central nervous system. 1st ed. Basel: Birkhäuser Verlag: 2003.

Pulford B, Reim N, Veatch J, Forster G, Bender H, Meyerett C, Hafeman S, Michel B, Johnson T, Wyckoff AC, Miele G, Julius G, Kranich J, Schenkel A, Dow S, Zabel MD. Liposome-siRNA-peptide complexes cross the blood-brain barrier and significantly decrease

PrP on neuronal cells and PrP in infected cell cultures. PLoS One 2010;5(6). Consultabile al: (<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0011085>).

Roux S, Saint Clément C, Curie T, Girard E, Mena FJ, Barbier J, Osta R, Molgó J, Brûlet P. Brain-derived neurotrophic factor facilitates in vivo internalization of tetanus neurotoxin C-terminal fragment fusion proteins in mature mouse motor nerve terminals. Eur J Neurosci. 2006;24:1546-54.

Rumah KR, Linden J, Fischetti VA et al. Isolation of *Clostridium perfringens* type b in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. PLoS ONE 2013; 8(10): e76359. Consultabile al: (<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0076359>).

Rupprecht CE. Rhabdoviruses: Rabies Virus. Medical Microbiology. 4th ed. Baron S: Galveston (TX): 1996. Consultabile al: (www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618).

Salama NN, Fasano A, Thakar M, Eddington ND. The impact of ΔG on the oral bioavailability of low bioavailable therapeutic agents. J Pharmacol Exp Ther. 2005;312:199-205.

Schellinger JG1, Pahang JA, Johnson RN, Chu DS, Sellers DL, Maris DO, Convertine AJ, Stayton PS, Horner PJ, Pun SH. Melittin-grafted HEMA-oligolysine based copolymers for gene delivery. Biomaterials. 2013;34(9):2318-26.

Singh BR, Thirunavukkarasu N, Ghosal K, Ravichandran E, Kukreja R, Cai S, Zhang P, Ray R, Ray P. Clostridial neurotoxins as a drug delivery vehicle targeting nervous system. Biochimie. 2010;92:1252-9.

Singh BR. Intimate details of the most poisonous poison. Nature Struct Biol. 2000;7:617-9.

Smaldone G, Falanga A, Capasso D, Guarnieri D, Correale S, Galdiero M, Netti PA, Zollo M, Galdiero S, Di Gaetano S, Pedone E. gH625 is a viral derived peptide for effective delivery of intrinsically disordered proteins. Int J Nanomedicine. 2013;8:2555-65.

Son S, Hwang do W, Singha K, Jeong JH, Park TG, Lee DS, Kim WJ. RVG peptide tethered bioreducible polyethylenimine for gene delivery to brain. J Control Release. 2011;155:18-25.

Soroceanu L, Gillespie Y, Khazaeli MB, Sontheimer H. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. Cancer Res. 1998;58:4871-9.

Steiner I, Kennedy PGE, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. Lancet Neurol. 2007;6(11):1015-28.

Tipton KF, Dajas F. Neurotoxins in neurobiology. Ellis Horwood Series in Neuroscience: Chichester 1994.

Tiwari SB, Amiji MM. A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* 2006;3:219-32.

Toivonen JM, Oliván S, Osta R. Tetanus toxin C-fragment: the courier and the cure? *Toxins.* 2010;2:2622-44.

Vajn K, Viljetić B, Degmečić IV, Schnaar RL, Heffer M. Differential distribution of major brain gangliosides in the adult mouse central nervous system. *PLoS ONE* 2013; 8(9). Consultabile al: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0075720>).

Vazquez-Cintron EJ, Vakulenko M, Band PA, Stanker LH, Johnson EA, Ichtchenko K. Atoxic derivative of botulinum neurotoxin A as a prototype molecular vehicle for targeted delivery to the neuronal cytoplasm. *Plos-One* 2014; 9(1). Consultabile al: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0085517>).

Weiseh M, Gabikian P, Bahrami SB, Weiseh O, Zhang M, Hackman RC, Ravanpay AC, Stroud MR, Kusuma Y, Hansen SJ, Kwok D, Munoz NM, Sze RW, Grady WM, Greenberg NM, Ellenbogen RG, Olson JM. Tumor paint: a chlorotoxin: Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci. *Cancer Res.* 2007;67(14):6882-8.

Weiseh O, Sun C, Fang C, Bhattarai N, Gunn J, Kievit F, Du K, Pullar B, Lee D, Ellenbogen RG, Olson J, Zhang M. Specific Targeting of Brain Tumors with an Optical/Magnetic Resonance Imaging Nanoprobe across the Blood-Brain Barrier. *Cancer Res.* 2009;69(15):6200-7.

Wang P, Xue Y, Shang X, Liu Y. Diphtheria toxin mutant CRM197-mediated transcytosis across blood-brain barrier in vitro. *Cell Mol Neurobiol.* 2010;30:717-25.

Witt KA, Slate CA, Egleton RD, Huber JD, Yamamura HI, Hruby VJ, Davis TP. Assessment of stereoselectivity of trimethylphenylalanine analogues of delta-opioid [D-Pen(2),D-Pen(5)]-enkephalin. *J Neurochem.* 2000;75:424-35.

Xiang Y, Liang L, Wang X, Wang J, Zhang X, Zhang Q. Chloride channel-mediated brain glioma targeting of chlorotoxin-modified doxorubicine-loaded liposomes. *J Control Release.* 2011;152:402-10.

Xiang Y, Wu Q, Liang L, Wang X, Wang J, Zhang X, Pu X, Zhang Q. Chlorotoxin-modified stealth liposomes encapsulating levodopa for the targeting delivery against Parkinson's disease in the MPTP-induced mice model. *J Drug Target.* 2012;20(1):67-75.

Zhan C, Li B, Hu L, Wei X, Feng L, Fu W, Lu W. Micelle-Based Brain-Targeted Drug Delivery Enabled by a Nicotine Acetylcholine Receptor Ligand. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2011;50(24):5482-5.

Zhan C, Wei X, Qian J, Feng L, Zhu J, Lu W. Co-delivery of TRAIL gene enhances the anti-glioblastoma effect of paclitaxel in vitro and in vivo. *J Control Release*. 2012;160:630-6.

Zhan C, Yan Z, Xie C, Lu W. Loop 2 of Ophiophagus hannah toxin b binds with neuronal nicotinic acetylcholine receptors and enhances intracranial drug delivery. *Mol Pharm*. 2010;7(6):1940-7.

Zhang P, Ray R, Singh BR, Li D, Adler M, Ray P. An efficient drug delivery vehicle for botulism countermeasure. *BMC Pharmacol*. 2009;9-12.

Zhang Q, Liu Y, Yang N, Wan X, Zuo P. Nasal administration of cholera toxin B subunit-nerve growth factor improves the space learning and memory abilities in β -amyloid protein25-35-induced amnesic mice. *Neuroscience*. 2008;155:234-40.

Zhu C, Ghabriel MN, Blumbergs PC, Reilly PL, Manavis J, Youssef J, Hatami S, Finnie JW. Clostridium perfringens prototoxin-induced alteration of endothelial barrier antigen (EBA) immunoreactivity at the blood-brain barrier (BBB) *Exp Neurol*. 2001;169:72-82.

Tabella**Tabella 1.** Neurotossine di origine virale come vettori in sistemi di trasporto per il *targeting* al SNC.

Specie	Vettore	Target	Sistema di trasporto sito-specifico	Farmaco	Sito-selettività dimostrata	Rif.
<i>Herpes virus simplex</i>	gH-625	Membrana cellulare	NP-gH625	-	Si, <i>in vitro</i>	Guarnieri <i>et al.</i> , 2013
<i>Rabies virus</i>	RVG	$\alpha 7$ nAchR	Complessi RVG-9R/oligonucleotide	siRNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Kumar <i>et al.</i> , 2007
			Complessi RVG-9R/oligonucleotide	P137 RNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Kuan <i>et al.</i> , 2012
			Complessi RVG-9R/gene	pDNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Gong <i>et al.</i> , 2012
			Liposomi LSPC	siRNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Pulford <i>et al.</i> , 2010
			Coniugati Pluronic NP- RVG29	β -galattosidasi	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Kim <i>et al.</i> , 2013
			NP PAMAM-PEG-RVG29	pDNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Liu <i>et al.</i> , 2009
			Dendrimeri SSPEI-RVG29	miRNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Hwang <i>et al.</i> , 2011
			NP BPEI-SS-PEG-RVG29	pDNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Son <i>et al.</i> , 2011
			Complesso RVG29-PEG-TMC-	siRNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Gao <i>et al.</i> , 2014
	NP-RVG29	ITZ	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Chen <i>et al.</i> , 2011		
RDP			Coniugati RDP-9R-peptidi	β -Gal, Luc, BDNF	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Fu <i>et al.</i> , 2012
			Complesso RDP/plasmidi	Lac Z, BDNF	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Fu <i>et al.</i> , 2013

ITZ: itraconazolo; LSPC: complessi siRNA-liposomi-peptide; NP: nanoparticelle; TMC: chitosano trimetilato.

Tabella 2. Neurotossine di origine batterica come vettori in sistemi di trasporto per il *targeting* al SNC.

Specie	Vettore	Target	Sistema di trasporto sito-specifico	Farmaco	Azioni	Rif.
<i>Vibrio Cholerae</i>	CTB	Ganglioside GM1	Coniugati-CTB	saporina	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Ohara et al., 2005
			Coniugati-CTB	Proteina basica della mielina	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Kohli et al., 2014
			Coniugati-CTB	NGF	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Zhang et al., 2008
<i>Corynebacterium diphtheria</i>	DeltaG	TJ	Co-somministrazioni e con farmaci	Metotressato, paclitaxel	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Menon et al., 2005
	CRM197	DTR	Coniugati-CRM197	perossidasi di rafano	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Gaillard et al., 2005
			NP CRM197-PBCA	zidovudina	Si <i>in vitro</i>	Kuo et al., 2012
<i>Clostridium botulinum</i>	BoNT-A	Cellule presinaptiche colinergiche NMJ	Coniugati-BoNT/A	10-kDa destrano	Si <i>in vitro</i>	Zhang et al., 2009
			BoNT/A		Si <i>in vitro</i>	Vazquez-Cintron et al., 2014
<i>Clostridium tetani</i>	BoNT/D	Motoneuroni NMJ	Coniugati-BoNT/D	diidrofolato reductasi, luciferasi	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Bade et al., 2004
			TTC	Coniugati-TTC	glucosio ossidasi	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	ETXp	BEE: target molecolare sconosciuto	Coniugati-TTC	superossido dismutase umana Cu/Zn	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Benn et al., 2005
			Coniugati-TTC	GDNF	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Larsen et al., 2006
			Coniugati-TTC	Cardiotrofina-1	Si <i>in vitro</i>	Bordet et al., 2001
			Coniugati-TTC	Bcl-xcL, IGF1, BDNF	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Carlton et al., 2008; Payne et al., 2006; Roux et al., 2006
<i>Clostridium perfringens</i>	ETXp	BEE: target molecolare sconosciuto	Coniugati-ETXp	bleomicina	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Hirschberg et al., 2009

DTR: recettore tossina difterica; NMJ: giunzioni neuro-muscolari; NP: nanoparticelle; TJ: *tight junctions*.

Tabella 3. Neurotossine di origine animale come vettori in sistemi di trasporto per il *targeting* al SNC.

Specie	Vettore	Target	Sistema di trasporto sito-specifico	Farmaco	Azioni	Rif.
<i>Bungarus candidus</i> snake	CDX	nAChR	Micelle PEG-PLA-CDX	paclitaxel	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Zhan <i>et al.</i> , 2011
			Micelle PEG-PLA-CDX e NP RGD-PEG-PEI/pORF-hTRAIL	paclitaxel, TRAIL	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Zhan <i>et al.</i> , 2012
<i>Ophiophagus Hannah</i>	KC2S		Micelle KC2S-PEG-PLA	paclitaxel	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Zhan <i>et al.</i> , 2010
<i>Crotalus molossus molossus</i>	Polilisina-molossin	Sconosciuto	Complessi polilisina-molossina/oligonucleotide	DNA	Si <i>in vitro</i> . No <i>in vivo</i>	Collins <i>et al.</i> , 2003
<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	CITX	MMP-2, canali ionici al Cl	CITX-NP	DNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Fu <i>et al.</i> , 2012
			CITX-liposomi	doxorubicina	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Xiang <i>et al.</i> , 2011
			CITX-liposomi	levodopa	Si <i>in vitro</i>	Xiang <i>et al.</i> , 2012
			CITX-liposomi	miRNA, siRNA	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i> .	Costa <i>et al.</i> , 2013
			CITX-NP	ossido di ferro supermagnetico Cy5.5	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i>	Veiseh <i>et al.</i> , 2009
<i>Apis mellifera</i>	TM-601		131-I_TM-601	131-I	Si <i>in vitro</i> ed <i>in vivo</i> (trial clinici, fase I)	clinicaltrials.gov
	ApOO	Canali K ⁺ -Ca ²⁺ dipendenti	ApOO	-	Si <i>in vitro</i>	Gómara <i>et al.</i> , 2003
	Melittina	Membrana lipidica	Poliplessi pHgMelbHK10/gene	pDNA	Si <i>in vitro</i> No <i>in vivo</i>	Schellinger <i>et al.</i> , 2013

NP: nanoparticelle.

Figure

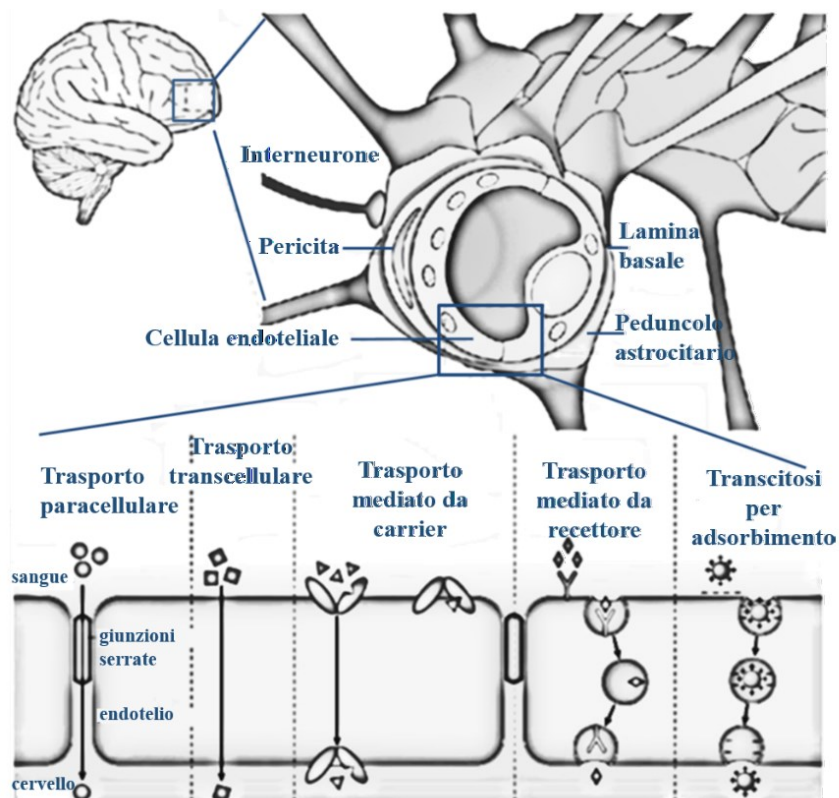


Figura 1. Rappresentazione schematica della BEE ed i principali sistemi di trasporto presenti.

Capitolo II

Polveri Farmaceutiche a Base di Chitosano per la Veicolazione di Farmaci
mediante Strategia *Nose-to-Brain*

Powder formulations based on chitosan for nose-to-brain delivery of drugs
submitted to The Journal of Drug Delivery Science and Technology

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Abstract

La terapia delle patologie del sistema nervoso centrale è di difficile approccio a causa della difficoltà incontrata da un farmaco nel passare dal torrente ematico al cervello. La somministrazione nasale è in grado di permettere il rapido trasporto di un farmaco dalla mucosa nasale direttamente al sito cerebrale e di minimizzarne l'esposizione sistemica. Il chitosano è uno degli eccipienti più impiegati nello sviluppo di formulazioni nasali grazie alle sue proprietà di mucoadesione e di *penetration enhancer*. Differenti tipologie di formulati (soluzioni, sospensioni, gel, microemulsioni e polveri) a base di chitosano sono stati proposti per il passaggio dal naso al cervello (*nose-to-brain*) di farmaci. Le formulazioni in polvere possono offrire diversi vantaggi rispetto a quelle nello stato liquido, come migliore stabilità, maggiore comodità e prolungato tempo di residenza di un farmaco nella cavità nasale. Questa *review* discute e passa in rassegna i recenti dati riguardanti polveri nasali a base di chitosano, dei suoi sali e derivati per il trasporto di farmaci al cervello. Sono stati inoltre riassunti i farmaci studiati per questa via di somministrazione ed i metodi preparativi delle formulazioni.

Introduzione

L'organizzazione mondiale della sanità (WHO) indica che in Europa i disordini cerebrali sono causa del 35% di tutte le patologie riscontrate [Andlin-Sobocki *et al.*, 2005]. Le principali disfunzioni neurologiche possono essere classificate in neurodegenerative, cerebrovascolari (infettive od autoimmuni) e tumorali, ma tra più dei 7000 farmaci elencati nel *Comprehensive Medicinal Chemistry* (CMC), solo il 5% di questi è destinato a patologie cerebrali, di cui essenzialmente depressione, schizofrenia, dolore cronico ed epilessia [Pardridge, 2005;2007]. Tra i farmaci appartenenti a queste classi, molti necessitano un potenziamento nella capacità di penetrare all'interno del cervello. Più del 98% di principi attivi a basso peso molecolare non raggiunge il sito cerebrale passando dalla circolazione sistemica, ed analogamente accade al 100% dei principi attivi ad elevato peso molecolare [Pardridge, 2005]. Questa scoraggiante situazione è riconducibile a meccanismi di protezione del cervello, il più delicato organo del nostro corpo, da parte di fluidi extracellulari distinti, quali il fluido interstiziale (ISF, il fluido extracellulare del parenchima cerebrale) ed il fluido cerebrospinale (LCS, contenuto nei ventricoli cerebrali e negli spazi subaracnoidei). La regolazione di questi microambienti è assicurata dalla barriera emato-encefalica (BEE) e dalla barriera emato-liquorale (BEL), le quali controllano l'approvvigionamento del cervello dal sangue, selezionando i composti esogeni ed endogeni in entrata ed in uscita da questi siti [Pavan *et al.*, 2008;Engelhardt *et al.*, 2008]. La BEE è principalmente formata da uno strato di cellule endoteliali dei capillari cerebrali (BMEC) caratterizzate dalla presenza di *tight junction* e dall'assenza di fenestrature [Pavan *et al.*, 2008]. La BEL è costituita dalle cellule ependimali del plesso coroideo, coinvolto nella produzione e regolazione del LCS. Le cellule ependimali sono tenute insieme da *tight junction* a livello apicale il che determina una restrizione nel flusso paracellulare [Pavan and Dalpiaz, 2011]. I trasportatori di efflusso attivo (AET) sono importanti componenti in quanto la loro espressione nelle membrane cellulari della BEE e BEL restringe il campo di accesso alle molecole endogene [Pavan and Dalpiaz, 2011].

Il trasporto nasale (i.n.) di farmaci o biomolecole (peptidi, proteine, oligonucleotidi, vettori virali, cellule staminali) diretto al sistema nervoso centrale (SNC) è ancora attualmente un'area di forte interesse, volta a superare i limiti imposti dalla BEE e dalla BEL [Illum, 2000;2002;2003;2004;Vyas *et al.*, 2005;Costantino *et al.*, 2007;Wu *et al.*, 2008;Mistry *et al.*, 2009;Dhuria *et al.*, 2010;Casettari and Illum, 2014]. La somministrazione nasale è un metodo non invasivo per il trasporto rapido di farmaci dalla mucosa nasale direttamente al cervello ed al midollo spinale ed ha lo scopo di trattare patologie del SNC e minimizzare gli effetti sistemici [Dhuria *et al.*, 2010]. Il cervello e la cavità nasale sono connessi tra loro dal

nervo olfattivo e dal trigemino, che si proiettano al neuroepitelio olfattivo o respiratorio. Questi due nervi possono servire come dei punti di accesso esterno al cervello e perciò venir sfruttati nel trasporto diretto *nose-to-brain* di un farmaco, aggirando la BEE [Mistry *et al.*, 2009].

Evidenze suggeriscono che nel trasporto di farmaci al SNC, in seguito al loro assorbimento nella mucosa nasale, siano coinvolti i nervi connessi con il cervello ed il midollo spinale così come i vasi, il fluido cerebrospinale ed il sistema linfatico [Dhuria *et al.*, 2010]. La principale via nel trasporto nasale è quella dettata dal nervo olfattivo: i farmaci si muovono lungo gli assoni di questo, quindi si accumulano nel bulbo olfattivo (BO) e da qui diffondono alle varie aree del cervello [Dhuria *et al.*, 2010]. Tuttavia, nell'epitelio olfattivo si possono presentare tre differenti modalità di trasporto, per via: (a) transcellulare, soprattutto a livello delle cellule sustentacolari, con un meccanismo promosso da endocitosi mediata da recettore, endocitosi in fase fluida, o diffusione passiva (ad eccezione dei peptidi); (b) paracellulare, attraverso le *tight junction* presenti tra le cellule sustentacolari ed i neuroni olfattivi; (c) intracellulare assonale nel nervo olfattivo, in cui il farmaco viene internalizzato nei neuroni mediante endocitosi o pinocitosi per poi migrare al BO [Illum, 2000] (Fig. 1). La via trans-neuronale è molto lenta ed il SNC viene raggiunto anche dopo 24 h dalla somministrazione. Il trasporto attraverso le vie neuronali non può, quindi, spiegare la rapida presenza nel LCS osservata per un certo numero di farmaci a basso peso molecolare [Illum, 2000]. È più probabile che vi sia una combinazione di tutti i processi di trasporto e che uno prevalga a seconda delle proprietà della molecola terapeutica, delle caratteristiche della formulazione e degli eccipienti e del dispositivo di dispensazione usato [Dhuria *et al.*, 2010]. Qualora sia necessario aumentare il trasporto cerebrale di un farmaco utilizzando un sistema di veicolazione, le formulazioni sviluppate dovrebbero essere in grado di localizzarsi nel tessuto olfattivo. Quest'ultimo è situato nella volta della cavità nasale umana tra il setto nasale e la parete laterale delle due cavità nasali, subito al di sotto della lamina cribrosa dell'osso etmoide separante la cavità nasale da quella cranica (Fig. 1). Il tessuto olfattivo ricopre solamente circa il 10% di tutta l'area nasale [Illum, 2003]. Il depositarsi di un formulato nella regione olfattiva può essere promosso dall'utilizzo di un idoneo dispositivo di dispensazione sia nel caso di sistemi liquidi che per polveri. È inoltre evidente che un efficace *up-take* cerebrale è strettamente correlato alla capacità delle formulazioni nasali progettate di garantire un tempo di residenza prolungato e di mantenere elevate concentrazioni locali di farmaco in modo che questo sia in grado di diffondere. Un *penetration enhancer* (promotore dell'assorbimento) viene spesso incluso nelle formulazioni poiché può significativamente aumentare la permeabilità di un farmaco nella mucosa nasale

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

[Wu *et al.*, 2008]. Il chitosano è uno degli eccipienti più adoperati nelle formulazioni nasali grazie alle sue proprietà di mucoadesione e di *penetration enhancer*. Varie formulazioni con chitosano sono state proposte per la veicolazione *nose-to-brain* di un farmaco quali soluzioni [Charlton *et al.*, 2007; Vaka *et al.*, 2009; Manda *et al.*, 2011; Vaka *et al.*, 2011], sospensioni [Bhavna *et al.*, 2014], gel mucoadesivi *in situ* [Khan *et al.*, 2010; Perez *et al.*, 2012], microemulsioni [Dhakar *et al.*, 2011; Bshara *et al.*, 2014] e polveri come nanoparticelle (NP) [Wang *et al.*, 2008; Alam *et al.*, 2012; Fazil *et al.*, 2012; Haque *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013; Malhorta *et al.*, 2013a; Malhorta *et al.*, 2013b; Md *et al.*, 2013; 2014] e microsfele [Dalpiaz *et al.*, 2008; Gavini *et al.*, 2009; 2011; Sun *et al.*, 2012; Gavini *et al.*, 2013; José *et al.*, 2013]. I medicinali formulati in polvere possono offrire diversi vantaggi rispetto a formulati liquidi, tra cui migliore stabilità e possibilità di evitare l'utilizzo di conservanti. Prima che vengano disciolte o rimosse, le polveri tendono ad aderire sulle superfici umide della mucosa nasale. L'utilizzo di eccipienti bioadesivi o agenti che rallentano l'azione mucociliare possono ridurre la *clearance* e migliorare l'assorbimento di un farmaco [Vidgren *et al.*, 1998]. Un certo numero di fattori può influenzare le modalità di deposito ed assorbimento quali sensibilità all'umidità, solubilità, dimensione e forma particellare e scorrevolezza [Vidgren *et al.*, 1998; Djupesland, 2003]. Le polveri asciutte sono quelle meno frequentemente impiegate per i farmaci nasali a causa, soprattutto, della scarsa idoneità dei tradizionali dispositivi nasali [Djupesland, 2003]. Le polveri nasali basate sull'uso di chitosano hanno mostrato di possedere un maggiore tempo di residenza rispetto alle soluzioni [Illum, 1998].

In questa *review* è stata sintetizzata la letteratura più recente riguardante i sistemi di veicolazione per il trasporto di farmaci *nose-to-brain*, basati su formulazioni in polvere impieganti il chitosano, i suoi sali e derivati. Vengono passati in rassegna anche i farmaci studiati per questa via di somministrazione ed i metodi preparativi delle formulazioni.

Farmaci contenuti in formulazioni nasali impieganti chitosano

Un elevato numero di farmaci è stato utilizzato nei formulati nasali caratterizzati dalla presenza di chitosano o suoi sali e derivati impiegati come promotori dell'assorbimento. Questi farmaci possono venire classificati in antibiotici, antivirali, antinocicettivi, antiemicrania, antiepilettici ed ansiolitici o come agenti terapeutici per il morbo di Parkinson e di Alzheimer, per i fenomeni di neurodegenerazione e di ischemia centrale. I farmaci sono generalmente incapaci di raggiungere il cervello passando dal torrente ematico. Alcuni richiedono un maggiore assorbimento nel SNC in modo da produrre rapidamente i loro effetti terapeutici. Il presente paragrafo discute brevemente i principali tipi di farmaci

contenuti in formulazioni nasali a base di chitosano. Nel 2008 sono state proposte le prime formulazioni nasali con chitosano quale promotore dell'assorbimento, con lo scopo di indurre una captazione (*up-take*) cerebrale di agenti neuro-attivi.

Farmaci anti-ischemici. La N⁶-ciclopentiladenosina (CPA) è un potente e selettivo agonista dei recettori A₁ dell'adenosina ed è un farmaco polare dotato di interessanti proprietà anti-ischemiche a livello del SNC. Il CPA è comunque incapace di raggiungere il cervello passando dal sangue. Dopo somministrazione nasale (i.n.) di una sospensione acquosa del farmaco tal quale, sono state ritrovate quantità insignificanti di CPA sia nel sangue che nel SNC. Per il *targeting* cerebrale del CPA sono stati progettati dei sistemi di veicolazione microparticellari; questi sono stati preparati con mannitolo o chitosano e testati *in vivo*. Dopo somministrazione i.n. delle microparticelle, il CPA è stato rinvenuto nel LCS [Dalpiaz *et al.*, 2008], così come descritto nella sezione “Sali del Chitosano”.

Farmaci per l'Alzheimer. La terapia sostitutiva a lungo termine con estrogeni ha mostrato efficacia nella prevenzione e nel trattamento della patologia di Alzheimer. Wang *et al.* (2005) hanno dimostrato che l'estradiolo (E2), in forma di complesso di inclusione in β -ciclodestrine metilate in modo *random*, viene trasportato nel LCS attraverso i neuroni olfattivi. Gli autori hanno preparato nanoparticelle (NP) di chitosano con lo scopo di ridurre la *clearance* mucociliare, aumentare la permeazione di E2 nella mucosa nasale e migliorarne il *targeting* cerebrale [Wang *et al.*, 2008]. La rivastigmina è risaputo essere un inibitore sia dell'acetilcolinesterasi che della butirrilcolinesterasi. Di recente, questo farmaco è stato scelto come agente candidato per il morbo di Alzheimer ed utilizzato in studi di incapsulamento in NP di chitosano in modo da ottenere nuovi formulati in grado di aumentare la biodisponibilità cerebrale della rivastigmina. Nello specifico, è stato dimostrato che, dopo somministrazione i.n., le NP hanno incrementato l'efficienza della rivastigmina nel raggiungere il cervello rispetto ad una sua somministrazione endovenosa (e.v.) [Fazil *et al.*, 2012]. Risultati simili sono stati ottenuti dall'incapsulamento del timochinone in NP di chitosano. Questo farmaco mostra molte qualità farmacologiche tra cui effetti antiossidanti ed antiinfiammatori che possono migliorare i deficit cognitivi e la neurodegenerazione [Alam *et al.*, 2012]. Infine, un altro inibitore enzimatico dell'acetilcolinesterasi, il donepezil, è stato studiato per il suo caricamento in NP di chitosano proposte come un nuovo potenziale sistema di veicolazione nel trattamento dell'Alzheimer [Bhavna *et al.*, 2014].

Farmaci ansiolitici. Il buspirone appartiene alla famiglia degli azapironi, una classe di farmaci impiegata come ansiolitici ed antipsicotici. Nel 2009 sono state studiate soluzioni nasali mucoadesive formulate con chitosano ed idrossipropil- β -ciclodestrina con lo scopo di valutare la capacità nel promuovere l'assorbimento del buspirone sia nel cervello che nel torrente ematico. La somministrazione i.n. delle formulazioni con chitosano ha incrementato il raggiungimento cerebrale del farmaco rispetto alle formulazioni in cui è presente solo il buspirone [Khan *et al.*, 2010]. La venlafaxina è un antidepressivo inibitore del *re-uptake* della serotonina e della noradrenalina. Formulata in soluzione, può raggiungere il cervello dopo somministrazione e.v. ed i.n. [Haque *et al.*, 2012]. Tuttavia, le sue concentrazioni plasmatiche sono spesso causa di effetti indesiderati. Haque *et al.* (2012) hanno perciò preparato NP di chitosano caricate con venlafaxina in modo da aumentare l'*up-take* cerebrale del farmaco previa somministrazione i.n. [Haque *et al.*, 2012], come descritto nella sezione “Sali del Chitosano”.

Farmaci per il Parkinson. Il ropinirolo è un agonista dei recettori dopaminergici D₂ impiegato per il trattamento del Parkinson (PD). Nel 2010 sono state proposte formulazioni a base di chitosano ed idrossipropilmetilcellulosa per aumentare il trasporto nasale al cervello dell'agonista D₂ ropinirolo [Khan *et al.*, 2010]. La bromocriptina è un agonista dopaminergico di vasto impiego clinico usata per annullare o minimizzare le fluttuazioni motorie deleterie dovute al trattamento a lungo termine del PD con levodopa. È noto che questo farmaco protegge le cellule dopaminergiche [Lim *et al.*, 2009]. Pertanto ultimamente è stato indagato il potenziale uso di NP di chitosano come sistema di veicolazione volto ad aumentare il grado di raggiungimento cerebrale della bromocriptina in seguito a somministrazione i.n. [Md *et al.*, 2013;2014] (vedi sezione “Chitosano non Modificato”). La rasagilina è un inibitore delle monoammino ossidasi ed usata sia nelle fasi iniziali che avanzate del PD [Gallagher and Schrag, 2008]. Caricare la rasagilina in NP di chitosano glutammato, ottenute tramite il metodo di gelificazione ionica con anioni tripolifosfati, è risultato essere un metodo efficace per favorire il passaggio del farmaco nel cervello, permettendo un conseguimento concreto del *targeting* diretto *nose-to-brain* nella terapia del PD [Mittal *et al.*,2014].

Farmaci anti-emicrania. Il zolmitriptan è un farmaco approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) per il trattamento di prima linea del dolore da emicrania. Sebbene l'assorbimento dello zolmitriptan sia inizialmente molto rapido dopo somministrazione nasale ed orale, evidenze cliniche hanno indicato che gli spray nasali e le formulazioni orali hanno

simili parametri farmacocinetici, come emivita, biodisponibilità ed effetto terapeutico dello zolmitriptan. D'altro canto, è stato dimostrato da [Dalpiaz et al. \(2012\)](#) che la somministrazione i.n. in ratti è capace di potenziare l'*up-take* centrale dello zolmitriptan, permettendo una riduzione dei livelli periferici del farmaco rispetto alle somministrazioni e.v. Vari formulati microparticellari basati sul chitosano ed i suoi sali sono stati proposti e studiati per aumentare il *targeting* cerebrale dello zolmitriptan per via i.n. Microparticelle essiccate e mucoadesive di chitosano glutammato hanno dimostrato avere la più elevata efficacia nel promuovere l'*up-take* centrale dello zolmitriptan, come descritto nella sezione "Sali del Chitosano" [[Gavini et al., 2013](#); [Alhalaweh et al., 2009;2011](#); [Kaur and Kaur, 2014](#)].

Farmaci anti-neurodegenerativi. È risaputo che un insufficiente apporto di fattori neurotrofici induce degenerazione neuronale. Il fattore neurotrofico derivato dal cervello è uno dei principali fattori neurotrofici capaci di promuovere la sopravvivenza dei neuroni in patologie neurodegenerative. Analogamente, il fattore di crescita nervoso è impiegato nella terapia delle patologie neurodegenerative. Viste le importanti azioni, tali farmaci sono stati impiegati in formulazioni basate su chitosano per aumentare la loro biodisponibilità cerebrale [[Vaka et al., 2009;2012](#)]. L'acido carnosico è un diterpene fenolico che può promuovere la sintesi del fattore di crescita nervoso nelle cellule umane di glioblastoma ed aumentare la produzione del fattore neurotrofico derivato dal cervello nelle linee cellulari neuronali dopaminergiche. È stata studiata la somministrazione i.n. di questi farmaci in presenza di chitosano per aumentare i livelli endogeni delle neurotrofine nel cervello di ratto [[Vaka et al., 2011](#)].

Farmaci antibiotici. La cefotaxima è un antibiotico cefalosporinico (antibiotico di terza generazione beta-lattamico) utilizzato per trattare un'ampia varietà di infezioni batteriche. Nel 2011, è stato proposto uno studio sulla somministrazione nasale della cefotaxima per indurre un *up-take* cerebrale. I risultati di questa indagine hanno evidenziato livelli comparabili di farmaco nel cervello sia dopo somministrazione i.n. che e.v. La presenza del chitosano nelle formulazioni nasali non ha contribuito nel modificare i livelli della cefotaxima nel cervello [[Manda et al., 2011](#)]. È stato recentemente dimostrato da [Gavini et al. \(2011\)](#) che la rokitamicina, farmaco alternativo agli analoghi antibiotici macrolidici, non è capace di superare la BEE e raggiungere il LCS a partire dal torrente ematico. In aggiunta, in ratti, la somministrazione nasale di rokitamicina, incapsulata in microparticelle di chitosano, non ha portato all'assorbimento del farmaco nel torrente circolatorio o nel LCS. In contrasto, la rokitamicina è stata assorbita in questi siti dopo somministrazione nasale di

microparticelle di chitosano glutammato cariche con rokitamicina. Questo indica un differente ruolo come *penetration enhancer* del chitosano se presente in forma pura o come sale. Questi aspetti sono stati descritti nelle sezioni “Chitosano non Modificato” e “Sali del Chitosano”.

Farmaci antinocicettivi. Il milnacipran è un inibitore del *re-uptake* della serotonina-noradrenalina (SNRI) con impiego clinico nel trattamento della fibromialgia. La somministrazione i.n. di milnacipran in ratti, ha portato ad un trasporto diretto del farmaco al SNC e ad un passaggio al circolo ematico. In aggiunta, la co-somministrazione con chitosano per via nasale, ha consentito di incrementare le concentrazioni di principio attivo nel plasma e nel LCS e di ottenere una maggiore azione farmacologica [Uchida *et al.*, 2011]. La leucina-encefalina è un neurotrasmettitore con un grosso potenziale nel controllo del dolore. Essa è stata quindi incapsulata in NP di N-trimetilchitosano e, dopo somministrazione i.n. in topi, è stata dimostrata la capacità della formulazione di indurre l'*up-take* cerebrale della leucina-encefalina [Kumar *et al.*, 2013] (vedi sezione “Derivati del Chitosano”). Tra i farmaci antinocicettivi, la tizanidina cloridrato e la ciclobenzaprina cloridrato sono utilizzate nel trattamento sintomatico del dolore causato da spasmi muscolari. Questi farmaci sono stati incapsulati in NP di chitosano tiolato, permettendo un efficiente *up-take* cerebrale ed un'azione antinocicettiva dopo somministrazione nasale in topi [Patel *et al.*, 2012;2013].

Farmaci antiepilettici. Il lorazepam è un derivato benzodiazepinico impiegato nella terapia dello stato epilettico. Viene preferito rispetto al diazepam poiché è capace di combinare una rapidità d'insorgenza d'azione con una prolungata azione antiepilettica [Cock *et al.*, 2002]. Attualmente il lorazepam è disponibile in formulazioni in compresse ed in forma iniettabile, capaci di rilasciare il farmaco nella circolazione sistemica ma con un limitato *up-take* del farmaco nella BEE. Recentemente sono state preparate microsfele di chitosano caricate con lorazepam e disperse in sospensioni di gel termosensibili di Pluronic destinate ad una somministrazione i.n. Questo tipo di formulazione è stata suggerita per future applicazioni destinate alla consegna nasale sostenuta e protratta di farmaci antiepilettici [José *et al.*, 2013].

Farmaci anti-HIV. È stato presentato di recente [Dalpiaz *et al.*, 2012] un profarmaco ottenuto mediante coniugazione del farmaco antiretrovirale zidovudina (AZT) con acido ursodeossicolico (UDCA). Questo è un potenziale *carrier* nel trasporto della AZT nel SNC, in quanto capace di evitare i trasportatori di efflusso attivo e, probabilmente, aumentare così

l'efficacia della AZT come farmaco anti-HIV. Per ottenere un aumento del *targeting* cerebrale della AZT, sono state proposte delle microparticelle solide lipidiche (SLM) come *carrier* per la somministrazione nasale del profarmaco UDCA-AZT. La somministrazione i.n. in ratti di SLM, basate sull'acido stearico, ha indotto un aumento dell'*up-take* del profarmaco nel LCS, dimostrando la presenza di un percorso diretto tra il naso ed il SNC. Inoltre la presenza del chitosano cloridrato nella formulazione nasale ha aumentato di circa sei volte l'*up-take* del profarmaco nel LCS, confermando che i sali del chitosano sono dei preziosi strumenti in grado di incrementare l'assorbimento cerebrale di farmaci, in seguito ad una somministrazione nasale [Dalpiaz *et al.*, 2014].

Chitosano

Il chitosano (CH) è un polimero naturale biodegradabile con un notevole potenziale nel campo farmaceutico grazie alla sua biocompatibilità, elevata densità di carica, atossicità e mucoadesione [Sinha *et al.*, 2004; Sernkop-Schnürch and Dünnhaupt, 2012]. Il polimero lineare deriva dalla parziale deacetilazione della chitina contenuta nello scheletro dei crostacei, ed è composto da β -(1-4)-D-glucosammina (unità deacetilata) e N-acetil-D-glucosammina (unità acetilata) distribuite casualmente. Il CH può essere ottenuto con un'ampia gamma di pesi molecolari, di gradi di deacetilazione (40-98%) e viscosità. È insolubile in condizioni di pH neutro od alcalino, mentre a valori di pH acidi la protonazione dei gruppi amminici (pKa 6,3) ne aumenta la solubilità [Luppi *et al.*, 2010].

È disponibile un certo numero di sali del CH (ad es. CH cloridrato, glutammato ed ascorbato) [Dalpiaz *et al.*, 2008; Gavini *et al.*, 2009; Maestrelli *et al.*, 2004; Corti *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2008] e di derivati (ad es. N-carbossimetilchitosano, N-trimetilchitosano, metilpirrolidone chitosano e coniugati ammoniacali quaternari del chitosano) [Di Colo *et al.*, 2004; Van der Merwe *et al.*, 2004; Zambito *et al.*, 2006a; 2006b; 2008; Thanou *et al.*, 2000; 2001; Gavini *et al.*, 2008; Rassa *et al.*, 2009] aventi caratteristiche migliori del CH stesso, come solubilità, mucoadesione e capacità di *penetration enhancer* (Fig. 2). Il CH forma interazioni elettrostatiche con la superficie carica negativamente delle cellule epiteliali e riduce così la *clearance* dall'epitelio nasale. Nella cavità nasale, il CH assorbe acqua dallo strato mucoso formando una patina sottile, simile ad un gel, che prolunga il tempo di residenza di un farmaco al sito di assorbimento e ne migliora la biodisponibilità [Sinha *et al.*, 2004]. Il CH è inoltre in grado di aprire reversibilmente le *tight junction*, favorendo così un trasporto extracellulare verso il SNC, passando lungo la via del nervo olfattivo e del trigemino [Dhuria *et al.*, 2010].

Le 3 principali caratteristiche del CH da considerarsi nello sviluppo di un sistema di veicolazione sono: il grado di deacetilazione (DD), il peso molecolare (PM) e la purezza. Poiché la maggior parte delle proprietà biologiche sono correlate con l'aspetto cationico del chitosano, il parametro con maggiore influenza è il DD. In alcuni casi, comunque, il PM ha un ruolo predominante [Aranaz *et al.*, 2009]. Il grado di biodegradazione dipende dalla lunghezza delle catene (PM) [Tomihata and Ikada, 1997; Zhang and Neau, 2001; Huang *et al.*, 2004] ed aumenta con la diminuzione del DD [Hirano *et al.*, 1989; Sashiwa *et al.*, 1991; Kurita *et al.*, 2000]. La tossicità del chitosano è riportata essere in relazione con il DD. Schipper *et al.* (1996) hanno documentato che chitosani con DD maggiore del 35% hanno bassa tossicità, mentre un DD minore del 35% è causa di tossicità dose-dipendente. Al contrario, il PM del CH non influenza la sua tossicità. Diversi studi testimoniano come il CH non sia dannoso alla mucosa nasale quando adoperato nello sviluppo di formulazioni [Candy and Sharma, 1990; Tharanathan and Kittur, 2003; Gavini *et al.*, 2005; Amidi *et al.*, 2006].

Le proprietà di mucoadesione del CH dipendono dalla quantità di acido sialico presente nella mucina, così come dal PM e dal DD del polimero stesso [Aranaz *et al.*, 2009]. È stato trovato che quando aumenta il PM del CH aumenta anche la penetrazione di questo attraverso lo strato di mucina. La mucoadesione perciò diventa più forte [Lehr *et al.*, 1992]. D'altra parte un maggiore DD porta ad un aumento della densità di carica della molecola e le proprietà di adesione diventano più rilevanti [He *et al.*, 1998].

Sia il PM che il DD definiscono le proprietà del chitosano come *penetration enhancer* [Bonferoni *et al.*, 2009]. In generale, un maggiore PM e grado di DD ha mostrato di migliorare la capacità del CH di aprire le *tight junction* [Schipper *et al.*, 1996]. I parametri fondamentali del CH, come il PM ed il DD, in linea generale possono influenzare le dimensioni particellari e la carica di superficie [Tiyaboonchai, 2003]. La [Tab. 1](#) riassume le tipologie di chitosano impiegate nel trasporto *nose-to-brain* di farmaci.

Chitosano non modificato

I dati della letteratura mostrano come il tipo di chitosano maggiormente impiegato nella preparazione di formulati in polvere sia il chitosano non modificato avente diversi PM e DD. Wang *et al.* (2008), nella preparazione di NP hanno utilizzato chitosano con un 95% di DD e con PM di 50 kDa ed hanno ottenuto concentrazioni significativamente più alte di estradiolo nel LCS dopo una somministrazione nasale piuttosto che endovenosa. Il CH con un PM

medio e con un alto DD (96%) è stato impiegato in NP nasali caricate con timochinone. Queste hanno mostrato di essere più efficaci nel *targeting* cerebrale rispetto all'utilizzo di semplici soluzioni endovenose o nasali del farmaco [Alam *et al.*, 2012]. NP di chitosano cariche con rivastigmina (RHT) con CH a PM medio (750 kDa) ed un DD di circa 85%, hanno migliorato la biodisponibilità del farmaco e l'*up-take* di RHT al cervello mediante somministrazione nasale. Le concentrazioni cerebrali raggiunte dopo somministrazione i.n. delle NP sono state significativamente maggiori rispetto a quelle ottenute da una somministrazione e.v. o i.n. di soluzioni di RHT. È stata trovata una maggiore efficienza nel trasporto del farmaco ed un maggiore coinvolgimento del trasporto diretto mediante l'utilizzo di NP di chitosano cariche del farmaco rispetto ad altre formulazioni [Fazil *et al.*, 2012].

Lo stesso tipo di CH è stato usato da Md *et al.* (2013) per valutare la capacità di una soluzione di bromocriptina (BRC) e di NP caricate con bromocriptina di distribuirsi nei siti cerebrali e nel sangue. I risultati degli studi sul *targeting* cerebrale hanno rivelato un elevato *up-take* della BRC, quando presente nelle NP di chitosano, favorito da un meccanismo diretto *nose-to-brain*, con, in aggiunta, un potenziamento dell'effetto antiossidante della bromocriptina successivamente ad una somministrazione i.n. In un altro studio, gli stessi autori hanno riportato come le medesime NP siano state capaci di produrre una maggiore ritenzione nelle narici, rispetto a soluzioni di BRC. NP di chitosano, caricate con BRC e somministrate per via i.n., hanno portato ad una concentrazione significativamente più elevata di dopamina rispetto alla somministrazione di aloperidolo in topi. Nei topi trattati con aloperidolo, nelle loro sezioni istopatologiche cerebrali si è evidenziata una degenerazione selettiva dei neuroni dopaminergici, evento che è stato decisamente invertito dalla somministrazione di NP di chitosano caricate con BRC. Queste NP sono state proposte come *carrier* per il trasporto *nose-to-brain* di farmaci nella terapia del morbo di PD [Md *et al.*, 2014].

Sharma *et al.* (2013) hanno condotto studi *in vivo* su ratti per ricercare la quantità di levodopa nel cervello in seguito a somministrazione i.n. di NP di chitosano caricate con il farmaco (CNL) da sole od incorporate in gel termoreversibili (CNLP gel). Le NP sono state preparate utilizzando CH con un PM medio e un DD del 75-85%. Queste sono state ottimizzate in modo da ottenere le NP di dimensione particellare desiderata. I risultati hanno indicato che la quantità massima del farmaco ritrovata nel cervello dopo somministrazione i.n. di una sospensione delle CNL in salina, era simile a quella ottenuta con la somministrazione del farmaco disperso nel gel semplice. L'uso di gel termoreversibili rende

più semplice la somministrazione nasale, ma diminuisce il grado di migrazione delle NP e la disponibilità di queste sulla superficie nasale assorbente.

Gel termo-sensibili contenenti microsfele sono stati ugualmente sviluppati e caratterizzati per il *targeting* cerebrale mediato dalla via nasale da José *et al.* (2013). Gli autori non hanno riportato nessuna proprietà circa il chitosano adoperato. I risultati hanno mostrato che il grado di rilascio *in vitro* ha seguito un profilo di dispersione prolungata delle microsfele nel mezzo viscoso, in contrasto alle microsfele da sole. La formulazione non ha prodotto alcun effetto tossico sulla struttura microscopica delle mucosa nasale. È da notare che, negli esperimenti *in vivo*, in tutti gli articoli citati precedentemente, le NP sono state sospese in un tampone di soluzione salina prima dell'instillazione nella narice.

Musumeci *et al.* (2014) hanno investigato l'effetto del PM del chitosano sulle dimensioni e sulla carica di superficie di NP. Mantenendo costanti le concentrazioni di chitosano e quelle del *cross-linker*, il CH con PM medio (190-310 kDa; DD 75%-85%) ha portato alla formazione di particelle con una dimensione media maggiore rispetto a quelle ottenute impiegando CH con un più basso PM (50-190 kDa, DD 75%-85%). In aggiunta, è stata indagata l'influenza della carica di superficie e del tipo di polimero sull'*up-take* nel tempo in cellule olfattive di rivestimento (OEC) purificate. Gli autori hanno dimostrato che NP con elevato potenziale zeta, come quelle preparate con chitosano, subivano un minore *up-take*. Le NP sono state proposte come *carrier* per veicolare farmaci destinati ad un trasporto diretto *nose-to-brain*.

Microsfele di CH sono state studiate per il trasporto *nose-to-brain* del metotrexato (MTX). È stato adoperato CH con differenti PM (484,25; 851,5; 854,7 e 852,3 kDa) e DD (92,5; 92,9; 90,1 e 85,5%). Il tipo del chitosano non ha dimostrato avere nessuna influenza sul caricamento del farmaco e sulle dimensioni particellari ed il DD non ha influenzato il grado di rilascio del MTX in tampone fosfato a pH 7,4. Al contrario, solo la formulazione preparata con chitosano con il più basso PM ha portato ad un maggior grado di rilascio del farmaco rispetto a quello ottenuto con gli altri chitosani. Il MTX è stato ritrovato nei tessuti cerebrali dopo somministrazione nasale di una sua soluzione e di microsfele di chitosano caricate con il farmaco. Queste ultime hanno garantito un maggiore trasporto *nose-to-brain* rispetto alla soluzione acquosa di MTX, per somministrazione i.n. Per di più, il chitosano ha dato prova della sua capacità nell'essere un sicuro ed efficace *absorption enhancer* nasale per farmaci scarsamente assorbiti attraverso la via olfattiva, come il MTX [Sun *et al.*, 2012].

Rassu *et al.* (2008) hanno suggerito l'impiego di microsfele di CH caricate con rokitamicina. È stato impiegato CH con PM di 282 kDa e DD del 96%. I risultati hanno mostrato che il caricamento del farmaco nel *network* polimerico ha portato ad un aumento

nel grado di dissoluzione rispetto al farmaco impiegato come tale. Inoltre, la *network* ha migliorato e prolungato *in vitro* l'effetto antiemebrico del farmaco. Microsfere basate sull'impiego di chitosano (PM: 150 kDa; DD>85%), con un rapporto ottimale farmaco/polimero, sono state per di più capaci di aumentare la permeazione dello zolmitriptan sia in studi *in vitro* che *in vivo* [Gavini *et al.*, 2013].

Sali del chitosano

Il sale cloridrato del CH è l'unico ad avere una specifica monografia nella Farmacopea Europea 8,0 e nel USP 34/Formulario Nazionale 29. Dalpiaz *et al.* (2008) hanno preparato e caratterizzato microparticelle progettate per la somministrazione nasale della N⁶-ciclopentiladenosina (CPA) composte da CH cloridrato (PM: 160 kDa; DD: 86%). Negli studi *in vivo*, condotti su ratti, i risultati hanno mostrato che con la somministrazione i.n. delle microparticelle caricate con il farmaco, il CPA veniva rinvenuto sia nel LCS che nel bulbo olfattivo. Inoltre, la comparsa del farmaco nel LCS è stata più rapida e di maggiore entità dopo insufflazione delle formulazioni con CH rispetto ad altre con mannitolo-lecitina. Di fatto, la deposizione nasale delle microparticelle di CH ha contribuito all'*up-take* del farmaco polare CPA nel LCS, principalmente mediante l'attivazione di un meccanismo paracellulare attraverso l'epitelio olfattivo. Lo stesso CH è stato impiegato da Gavini *et al.* (2009) nella preparazione di microsfere mucoadesive in grado di trattenere e controllare il rilascio di idrossipropil- β -ciclodestrina (CD) per il *targeting* cerebrale attraverso somministrazione i.n. Gli autori hanno dimostrato che, la somministrazione nasale in ratti, delle microsfere di CH ha ridotto la neurotossicità e la neurodegenerazione indotta dal β -amiloido. Di fatto, le CD rilasciate hanno frenato i parametri di stress ossidativo ed apoptotico nell'ippocampo di ratto [Soddu *et al.*, 2013]. Ancora, Gavini *et al.* (2011) hanno indagato l'influenza del tipo di chitosano sull'assorbimento della rokitamicina (RK) a livello ematico ed a livello del LCS dopo somministrazione i.n. a ratti. Sono state preparate e studiate *in vitro* ed *in vivo* delle microsfere con chitosano glutammato (CG) (PM <200 kDa, DD: 75-90%) o chitosano (PM: 282 kDa, DD: 96%). I processi di assorbimento della RK sono stati promossi solo dalle microparticelle ottenute con il sale idrosolubile del chitosano, ma non da quelle ottenute con il chitosano. Per le formulazioni nasali basate sull'impiego del chitosano, l'idrosolubilità delle particelle sembra perciò essere una proprietà essenziale nel promuovere l'assorbimento del farmaco sia a livello sistemico che nel LCS.

Successivamente, gli stessi autori hanno valutato *in vivo* l'effetto di *microcarrier* polimerici sul *up-take* nasale dello zolmitriptan nel *targeting* cerebrale [Gavini *et al.*, 2013]. Sono stati studiati prima *in vitro* [Alhalaweh *et al.*, 2009;2011] ed *ex vivo* [Gavini *et al.*,

2013] i formulati in polvere consistenti di vari tipi di chitosani a diversi PM (chitosano glutammato con PM<200 kDa, DD: 75-90%; chitosano glutammato con PM: 200-600 kDa, DD: 75-90% o chitosano base con PM: 150 kDa, DD>85%) o idrossipropilmetilcellulosa (HPMC). *In vivo*, sono state studiate solo le formulazioni con chitosano glutammato con il più alto peso molecolare o HPMC con un rapporto farmaco/polimero di 50:50, in quanto hanno mostrato buone proprietà mucoadesive ed hanno modificato il grado di permeazione del farmaco. Le microparticelle di CG hanno dimostrato di essere le più efficienti nel promuovere l'*up-take* centrale dello zolmitriptan nell'arco di tempo di 1 h, con una riduzione dei livelli periferici del farmaco [Gavini *et al.*, 2013]. Tutte le formulazioni microparticellari sono state somministrate *in vivo* mediante insufflatori specifici per polveri.

Del chitosano glutammato a basso peso molecolare (DD \geq 85%) è stato usato per preparare NP caricate con venlafaxina con il fine di aumentare la sua captazione cerebrale attraverso la via nasale. *In vivo*, è stata studiata la farmacocinetica, l'*up-take* cerebrale e gli effetti antidepressivi delle NP caricate con venlafaxina e somministrate per via nasale. Gli autori hanno riportato che le NP sono state disciolte in 100 μ L di soluzione salina normale, 1 h prima della somministrazione nasale. I dati hanno rivelato che una quantità significativa di farmaco è stata trasportata al cervello velocemente e con efficacia, dopo somministrazione i.n. delle NP di chitosano caricate con il farmaco; si è osservata inoltre un'aumentata attività locomotoria [Haque *et al.*, 2012].

Derivati del chitosano

I derivati chimici del chitosano sono stati oggetto di un crescente interesse nelle ultime decadi per via dei loro vantaggi chimici, biologici e funzionali rispetto al chitosano non modificato. Questi includono migliore solubilità nelle soluzioni acquose in un ampio intervallo di pH, proprietà di gelificazione, possibilità di invertire la loro carica netta da policationica a polianionica, la progettazione di derivati idrofobici con caratteristiche amfifiliche, una capacità di imbrigliare nanostrutture auto-assemblanti e coniugati chimici con molecole terapeutiche e bioattive, migliore biocompatibilità (per es. emo-compatibilità) e migliori proprietà di complessazione del pDNA o dei siRNA [Sarmiento *et al.*, 2011]. L'incapsulamento della RK in derivati del chitosano, vale a dire dietil amminoetil-(dietil dimetilene ammonio)_n metil chitosani [Zambito *et al.*, 2006a], ha portato a microparticelle con proprietà simili o spesso migliori rispetto a quelle date dalle formulazioni prodotte con chitosano, in riferimento alle dimensioni, al comportamento di rilascio *in vitro* ed alla mucoadesione, rendendole così più adatte per la somministrazione nasale [Rassu *et al.*, 2009].

Il chitosano a basso PM (PM: 10 kDa; DD: 80,0%) è stato usato per coniugare al gruppo idrossilico del C2 il monometossi-PEG, con il PEG coniugato all'oligopeptide TAT, un *cell penetrating peptide*. Il polimero così sintetizzato, chitosano-PEG-TAT, è stato impiegato per produrre NP di circa 5 nm di diametro, con lo scopo di veicolare il complesso con siRNA alle cellule neuronali nella terapia delle patologie neurodegenerative [Malhorta *et al.*, 2013a]. Lo studio ha indicato che la formulazione di NP con chitosano funzionalizzate in superficie è stata capace di trasporto del siRNA al cervello attraverso la somministrazione nasale. La dose ottimale di siRNA è stata raggiunta nelle cellule neuronali della corteccia cerebrale e nelle cellule cerebellari di Purkinje grazie alle NP, senza il palesarsi di effetti tossici locali [Malhorta *et al.*, 2013b].

Il chitosano trimetilato (TMC) è un derivato del chitosano parzialmente quaternizzato che mostra una buona solubilità in acqua in un ampio intervallo di pH così come buone proprietà di mucoadesione ed un'eccellente azione come *penetration enhancer* rispetto agli altri sali del chitosano [Thanou *et al.*, 2000; Hamman *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2011]. NP di TMC rappresentano un potenziale nuovo sistema di veicolazione per il trasporto di proteine attraverso la mucosa nasale [Amidi *et al.*, 2006]. Per questa ragione, Kumar *et al.* (2013) hanno preparato NP di N-trimetil chitosano caricate con leucina-encefalina come veicolo per il trasporto cerebrale attraverso la via nasale. I risultati della valutazione biologica hanno confermato che la leucina-encefalina è stata trasportata con successo nella sua forma attiva dalle NP di TMC ai tessuti cerebrali, passando dalla cavità nasale, e garantendo una potente azione analgesica centrale.

Metodi di preparazione

È stata sviluppata una certa varietà di procedure sintetiche (coacervazione complessa, emulsione/evaporazione, nanoprecipitazione e polimerizzazione radicalica) per l'ottenimento di NP di chitosano destinate a molteplici impieghi. Il metodo più comunemente adoperato per la preparazione di NP di chitosano, rivolte ad un trasporto *nose-to-brain* di un farmaco, è quello indicato come ionotropico o gelificazione ionica. Quest'ultima riguarda l'aggregarsi spontaneo del chitosano con contro-ioni multivalenti, di cui il più comune è il sodio tripolifosfato (TPP) [Lai *et al.*, 2014]. La formazione delle NP è il risultato dell'interazione ionica tra i gruppi amminici del chitosano carichi positivamente ed i gruppi negativi del TPP [Alam *et al.*, 2012].

NP impieganti chitosano non modificato sono state ottenute dopo aggiunta, goccia a goccia, di una soluzione acquosa di TPP ad una del chitosano in acido acetico, sotto agitazione magnetica costante ed a temperatura ambiente [Wang *et al.*, 2008; Alam *et al.*,

2012;Md *et al.*, 2013;Sharma *et al.*, 2014]. Il rapporto del chitosano con il TPP, in generale, è stato stabilito mediante studi preliminari. Alcuni autori hanno controllato la velocità nell'aggiunta della soluzione di TPP (mL/min) [Wang *et al.*, 2008;Sharma *et al.*, 2014] e quella dell'agitazione a 600 rpm [Md *et al.*, 2013] o 1500 rpm [Wang *et al.*, 2008]. Le NP sono state raccolte mediante centrifugazione a 15000 rpm a 4°C per 30-45 min [Alam *et al.*, 2012; Fazil *et al.*, 2012 Md *et al.*, 2013] ed eventualmente liofilizzate [Md *et al.*, 2013]. Per il caricamento delle formulazioni, prima dell'aggiunta del TPP, i farmaci vengono solubilizzati in soluzioni di chitosano a diversi rapporti tra il farmaco ed il polimero. Haque *et al.* (2012), hanno adoperato il metodo descritto in precedenza per la preparazione di NP di chitosano glutammato e Malhotra *et al.* (2013a) hanno applicato lo stesso metodo nella preparazione di formulazioni nanoparticellari di siRNA sul polimero pegilato del chitosano funzionalizzato con un peptide (TAT o MGF). NP di chitosano trimetilato (TMC) sono state preparate attraverso gelificazione ionica del TMC con anioni TPP. L'unica differenza rispetto ai metodi preparativi precedentemente riportati è stata la solubilizzazione del TMC è in acqua [Kumar *et al.*, 2013].

Musumeci *et al.* (2014) hanno preparato NP di chitosano con un metodo modificato basato sulla gelificazione ionica del chitosano con anioni solfati. Il chitosano non modificato è stato solubilizzato in una soluzione acquosa di acido acetico ed è stato addizionato del Tween 80 a differenti concentrazioni. Una soluzione filtrata di solfato di sodio è stata addizionata goccia a goccia alla soluzione di chitosano, sotto costante agitazione magnetica. Le sospensioni ottenute sono state sonicate per 15 min e quindi lasciate in agitazione magnetica per 1 h a differenti velocità (500 e 1250 rpm).

Nella preparazione delle microsfele di chitosano sono stati adoperati vari metodi. Questi includono l'interazione con anioni (ad es. tripolifosfato, tetrapolifosfato, esametafosfato, alginato, carragenine, ottilo solfato e lauril solfato), il *cross-linking* con altre sostanze chimiche (ed es. glutaraldeide, formaldeide e genipina), l'evaporazione del solvente e lo *spray drying* [Sinha *et al.*, 2004]. Le microsfele nasali per il *targeting* cerebrale di farmaci sono state principalmente preparate mediante *spray drying*. Questa tecnica consiste nella trasformazione del campione da uno stato fluido ad uno particellare essiccato attraverso lo spruzzo del campione in un mezzo gassoso essiccante [Cal *et al.*, 2010].

Le microsfele caricate con farmaci basate su chitosano non modificato, sono state preparate utilizzando diversi rapporti in peso tra farmaco e polimero. I campioni in soluzione sono stati preparati disciogliendo la miscela del farmaco con il chitosano in etanolo, acqua ed acido acetico in un rapporto 50:49:1 (v/v) [Rassu *et al.*, 2008]. Le soluzioni sono state inoltre aggiustate al pH 5 mediante aggiunta di acido acetico allo 0,25% (v/v) [Gavini *et al.*,

2013;Alhalaweh *et al.*, 2009] o di una soluzione di acido cloridrico 0,1 N [Sun *et al.*, 2012] sotto agitazione magnetica. Le soluzioni sono state nebulizzate utilizzando uno *spray dryer* per laboratori ed un sistema a ciclo aperto con un ugello a pressione (flusso in co-corrente). È stata utilizzata l'aria come mezzo essiccante (115°C-160°C). Le particelle essiccate sono state rimosse dal recipiente di raccolta e poste in un essiccatore sino alle relative analisi.

Con il chitosano cloridrato, le microsfeere sono state ottenute mediante nebulizzazione di una soluzione acquosa del farmaco e del polimero [Dalpiaz *et al.*, 2008;Gavini *et al.*, 2009]. Diversamente, il chitosano glutammato è stato solubilizzato in una miscela di acqua ed acido acetico al rapporto di 99:1 (v/v) [Gavini *et al.*, 2011] o in acqua aggiustata a pH 5 mediante acido acetico allo 0,25% (v/v) [Gavini *et al.*, 2013;Alhalaweh *et al.*, 2009], principalmente con lo scopo di aumentare la solubilizzazione dei componenti del campione da essiccare per *spray drying*. I campioni in soluzione contenenti derivati del chitosano idrosolubili, dietil amminoetil-(dietil dimetilene ammonio)_n metil chitosani, sono state allestite utilizzando una soluzione di acqua:acido acetico in un rapporto di 99,5:0,5 (v/v) a causa della scarsa solubilità in acqua del farmaco rokitamicina [Rassu *et al.*, 2009]. Le condizioni di spruzzo impiegate in questi lavori (temperatura di ingresso ed uscita, pressione di spruzzo e velocità di alimentazione della soluzione) sono state più o meno le stesse, indipendentemente dal tipo di chitosano impiegato.

Le microsfeere di chitosano caricate con lorazepam sono state preparate con un metodo di emulsione mediante *cross-linking*. La soluzione di chitosano è stata preparata in acido acetico glaciale acquoso al 4% ed il farmaco è stato solubilizzato in etanolo e miscelato bene con la soluzione del polimero. La miscela risultante è stata iniettata tramite siringa in paraffina liquida contenente Span 80 (7% v/v). Dopo 30 min dall'omogeneizzazione a 1500 rpm, è stata addizionata glutaraldeide al 25% (v/v). Le microsfeere ottenute sono state centrifugate a 4000 rpm. Il sedimento è stato quindi lavato per 3 volte con etere di petrolio ed acetone ed essiccato in stufa ventilata a 50°C [José *et al.*, 2013].

Conclusioni e prospettive future

Nella somministrazione nasale di farmaci, le polveri hanno il vantaggio di essere dei formulati di più semplice manipolazione, di poter essere impiegate come *carrier* per proteine ed altri farmaci instabili e di permettere un tempo di residenza prolungato del farmaco nella cavità nasale, se confrontate con le corrispondenti formulazioni allo stato liquido. Le particelle solide possono essere ottenute impiegando idonei parametri formulativi e di processo, con dimensioni e morfologia desiderate, in modo da favorire il depositarsi delle formulazioni all'interno della cavità nasale, in particolar modo a livello della regione

olfattiva, dopo somministrazione nasale. Nonostante molti studi sugli animali abbiano evidenziato il trasporto diretto *nose-to-brain*, l'uso di questo tipo di formulazioni nella terapia a livello umano, è ancora lontano dall'essere realizzato. Come ha enfatizzato Djupesland (2013), ciò è in parte dovuto a problemi etici e metodologici, nonché all'inadeguatezza nella veicolazione delle formulazioni nei siti target situati in profondità.

Attualmente, i dispenser utilizzati negli studi animali sono di costruzione artigianale oppure sono dispenser per uso umano adattati. Comunque, nessuno è specifico per garantire il depositarsi delle formulazioni nella regione olfattiva. Studi futuri dovrebbero focalizzarsi sullo sviluppo di insufflatori che possono permettere il depositarsi delle formulazioni in polvere su uno specifico sito nasale a seconda che la somministrazione nasale sia destinata o per un *targeting* cerebrale o per scopi sistemici.

Bibliografia

Alam S, Khan ZI, Mustafa G, Kumar M, Islam F, Bhatnagar A, Ahmad FJ. Development and evaluation of thymoquinone-encapsulated chitosan nanoparticles for nose-to-brain targeting: a pharmacoscintigraphic study. *Int J Nanomed*. 2012;7:5705-18.

Alhalaweh A, Andersson S, Velaga SP. Preparation of zolmitriptan–chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2009;38:206-14.

Alhalaweh A, Vilinska A, Gavini E, Rassa G, Velaga SP. Surface thermodynamics of mucoadhesive dry powder formulation of zolmitriptan. *AAPS PharmSciTech* 2011;12:1186-92.

Amidi M, Romeijn SG, Borchard G, Junginger HE, Hennink WE, Jiskoot W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. *J Control Release*. 2006;111:107-16.

Andlin-Sobocki P, Jönsson B, Wittchen HU, Olesen J. Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur J Neurol*. 2005;12:1-27.

Andrade F, Goycoolea F, Chiappetta DA, das Neves J, Sosnik A, Sarmiento B. Chitosan-grafted copolymers and chitosan-ligand conjugates as matrices for pulmonary drug delivery. *Int J Carbohyd Chem*. 2011; Article ID 865704:1-14. Consultabile al: (<http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2011/865704/>).

Aranaz I, Mengíbar M, Harris R, Paños I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras Á. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr Chem Biol*. 2009;3:203-230.

Bernkop-Schnürch A, Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems. *Eur J Pharm. Biopharm*. 2012;81:463-69.

Bhavna, Md S, Ali M, Ali R, Bhatnagar A, Baboota S, Ali J. Donepezil nanosuspension intended for nose to brain targeting: In vitro and in vivo safety evaluation. *Int J Biol Macromol*. 2014;67:418-25.

Bonferoni MC, Sandri G, Rossi S, Ferrari F, Caramella C. Chitosan and its salts for mucosal and transmucosal delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2009;6:923-39.

Bshara H, Osman R, Mansour S, El-Shamy Ael-H. Chitosan and cyclodextrin in intranasal microemulsion for improved brain bupirone hydrochloride pharmacokinetics in rats. *Carbohydr Polym*. 2014;99:297-305.

Cal K, Sollohub K. Spray Drying Technique. I: Hardware and Process Parameters. *J Pharm Sci*. 2010;99:575-86.

Candy T, Sharma CP. Chitosan as a biomaterial. *Biomater Artif Cells Artif Organs*. 1990;18:1-24.

Casettari L, Illum L. Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *J Control Release*. 2014;190:189-200.

Charlton ST, Davis SS, Illum L. Evaluation of bioadhesive polymers as delivery systems for nose to brain delivery: in vitro characterisation studies. *J Control Release*. 2007;118, 225-34.

Cock HR, Scaphira AHV. A comparison of lorazepam and diazepam as initial therapy in convulsive status epilepticus. *Q J Med*. 2002;95:225-31.

Corti G, Maestrelli F, Cirri M, Mura P, Zerrouk N. Dissolution and permeation properties of naproxen from solidstate systems with chitosan. *Drug Deliv*. 2008;15:303-12.

Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quaya SC. Intranasal delivery: Physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm*. 2007;337:1-24.

Dalpiazz A, Ferraro L, Perrone D, Leo E, Iannuccelli V, Pavan B, Paganetto G, Beggiano S, Scalia S. Brain uptake of a Zidovudine prodrug after nasal administration of solid lipid microparticles. *Mol Pharm*. 2014;11:1550-61.

Dalpiazz A, Gavini E, Colombo G, Russo P, Bortolotti F, Ferraro L, Tanganelli S, Scatturin A, Menegatti E, Giunchedi P. Brain uptake of an anti-ischemic agent by nasal administration of microparticles. *J Pharm Sci*. 2008;97:4889-903.

Dalpiazz A, Marchetti N, Cavazzini A, Pasti L, Velaga S, Gavini E, Beggiano S, Ferraro L. Quantitative determination of zolmitriptan in rat blood and cerebrospinal fluid by reversed phase HPLC-ESI-MS/MS analysis: application to in vivo preclinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analy Technol Biomed Life Sci*. 2012;901:72-8.

Dalpiazz A, Paganetto G, Pavan B, Fogagnolo M, Medici A, Beggiano S, Perrone D. Zidovudine and ursodeoxycholic acid conjugation: design of a new prodrug potentially able to bypass the active efflux transport systems of the central nervous system. *Mol Pharm*. 2012;9:957-68.

Dhakar RC, Maurya SD, Gupta AK, Jain A, Kiroriwal S, Gupta M. Microemulsion as a carrier for nose to brain targeting: a review and update. *Pharma Science Monitor*. 2011;2:S49-78.

Dhuria SV, Hanson LR, Frey II WH. Intranasal Delivery to the Central Nervous System: Mechanisms and Experimental Considerations. *J Pharm Sci*. 2010;99:1654-73.

Di Colo G, Zambito Y, Burgalassi S, Nardini I, Saettone MF. Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically supplied ofloxacin. *Int J Pharm*. 2004;273:37-44.

Djupesland PG. Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective-a review. *Drug Deliv and Transl Res*. 2013;3:42-62.

Engelhardt B. The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. *Curr Pharm Des.* 2008;14:1555-65.

Fazil M, Md S, Haque S, Kumar M, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47:6-15.

Gallagher DA, Schrag A. Impact of newer pharmacological treatments on quality of life in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs.* 2008;22:563-86.

Gavini E, Rasso G, Ferraro L, Beggiato S, Alhalaweh A, Velaga S, Marchetti N, Bandiera P, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of polymeric microcarriers on the in-vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;83:174-83.

Gavini E, Rasso G, Ferraro L, Generosi A, Rau JV, Brunetti A, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of chitosan glutamate on the in vivo intranasal absorption of rokitamycin from microspheres. *J Pharm Sci.* 2011;100:1488-502.

Gavini E, Rasso G, Haukvik T, Lanni C, Racchi M, Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of cyclodextrins. *J Drug Target.* 2009;17:168-79.

Gavini E, Rasso G, Muzzarelli C, Cossu M, Giunchedi P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;68:245-52.

Gavini E, Rasso G, Sanna V, Cossu M, Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of an antiemetic drug, metoclopramide: in-vitro/ex-vivo studies. *J Pharm Pharmacol.* 2005;57:287-94.

Hamman JH, Stander M, Kotzé AF. Effect of the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia. *Int J Pharm.* 2002;232:235-42.

Haque S, Md S, Fazil M, Kumar M, Sahni JK, Ali J, Baboota S. Venlafaxine loaded chitosan NPs for brain targeting: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Carbohydr Polym.* 2012;89:72-9.

He P, Davis SS, Illum L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Int J Pharm.* 1998;166:75-88.

Hirano S, Tsuchida H, Nagao N. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. *Biomaterials.* 1989;10:574-6.

Huang M, Khor E, Lim L. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. *Pharm Res.* 2004;21:344-53.

Illum L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm Res.* 1998;15:1326-31.

Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol.* 2004;56:3-17.

Illum L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug Discov Today.* 2002;7:1184-9.

Illum L. Nasal drug delivery—possibilities, problems and solutions. *J Control Rel.* 2003;87:187-98.

Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci.* 2000;11:1-18.

José S, Ansa CR, Cinu TA, Chacko AJ, Aleykutty NA, Ferreira SV, Souto EB. Thermo-sensitive gels containing lorazepam microspheres for intranasal brain targeting. *Int J Pharm.* 2013;441:516-26.

Kaur K, Kaur G. Formulation and evaluation of chitosan-chondroitin sulphate based nasal inserts for zolmitriptan. *Biomed Res Int.* 2014. Article ID 958465. Consultabile al: (<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/958465/>).

Khan S, Patil K, Bobade N, Yeole P, Gaikwad R. Formulation of intranasal mucoadhesive temperature-mediated in situ gel containing ropinirole and evaluation of brain targeting efficiency in rats. *J Drug Target.* 2010;18:223-34.

Khan S, Patil K, Yeole P, Gaikwad R. Brain targeting studies on buspirone hydrochloride after intranasal administration of mucoadhesive formulation in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2009;61:669-75.

Kumar M, Pandey RS, Patra KC, Jain SK, Soni ML, Dangi JS, Madan J. Evaluation of neuropeptide loaded trimethyl chitosan nanoparticles for nose to brain delivery. *Int J Biol Macromol.* 2013;61:189-95.

Kurita K, Kaji Y, Mori T, Nishiyama Y. Enzymatic degradation of [beta]-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydr Polym.* 2000;42:19-21.

Lai P, Daear W, Löbenberg R, Prenner EJ. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly(d,l-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloid Surface B.* 2014;118:154-63.

Lehr CM, Bouwstra J, Schacht E, Junginger H. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *Int J Pharm.* 1992;78:43-8.

Lim JH, Kim SS, Boo DH, No H, Kang BY, Kim EM, Hwang O, Choi HJ. Protective effect of bromocriptine against BH4-induced Cath. A cell death involving up-regulation of antioxidant enzymes. *Neurosci Lett.* 2009;451:185-9.

Luppi B, Bigucci F, Cerchiara T, Zecchi V. Chitosan-based hydrogels for nasal drug delivery: from inserts to nanoparticles. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7:811-28.

Maestrelli F, Zerrouk N, Chemtob C, Mura P. Influence of chitosan and its glutamate and hydrochloride salts on naproxen dissolution rate and permeation across Caco-2 cells. *Int J Pharm.* 2004;271:257-67.

Malhotra M, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S. Synthesis of TAT peptide-tagged PEGylated chitosan nanoparticles for siRNA delivery targeting neurodegenerative diseases. *Biomaterials.* 2013a;34:1270-80.

Malhotra M, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Prakash S. Intranasal, siRNA delivery to the brain by TAT/MGF tagged PEGylated chitosan nanoparticles. *J Pharm.* 2013b:Article ID 812387:1-10. Consultabile al: <http://www.hindawi.com/journals/jphar/2013/812387/>.

Manda P, Hargett JK, Vaka SR, Repka MA, Murthy SN. Delivery of cefotaxime to the brain via intranasal administration. *Drug Dev Ind Pharm.* 2011;37:1306-10.

Md S, Haque S, Fazil M, Kumar M, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Optimised nanoformulation of bromocriptine for direct nose-to-brain delivery: biodistribution, pharmacokinetic and dopamine estimation by ultra-HPLC/mass spectrometry method. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014;11:827-42.

Md S, Khan RA, Mustafa G, Chuttani K, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Bromocriptine loaded chitosan nanoparticles intended for direct nose to brain delivery: Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Scintigraphy study in mice model. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48:393-405.

Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int. J. Pharm.* 2009;379:146-57.

Mittal D, Md S, Hasan Q, Fazil M, Ali A, Baboota S, Ali J. Brain targeted nanoparticulate drug delivery system of rasagiline via intranasal route. *Drug Deliv.* 2014, In press, doi: 10.3109/10717544.2014.907372.

Musumeci T, Pellitteri R, Spatuzza M, Puglisi G. Nose-to-brain delivery: Evaluation of polymeric nanoparticles on olfactory ensheathing cells uptake. *J Pharm Sci.* 2014;103:628-35.

Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today.* 2007;12:54-61.

Pardridge WM. The Blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* 2005;2:3-14.

Patel D, Naik S, Chuttani K, Mathur R, Mishra AK, Misra A. Intranasal delivery of cyclobenzaprine hydrochloride-loaded thiolated chitosan nanoparticles for pain relief. *J Drug Target.* 2013;21:759-69.

Patel D, Naik S, Misra A. Improved transnasal transport and brain uptake of tizanidine HCl-loaded thiolated chitosan nanoparticles for alleviation of pain. *J Pharm Sci.* 2012;101:690-706.

Pavan B, Dalpiaz A, Ciliberti N, Biondi C, Manfredini S, Vertuani S. Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach. *Molecules*. 2008;13:1035-65.

Pavan B, Dalpiaz A. Prodrugs and endogenous transporters: are they suitable tools for drug targeting in the central nervous system? *Current Pharm Design*. 2011;17:3560-76.

Perez AP, Mundiña-Weilenmann C, Romero EL, Morilla MJ. Increased brain radioactivity by intranasal ³²P-labeled siRNA dendriplexes within in situ-forming mucoadhesive gels. *Int. J Nanomedicine*. 2012;7:1373-85.

Rassu G, Gavini E, Jonassen H, Zambito Y, Fogli S, Breschi MC, Giunchedi P. New chitosan derivatives for the preparation of rokitamycin loaded microspheres designed for ocular or nasal administration. *J Pharm Sci*. 2009;98:4852-465.

Rassu G, Gavini E, Mattana A, Giunchedi P. Improvement of antiamoebic activity of rokitamycin loaded in chitosan microspheres. *Open Drug Deliv J*. 2008;2:38-43.

Rossi S, Marciello M, Sandri G, Bonferoni MC, Ferrari F, Caramella C. Chitosan ascorbate: A chitosan salt with improved penetration enhancement properties. *Pharm Dev Technol*. 2008;13:513-21.

Sarmiento B, Goycoolea FM, Sosnik A, das Neves J. Chitosan and Chitosan Derivatives for Biological Applications: Chemistry and Functionalization. *Int J Carbohyd Chem*. 2011; Article ID 802693. Consultabile al: <http://www.hindawi.com/journals/ijcc/2011/802693/>

Sashiwa H, Saimoto H, Shigemasa Y, Ogawa R, Tokura S. Distribution of the acetamide group in partially deacetylated chitins. *Carbohydr Polym*. 1991;16:291-6.

Schipper NGM, Varum K, Artursson P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Pharm Res*. 1999;13:1686-92.

Sharma S, Lohan S, Murthy RSR. Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermo-reversible gel of levodopa for brain delivery. *Drug Dev Ind Pharm*. 2014;40(7):869-78.

Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm*. 2004;274:1-33.

Soddu E, Bayrakdar ET, Uyanikgil Y, Kanit L, Armagan G, Giunchedi P, Gavini E, Yalcin A. Protective effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin microspheres loaded nasal formulations on amyloid β -peptide (1-42)- induced neurodegeneration. 5th International Symposium Nutrition, Oxygen Biology and Medicine, June 5-7, 2013, Paris, Société Française de Recherche sur les Radicaux Libres Ed., p72.

Sun Y, Shi K, Wan F, Cui F-d. Methotrexate-loaded microspheres for nose to brain delivery: in vitro/in vivo evaluation. *J Drug Del Sci Tech.* 2012;22:167-74.

Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;50:S91–S101.

Thanou M, Verhoef JC, Verheijden JHM, Junginger HE. Intestinal absorption of octeriotide: N-trimethyl chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue in vitro and in vivo. *J Pharm Sci.* 2000;8:951-7.

Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin: the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43:61-87.

Tiyaboonchai W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. *Naresuan Univ J.* 2003;11:51-66.

Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitins and its deacetylated derivatives. *Biomaterials.* 1997;18:567-75.

Uchida M, Katoh T, Mori M, Maeno T, Ohtake K, Kobayashi J, Morimoto Y, Natsume H. Intranasal administration of milnacipran in rats: evaluation of the transport of drugs to the systemic circulation and central nervous system and the pharmacological effect. *Biol Pharm Bull.* 2011;34:740-7.

Vaka SRK, Murthy SN, Balaji A, Repka MA. Delivery of brain-derived neurotrophic factor via nose-to-brain pathway. *Pharm Res.* 2012;29:441-7.

Vaka SRK, Murthy SN, Repka MA, Nagy T. Upregulation of endogenous neurotrophin levels in the brain by intranasal administration of carnosic acid. *J Pharm Sci.* 2011;100:3139-45.

Vaka SRK, Sammeta SM, Day LB, Murthy SN. Delivery of nerve growth factor to brain via intranasal administration and enhancement of brain uptake. *J Pharm Sci.* 2009;98:3640-46.

Van der Merwe SM, Verhoef JC, Verheijden JH, Kotze AF, Junginger HE. Trimethylated chitosan as polymeric absorption enhancer for improved peroral delivery of peptide drugs. - *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58:225-35.

Vidgren MT, Kublik H. Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;29:157-77.

Vyas TK, Shahiwala A, Marathe S, Misra A. Intranasal drug delivery for brain targeting. *Curr Drug Deliv.* 2005;2:165-175.

Wang X, Chi N, Tang X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70:735-40.

Wang X, He H, Leng W, Tang X. Evaluation of brain-targeting for the nasal delivery of estradiol by the microdialysis method. *Int J Pharm.* 2006;317:40-46.

Wu H, Hu K, Jiang X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. *Expert Opin Drug Del.* 2008;5:1159-68.

Zambito Y, Uccello-Barretta G, Zaino C, Balzano F, Di Colo G. Novel transmucosal absorption enhancers obtained by aminoalkylation of chitosan. *Eur J Pharm Sci.* 2006a;29:460-9.

Zambito Y, Zaino C, Di Colo G. Effect of N-trimethylchitosan on transcellular and paracellular transcorneal drug transport. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006b;64:16-25.

Zambito Y, Zaino C, Uccello-Barretta G, Balzano F, Di Colo G. Improved synthesis of quaternary ammonium-chitosan conjugates (N β -Ch) for enhanced intestinal drug permeation. *Eur J Pharm Sci.* 2008;33:343-51.

Zhang H, Neau SH. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials.* 2001;22:1653-58.

Table**Tabella 1.** Riepilogo del tipo di chitosano impiegato per il trasporto di farmaci *nose-to-brain*.

Chitosano non modificato	Caratteristiche	Formulazione	Metodo preparativo	Farmaco incapsulato	Rif.
Chitosano	PM: 50 kDa; DD: 95,0%,	NP	Interazione ionica con TPP	Estradiolo	Wang <i>et al.</i> , 2008
Chitosano	Medio PM; DD 96%	NP	Gelificazione ionica con TPP	Timochinone	Alam <i>et al.</i> , 2008
Chitosano	PM: 750 kDa; DD: ≈5%	NP	Gelificazione ionica con TPP	Rivastigmina	Fazil <i>et al.</i> , 2012
Chitosano	Medio PM; DD: ≈85%	NP	Gelificazione ionica con TPP	Bromocriptina	Md <i>et al.</i> , 2013
Chitosano	PM: 50-190 kDa; DD: 75-85% e PM: 190-310 kDa; DD: 75-85%	NP	Gelificazione ionica con TPP	Rodamina B	Musumeci <i>et al.</i> , 2014
Chitosano	Medio PM e DD: ≈85%	NP	Gelificazione ionica con TPP	Bromocriptina	Md <i>et al.</i> , 2014
Chitosano	Medio PM e DD: 75-85%	NP	Gelificazione ionica con TPP	Levodopa	Sharma <i>et al.</i> , 2014
Chitosano	PM: 282 kDa; DD: 96%	MS	<i>Spray drying</i>	Rokitamicina	Rassu <i>et al.</i> , 2008
Chitosano	Diversi PM e DD	MS	<i>Spray drying</i>	Metotrexato	Sun <i>et al.</i> , 2012
Chitosano	Non riportato	MS	Emulsione in <i>cross-linking</i> con glutaraldeide	Lorazepam	José <i>et al.</i> , 2013
Chitosano	PM150 kDa; DD >85%	MS	<i>Spray drying</i>	Zolmitriptan	Gavini <i>et al.</i> , 2013
Sali del chitosano	Caratteristiche	Formulazione	Metodo preparativo	Farmaco incapsulato	Rif.
Chitosano cloridrato	PM 160 kDa; DD 86%,	MS	<i>Spray drying</i>	N ⁶ -ciclopentiladenosina	Dalpiaz <i>et al.</i> , 2008
Chitosano cloridrato	PM 160 kDa; DD 86%	MS	<i>Spray drying</i>	Cicloestrina	Gavini <i>et al.</i> , 2009
Chitosano glutammato	PM <200 kDa; DD 75–90%	MS	<i>Spray drying</i>	Rokitamicina	Gavini <i>et al.</i> , 2011
Chitosano glutammato	Basso PM; DD ≥85%	NP	Gelificazione ionica con TPP	Venlafaxina cloridrato	[Haque <i>et al.</i> , 2012] Gavini <i>et al.</i> , 2013
Chitosano glutammato	PM <200 kDa; DD 75–90% e PM 200–600 kDa; DD 75–90%	NP	<i>Spray drying</i>	Zolmitriptan	Alhalaweh <i>et al.</i> , 2009
Derivati del chitosano	Caratteristiche	Formulazione	Metodo preparativo	Farmaco incapsulato	Rif.
Dietilamminoetil-(dietildimetilene ammonio) _n metil chitosani	N,O-[N,N-dietilaminometil-(dietildimetilene ammonio) _n] metil chitosano (DD: 88,3%, grado di sostituzione: 42,7%) e N,O-[N,N-dietilaminometil-(dietildimetilene ammonio) _n] metil	MS	<i>Spray drying</i>	Rokitamicina	Rassu <i>et al.</i> , 2009

Trimetil chitosano	chitosano (DD: 88,6%; grado di sostituzione: 58,9%) Grado di quaternizzazione del 25%	NP	Gelificazione ionica con TPP	Leucina-encefalina	Kumar et al., 2013
Polimero del chitosano pegilato e funzionalizzato con peptide (TAT o MGF)	PM: 10kDa; DD: 80%;	NP	Gelificazione ionica con TPP	siRNA biotinilato	Malhorta et al., 2013a; Malhorta et al., 2013b

NP: nanoparticelle; MS: microsfere

Figure

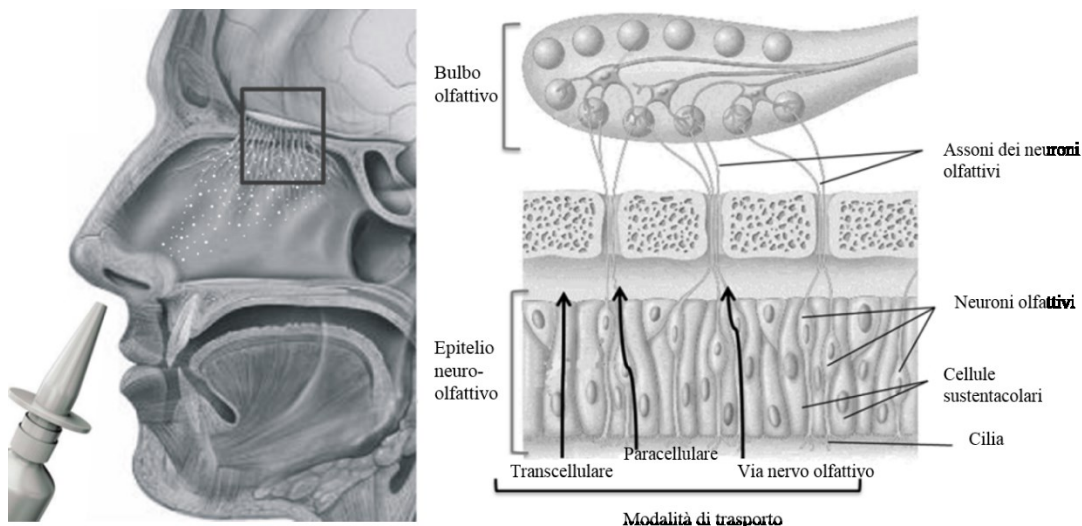


Figura 1. Sezione saggitale della cavità umana nasale. A destra: particolare della regione olfattiva con le strutture e le modalità di trasporto *nose-to-brain* dopo somministrazione di un farmaco.

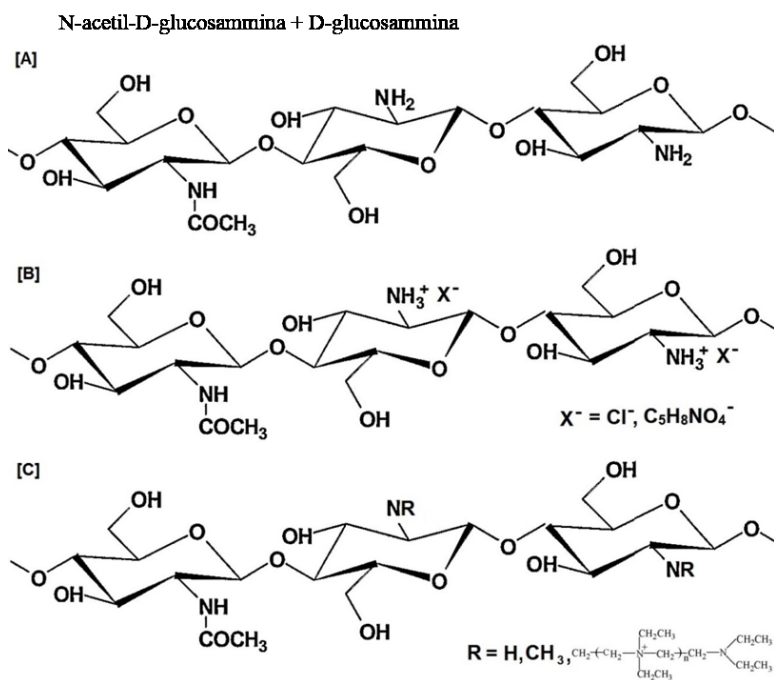


Figura 2. Strutture chimiche del chitosano non modificato [A], sali [B] e derivati [C].

Parte Seconda

PROGETTAZIONE E SVILUPPO PRELIMINARE DI NANO- *CARRIER* PER IL *TARGETING* CEREBRALE

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Capitolo I

Influenza dei Parametri Formulativi sulle Dimensioni e sulla Stabilità Fisica di
SLN a Base di Componenti “Green”

The effect of formulative parameters on the size and physical stability of SLN based on “green” components. E. Soddu, G. Rassu, M. Cossu, P. Giunchedi, G. Cerri, E. Gavini. *Pharmaceutical Development and Technology*
DOI:10.3109/10837450.2014.971376)

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Abstract

Il burro di cacao è un eccipiente ampiamente utilizzato in campo farmaceutico. L'obiettivo del progetto è stato quello di stabilire i parametri formulativi per la preparazione di SLN a base di una matrice lipidica *green*, in modo da ottenere sistemi di origine naturale, sicuri sia per l'uomo che per l'ambiente, come *carrier* di farmaci. È stata scelta la tecnica della doppia emulsione ($a_1/o/a_2$) come metodo preparativo. È stato studiato l'effetto sulle proprietà dimensionali per impiego di differenti surfattanti (Tween 80 e PEG 40 monostearato) e co-surfattanti (PEG400 monostearato, Emulium® Kappa2 e Plurol®Stearique) in diverse concentrazioni. Sono stati condotti test di stabilità. Le dispersioni delle SLN sono state quindi essiccate ed è stato esaminato l'effetto del processo di essiccamento per liofilizzazione. È stato indagato il ruolo della temperatura (37°C) sulle dimensioni delle SLN. Il test di vitalità cellulare MTT è stato condotto sia per le formulazioni che per i singoli componenti. La tecnica $a_1/o/a_2$ si è rivelata essere adatta, rapida ed economica per l'ottenimento di SLN a base di burro di cacao. La combinazione Tween 80-Plurol®Stearique ha portato ai migliori risultati: sono state ottenute particelle con dimensioni inferiori ai 400 nm e con indice di polidispersione di circa 0,4 con l'utilizzo di Plurol®Stearique alla concentrazione del 2%. Sia le formulazioni che i loro componenti sono risultati atossici. Il lavoro ha permesso di evidenziare l'effetto di differenti surfattanti e co-surfattanti sulle proprietà dimensionali delle SLN e come perciò sia importante studiare quali e quantitativamente la composizione formulativa al fine di ottenere stabili SLN *green* impiegando sostanze con un buon profilo di sicurezza e di rispetto ambientale.

Introduzione

Le nanoparticelle solide lipidiche (SLN) sono state introdotte nel 1991 come alternativa ai *carrier* colloidali tradizionali quali i liposomi e le emulsioni; sono state sviluppate con lo scopo di superare gli svantaggi associati a questi ed utilizzate per il rilascio controllato di farmaci ed il *targeting* sito-specifico. Grazie alle loro caratteristiche proprietà dimensionali, le nanoparticelle (NP) lipidiche offrono la possibilità nello sviluppo di nuove tecniche terapeutiche.

La riduzione delle dimensioni particellari porta spesso ad un miglioramento dei fenomeni di dissoluzione e solubilità [Müller and Peters, 1998; Jinno *et al.*, 2006]; generalmente, la riduzione al *range* nanometrico porta ad un aumento dell'area superficiale specifica, rispetto alla micronizzazione, il che la rende una strategia adatta nel migliorare le caratteristiche di dissoluzione ed esposizione sistemica di un farmaco. Le proprietà dimensionali delle NP possono anche influenzare la loro stabilità e sono tra le loro più importanti caratteristiche coinvolte nel determinarne i profili di biodistribuzione. In seguito alla somministrazione *in vivo* di farmaci attraverso *carrier* colloidali, è stato dimostrato che la distribuzione è in stretta correlazione con le dimensioni particellari e con le proprietà di superficie quali la carica e l'idrofobicità superficiale [Douglas *et al.*, 1987; Florence 1997]. In svariati studi *in vivo*, le NP veicolanti farmaci scarsamente idrosolubili hanno dimostrato di aumentare in modo significativo la biodisponibilità orale del farmaco trasportato. Hecq *et al.*, (2006) hanno provato come dimensioni comprese tra i 100 ed i 300 nm migliorino la biodisponibilità orale di farmaci poco idrosolubili. Le NP con un diametro medio compreso tra i 100 ed i 200 nm subiscono un maggiore *up-take* rispetto a particelle di più grosse dimensioni nel tessuto intestinale [Desai *et al.*, 1997; Caldorera-Moore *et al.*, 2010]; tuttavia anche particelle più grandi (400 nm) si sono mostrate adatte nella veicolazione orale di farmaci [Sarmiento *et al.*, 2007].

Le dimensioni delle NP lipidiche sono influenzate da diversi parametri [Ekambaram *et al.*, 2012; Mehnert and Mäder, 2012] quali la composizione della formulazione (miscela di surfattanti/co-surfattanti, proprietà del lipide e del farmaco incorporato) [Siekmann and Westesen, 1992; Abdelbary and Fahmy, 2009], i metodi e le condizioni di produzione (tempo, temperatura, pressione, numero di cicli, strumentazione, sterilizzazione e liofilizzazione) [Kima *et al.*, 2005; Kuo *et al.*, 2008].

È stato documentato che SLN stabilizzate con miscele di surfattanti hanno minor diametro medio e maggiore stabilità rispetto a formulazioni con un solo surfattante [Siekmann and Westesen, 1992]. Cavalli e collaboratori (1998) hanno inoltre sperimentato come il diametro di dispersioni di SLN ottenute con surfattanti ionici era considerevolmente inferiore (70 ± 2

nm) rispetto a quelle in cui venivano impiegati surfattanti non ionici (200 ± 5 nm). In generale, più piccoli diametri particellari vengono osservati scegliendo un elevato rapporto surfattante/lipide [Ekambaram *et al.*, 2012].

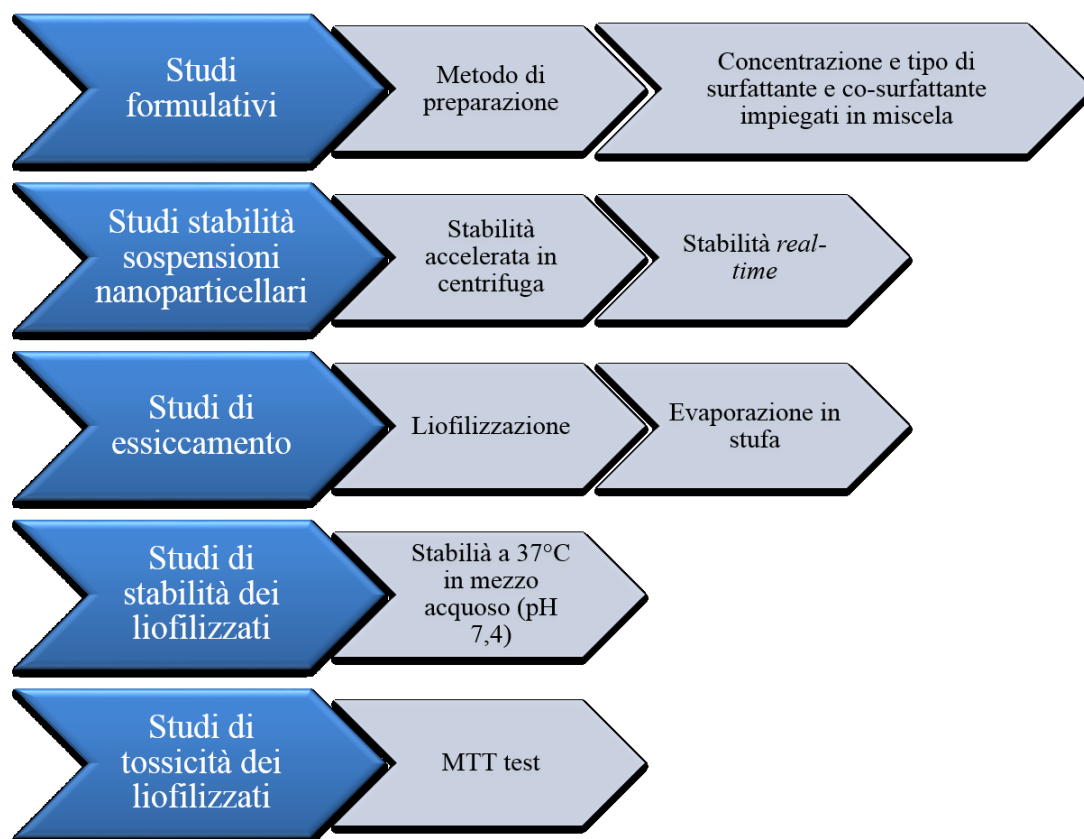
Il Tween 80 ed il PEG40 monostearato sono dei surfattanti non ionici o/a (HLB:15 e 16,7, rispettivamente). Il Tween 80 è uno tra i tensioattivi più impiegati nei prodotti farmaceutici poiché può essere incluso nella composizione di formulati parenterali. Il PEG400 monostearato (HLB:11,6) è un surfattante non ionico, derivato dall'esterificazione del PEG400 con l'acido stearico; l'Emulium® Kappa (HLB:11) ed il Plurol® Stearique (HLB:10) sono emulsionanti naturali PEG-free. L'Emulium® Kappa è un derivato di cere vegetali (crusca di riso, Candelilla, Jojoba) ed Plurol® Stearique (HLB:10) è uno stabilizzante poliidrossilico, ottenuto da fonti rinnovabili. Con la crescente attenzione nei confronti delle problematiche ambientali, le industrie farmaceutiche e cosmetiche tendono all'utilizzo di eccipienti prodotti da fonti rinnovabili. In questo senso, vi è un crescente interesse a riguardo dei surfattanti poliidrossilici. La loro influenza sulla stabilità di NP lipidiche *skin-friendly* per il trasporto di principi attivi al derma è stata oggetto di indagine in diversi lavori [Souto *et al.*, 2005; Kovacevic *et al.*, 2011;2014]. I surfattanti poliidrossilici vengono ottenuti da quelli poliossietilenici per sostituzione dell'ossido di etilene con gruppi idrossilici. Il differente tipo di interazione tra la porzione idrofilica con quella idrofobica del surfattante si riflette sull'HLB e sulle proprietà stabilizzanti di queste molecole.

Il burro di cacao (CB) è un eccipiente di largo impiego in campo farmaceutico. Questo ha una migliore biocompatibilità ed una minore tossicità *in vivo* se paragonato con lipidi semi-sintetici e può essere facilmente ricavato dai semi del *Theobroma cacao*; si compone di una miscela di tre classi di trigliceridi, TAG, (saturi, monoinsaturi e poliinsaturi), di cui i monoinsaturi sono la componente maggiore rappresentando più dell'80% del totale. Il principale costituente del CB è il trigliceride (grasso) derivato da acido palmitico, acido stearico ed acido oleico. Questa particolarità fa in modo che il CB abbia una struttura ed un comportamento termico simile a quello di un componente puro. Tuttavia, a causa della principale presenza di TAG nella sua composizione, come per la maggior parte dei lipidi, il CB mostra un complesso polimorfismo [Loisel *et al.*, 1998]. Esiste una ben nota relazione tra il fenomeno della cristallizzazione e la struttura del CB [Willie and Lutton, 1966; Marangoni and McGauley, 2003]. La cristallinità e le cinetiche di transizione polimorfica del lipide dovute alla cristallizzazione delle nanoparticelle possono venire influenzate, oltre che dal riscaldamento, anche dagli stabilizzanti [Garti and Yano, 2001; Bunjes *et al.*, 2002]. Il potere degli stabilizzanti sulla cristallizzazione è di grande importanza nella formulazione di NP

lipidiche ottenute da lipidi basso fondenti; fenomeno che è stato esteso anche a riguardo delle dimensioni particellari [Garti and Yano, 2001].

L'obiettivo del lavoro è stato quello di sviluppare delle SLN *green* a base di CB come *carrier* per molecole idrofile e termosensibili destinate alle somministrazione orale. In letteratura sono pochi i lavori in cui il CB è stato impiegato nella formulazione di sistemi nanoparticellari [Kima *et al.*, 2005;Attama *et al.*, 2007]. Il lavoro è stato inoltre finalizzato all'esame dell'influenza di miscele di co-surfattanti/surfattanti sulle caratteristiche delle SLN e sulla loro stabilità fisica. In questo studio, i surfattanti poliidrossilici sono stati oggetto di indagine per la loro capacità nello stabilizzare NP lipidiche aventi come matrice un ben noto eccipiente naturale quale il CB.

La tecnica della doppia emulsione ($a_1/o/a_2$) è stata qui scelta per la preparazione delle SLN in modo da sostituire la classica tecnica dell'omogeneizzazione a caldo. Evitare l'utilizzo di calore durante la fase di preparazione è uno dei principali vantaggi associati a questa tecnica, interessante per la preparazione e formulazione di micro e nano sistemi come vettori per farmaci termosensibili quali i peptidi [Sarmiento *et al.*, 2007], le proteine [Xie *et al.*, 2008;Qi *et al.*, 2011] e gli oligonucleotidi [Delie *et al.*, 2001;Patil and Panyam, 2009;Zhang *et al.*, 2013]. In aggiunta, il riscaldamento influenza spesso il processo di ri-cristallizzazione del CB.



Schema illustrante le principali fasi del lavoro.

Metodi

Materiali

Il burro di cacao deodorizzato (CB) (acido palmitico 26,7%, acido stearico 34,7%, acido oleico 33%, acido linoleico 2,9%), il polietilenglicole 40 monostearato (PEG40 MS), il polietilenglicole 400 monostearato (PEG400 MS) ed il polivinilpirrolidone F.U.I. (PVP) sono stati acquistati da Cruciani prodotti Crual s.r.l., Roma, Italia. L'Emulium® Kappa2 (EK) ed il Plurol® SteariqueWL 1009INCI: poligliceril-6-distearato (PS), sono stati gentilmente donati da Gattefossé (Gattefossé SAS, Saint-Priest Cedex, Francia). Il Tween 80 è stato acquistato da Aeros Organics, Gees, Belgio; il diclorometano (DCM) (CH_2Cl_2) è stato acquistato da Merck KGA, Darmstadt, Germania. L'acqua è stata ottenuta da un sistema di purificazione Milli-Q R4, Millipore, Milano, Italia.

Preparazione delle SLN

Le nanoparticelle solide lipidiche (SLN) sono state preparate tramite la tecnica della doppia emulsione $a_1/o/a_2$.

Emulsione primaria a_1/o . Inizialmente, la fase oleosa è stata ottenuta per solubilizzazione di 500 mg di CB in 10 mL di CH_2Cl_2 e quindi per aggiunta del co-surfattante (PEG400 MS, EK o PS) nella quantità di 0,1, 0,15 o 0,2 g. Un mL di acqua è stato successivamente addizionato goccia a goccia, sotto costante agitazione magnetica e, l'emulsione a/o , omogeneizzata in Ultra-Turrax (Ultra-Turrax®, T 25, IKA) a 17600 rpm per 30 sec. L'emulsione primaria è stata preparata per un teorico caricamento con farmaci idrosolubili.

Doppia emulsione $a_1/o/a_2$. Sotto costante agitazione magnetica, l'emulsione primaria è stata versata goccia a goccia in una soluzione acquosa (100 mL) del surfattante (Tween 80 o PEG40 MS) ed omogeneizzata in Ultra-Turrax a 17600 rpm per 40 sec, al fine di raggiungere una dispersione dell'emulsione a/o nella fase acquosa del surfattante. La formazione delle SLN in dispersione è avvenuta per evaporazione del solvente organico sotto blanda e continua agitazione magnetica a temperatura ambiente ($22\pm 1^\circ\text{C}$). In [Tab. 1](#) e [Tab. 2](#) vengono illustrati i parametri di processo e formulativi impiegati. La concentrazione del solido totale nelle diverse formulazioni è stata di 1,6% p/v, 1,65% p/v e 1,7% p/v a seconda delle quantità di co-surfattante usato. Ciascun campione è stato preparato in triplicato.

Misura delle dimensioni e del potenziale zeta

Tutte le formulazioni delle SLN in dispersione e quelle liofilizzate **A3_L**, **C1_L** ed **E1_L** (scelte sulla base dell'analisi dimensionale delle dispersioni e dei test di stabilità), sono state

analizzate dimensionalmente mediante spettroscopia di correlazione fotonica (PCS) utilizzando il Coulter nanosizer N5 (Beckman-Coulter Inc. Miami, FL, USA). I risultati sono stati espressi come diametro medio (dm) \pm deviazione standard (DS). È stato inoltre valutato l'indice di polidispersione (PI) in modo da stimare l'omogeneità dimensionale delle SLN. Le misure sono state effettuate con un angolo di 90° a 20°C. Ciascuna formulazione è stata analizzata in triplicato e tutte le misurazioni sono state ripetute tre volte per ciascun campione.

Il potenziale zeta delle SLN è stato misurato nelle dispersioni delle formulazioni diluite in acqua; tutte le analisi sono state effettuate in triplicato. La mobilità elettroforetica delle dispersioni è stata ottenuta tramite anemometria laser doppler (Particle sizing System PSSNICOMP - 380 ZLS, FL, USA).

Test di stabilità

Per valutare la stabilità delle SLN in dispersione i test sono stati eseguiti sia in condizioni accelerate che in *real time*.

Stress in centrifuga

I test di stress in centrifuga sono stati condotti a 3000 rpm per 30 min a 20°C (Centrifuge 5702 R, Eppendorf, Hamburg, Germany) su un volume di 10 mL per ciascuna formulazione delle SLN in dispersione [Anchisi *et al.*, 2001]. La stabilità delle formulazioni viene valutata sulla base del *creaming* prodotto.

Test di stabilità real time

Le dimensioni e la distribuzione dimensionale dopo 15 e 30 giorni sono state misurate nelle dispersioni prodotte in modo da determinarne la stabilità nel tempo. Dieci mL di ciascuna dispersione è stata conservata a 5 °C ed analizzata per PCS. Ciascun formulato è stato analizzato in triplicato e le misurazioni sono state ripetute tre volte per ogni campione.

Essiccamento delle SLN

Le dispersioni acquose delle SLN sono state liofilizzate al fine di essiccare le formulazioni. Nello specifico, le nano-dispersioni, indicate come **A3**, **C1** ed **E1**, sono state prima addizionate di un crioprotettore avente il compito di evitare il fenomeno della coalescenza delle NP in seguito al processo di liofilizzazione [Schwarz and Mehnert, 1997; Cavalli *et al.*, 1997; Zimmerman *et al.*, 2000; Spada *et al.*, 2012]. Studi preliminari sono stati effettuati per la scelta del crioprotettore più adatto (dati non riportati). Dieci mL di una soluzione acquosa di PVP (10% p/v) sono stati miscelati con 10 mL di ogni campione di SLN in dispersione; la

miscela è stata congelata per una notte a -80°C e liofilizzata tramite Lio 5P freeze-drier (Cinquepascal srl Milan, Italia). La liofilizzazione è stata condotta a -54°C sotto vuoto (0,909 bar) per un tempo sufficiente (5 h) ad ottenere SLN essiccate. Al termine del processo, sono state ottenuti i campioni delle SLN essiccate denominati **A3_L**, **C1_L**, **E1_L**.

Per verificare l'effetto del processo di essiccamento sulla struttura del CB, le nanodispersioni **A3**, **C1** ed **E1** sono state anche essiccate in forno ventilato a 28°C per ottenere i campioni **A3_E**, **C1_E** ed **E1_E**.

Comportamento delle SLN liofilizzate a 37°C

Per indagare il comportamento delle SLN alla temperatura corporea (37°) in previsione di una somministrazione orale o rettale, ne è stata determinata la stabilità valutando eventuali variazioni delle proprietà dimensionali. Nel dettaglio, **A3_L**, **E1_L**, **C1_L** sono state sospese in acqua quindi trasferite in un bagno termostato a 37°C e mantenute in costante agitazione magnetica. I campioni sono stati prelevati dopo 15, 30, 60, 120 min ed analizzati per il dm ed il PI. Il test è stato eseguito in triplicato.

Analisi ai raggi X

La diffrazione a raggi X è una tecnica analitica volta all'identificazione ed alla determinazione quali/quantitativa delle fasi cristalline presenti in polveri e campioni solidi.

Il CB come tale, le formulazioni essiccate per liofilizzazione (**A3_L**, **C1_L** ed **E1_L**) e per evaporazione (**A3_E**, **C1_E** ed **E1_E**) sono state depositate su un portacampioni, un monocristallo di silicio a basso *background* (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Germania) ed analizzate per diffrazione ai raggi X. Le misure sono state effettuate per mezzo del Bruker D2-Phaser Diffractometer (geometria theta-theta; radiazione $\text{CuK}\alpha$) munito di un rilevatore 1-Dimensional PSD LynxEye con un'apertura di 5° . I parametri operativi applicati sono stati di 30 kV, 10 mA, 2theta range $6-35^{\circ}$, step size $0,02^{\circ}$ (2θ), tempo per step 0,5 s (tempo totale ≈ 12 min). Lo strumento è stato calibrato con Corundum Standard Reference Material 1976b (National Institute of Standards & Technology, Gaithersburg, MD-USA). Lo *spinner* è stato disattivato per evitare riscaldamento del campione. La temperatura è stata monitorata sia all'interno che all'esterno della camera di analisi del diffrattometro utilizzando il registratore di dati Ebro EBI 20-T1 *data logger* (Ebro Electronic, WTW GmbH, Germany). Le analisi sono state condotte ad una temperatura di laboratorio di $21\pm 0,3^{\circ}\text{C}$ e non eccedenti i 26°C nel diffrattometro. Ogni campione è stato analizzato due volte, e la seconda misurazione immediatamente dopo la prima; la coppia dei pattern di raggi X è stata confrontata per

verificare la stabilità della struttura del campione durante l'analisi. I pattern di diffrazione sono stati ottenuti usando Bruker DIFFRAC^{plus} Evaluation Package.

Test di vitalità cellulare (MTT test)

Tramite il test del bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) [Mosmann, 1983] sono state saggiate sia le SLN liofilizzate (**A3_L**, **E1_L**) che i singoli componenti. La tossicità cellulare è stata valutata in linee cellulari Caco-2 prese come modelli di epitelio intestinale. Le Caco-2 (2x10⁵ cell./pozzetto, piastre da 24 pozzetti) sono state incubate per 24h dopo aver sospeso uniformemente, al di sopra del monostrato cellulare, **A3_L** ed **E1_L** con una concentrazione in SLN di 15 e 30 mg/pozzetto (7,5 mg/mL o 15 mg/mL) (quantitativo riferito all'esatta quantità di SLN senza crioprotettore); parallelamente le cellule sono state incubate con i componenti delle formulazioni: CB, PEG400 MS, Tween 80, PS, PVP.

L'MTT, substrato per gli enzimi deidrogenasi, viene trasformato solo dalle cellule vitali in cristalli colorati di formazan. I cristalli sono stati solubilizzati in DMSO e l'assorbanza misurata a 570 nm (Thermo-Spectronic, Helios Gamma, UK). La vitalità viene espressa in percentuale rispetto alle cellule non trattate. L'esperimento è stato prodotto in triplicato.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati usando l'analisi della varianza (ANOVA). Le differenze individuali tra i dati sono stati identificate mediante test post-hoc non-parametrici, Tukey's o Dunnet's test. I valori sono stati espressi come media ± deviazione standard (DS). Livelli di p<0,05 sono stati considerati come statisticamente significativi.

Risultati

Preparazione delle SLN

Le SLN a base di CB sono state formulate grazie alla tecnica del doppio emulsione a₁/o/a₂ combinata con un'omogeneizzazione di tipo meccanico. Il metodo impiegato ha presentato diversi vantaggi quali semplicità, rapidità e basso costo. La procedura preparativa (costante agitazione magnetica/omogeneizzazione in Ultra-Turrax) più il processo di essiccamento hanno favorito l'eliminazione del DCM dalle particelle: è dimostrato che in queste condizioni si ha un completo allontanamento del solvente organico o, al limite, una sua presenza in tracce [Bittner *et al.*, 1998; Anarjan *et al.*, 2012; Spada *et al.*, 2012]. Inoltre la metodica ha consentito di lavorare in blande condizioni di temperatura e stress meccanici, fondamentale qualora si renda necessario lavorare con farmaci sensibili al calore e/o ad

elevate forze di taglio e con matrici quali il CB per il quale il riscaldamento influenza i processi di ri-cristallizzazione. Tuttavia, le proprietà fisico-chimiche delle SLN dipendono dai componenti impiegati. Le dispersioni **A-F** hanno mostrato un aspetto lattescente.

Caratterizzazione delle SLN

Le dispersioni sono state caratterizzate nel dm e nel PI e valutate a seconda del:

1. Surfattante: confronto tra le formulazioni **A vs B**, **C vs D**, **E vs F** ([Fig. 1a, b, c](#));
2. Co-surfattante: confronto tra il gruppo **A-C-E** e **B-D-F** ([Fig. 2a, b](#)).

L'analisi sulle proprietà dimensionali ha mostrato come queste vengano chiaramente variate dal surfattante: alle stesse concentrazioni, il Tween 80 (serie **A** ed **E**) ha portato a particelle più piccole ed uniformi rispetto al PEG40 MS (serie **B** ed **F**), (**A vs B** and **E vs F**, $p < 0,05$); quando il Tween 80 è stato combinato con il co-surfattante PEG400 MS o con il PS, il dm delle NP è sceso a 400 nm.

I formulati **A3** contenenti Tween 80, hanno mostrato un dm di circa 300 nm, più che dimezzato rispetto ai corrispondenti **B3** (700 nm) stabilizzati con PEG40 MS (**A3 vs B3** $p < 0,05$) ([Fig. 1a](#)). Analogo discorso può essere fatto per la formulazione **E3** (390 nm), impiegante il Tween 80, rispetto alla **F3** (600 nm) (**E3 vs F3** $p < 0,05$) ([Fig. 1c](#)). In tutti i casi, il dm è stato indipendente alla concentrazione di co-surfattante presente, ad eccezione della serie **B** (in cui con meno di 1,5% di PEG400 MS si è avuto aumento dimensionale, per cui le dimensioni di **B1** sono sempre maggiori di **B2** e **B3** ($p < 0,05$)). Scegliendo invece EK come co-surfattante ([Fig. 1b](#)) si è avuto un notevole incremento dimensionale, evento testimoniato dalla serie **C** in cui i dm sono arrivati oltre l'intervallo nanometrico (~1000 nm).

La combinazione surfattante/co-surfattante ha giocato senza dubbio un ruolo importante nel determinare il dm ed il PI delle SLN a base di CB: il Tween 80 ha dato i migliori risultati quando combinato con i co-surfattanti PEG400 MS o PS. Tuttavia, per ottenere bassi PI la concentrazione del co-surfattante da impiegare può essere varia anche se in **A1** il PI di 0,4 è rimasto invariato all'aumento del co-surfattante (**A3**) ($p < 0,05$). Al contrario, il PI di **E1** è passato da 0,6 a 0,4 all'aumento del PS (**E1 vs E3** $p < 0,05$). Ciò potrebbe significare che i co-surfattanti *green* si dovrebbero impiegare in concentrazioni leggermente più elevate rispetto ai PEG.

Nello studio dell'effetto del co-surfattante, le formulazioni sono state divise nei gruppi **A-C-E** e **B-D-F** e questi paragonati tra loro. I risultati vengono mostrati in [Tab. 3](#) ed in [Fig. 2a, b](#), dai quali si deduce come, quando il Tween 80 è stato utilizzato come tensioattivo, il PEG400 MS ed il PS sono stati i co-surfattanti che hanno portato a particelle più piccole rispetto ad EK: il dm di **A** ed **E** è stato significativamente inferiore a **C** ($p < 0,05$). La loro

concentrazione non ha avuto influenza sulle dimensioni ma sul PI. È chiaro che la combinazione Tween 80-EK non ha portato a NP omogenee. Al contrario, si sono osservate scarse differenze dimensionali tra **B-D-F** (Fig. 2b) anche se le formulazioni con PS al 2% hanno mostrato le minori dimensioni (**F3** vs **B3** e **D3** $p < 0,05$). In questo caso, l'aumento del co-surfattante ha garantito SLN più piccole, infatti il dm di **F3** è stato statisticamente inferiore di **F1** e **F2** ($p < 0,05$). Le formulazioni contenenti PEG400 MS, all'aumentare di questo, sono divenute meno omogenee (**A1** vs **A3** $p < 0,05$ e **B1** vs **B3** $p < 0,05$); il qual fenomeno è stato più marcato con lo stabilizzante PEG 40 MS. In aggiunta, EK non ha permesso di avere SLN monodisperse; il PI è aumentato con l'aumento della concentrazione, con Tween 80 come surfattante. Il PS, invece, ha portato a bassi PI anche passando da 2% a 1,5%.

Il PI di tutti i sistemi è stato spesso maggiore di 0,4, probabilmente a causa della tecnica impiegata e delle combinazioni tra i componenti le formulazioni.

Il potenziale zeta di **A3** ed **E1** è risultato rispettivamente di $-29,15 \pm 1,49$ mV e $-43,46 \pm 4,83$ mV, valori che in via teorica, potrebbero assicurare buona stabilità fisica. Come testimoniato in letteratura, valori di potenziale zeta di $|30|$ mV portano a buona stabilità fisica, eccellente se intorno a $|60|$ mV [Müller, 1996].

Test di stabilità

Stress in centrifuga

Dopo centrifugazione tutte le formulazioni sono state stabili: nessun *creaming* o precipitato è stato prodotto.

Stabilità real time

Il monitoraggio della stabilità nel tempo si è esteso dal giorno della preparazione (0 gg) sino ai 15 e 30 giorni successivi (Tab. 4).

Le dispersioni **A1** sono state meno stabili di **A2** ed **A3**, a causa della minore percentuale di co-surfattante (PEG400 MS), ed hanno subito un incremento nel dm dopo 15 giorni ($p < 0,05$), con una stabilizzazione a $370 \text{ nm} \pm 38$ sino ai 30 giorni (**A1**_{15gg} vs **A1**_{30gg} $p > 0,05$). Al contrario, **A2** ed **A3** sono state stabili nel tempo ($p > 0,05$). In un mese, il PI è rimasto invariato indipendentemente dalla concentrazione del co-surfattante.

Quando è stato impiegato il PS la sua concentrazione non ha influenzato la stabilità dei formulati **E** (**E1-E3**). Fenomeno opposto è stato dato dai preparati **C** che, al giorno della preparazione (0 gg), hanno mostrato elevati dm e PI, parametri che sono migliorati nel tempo; ciò potrebbe indicare che la diminuzione dimensionale sia stata dovuta alla formazione di aggregati nell'iniziale fase preparativa (Fig. 3). Nel dettaglio, **C1-C3** al giorno

0 hanno mostrato rispettivamente un dm di: 911,54; 991,13; 975,39 nm ed al giorno 30 di: 446,18; 514,22; 533,96 nm, senza significative differenze date dalla concentrazione di co-surfattante ($p < 0,05$). I valori raggiunti ai 30 gg non sono stati molto distanti da quelli di **A3_L** ed **E3_L** al momento della preparazione. Il PI non è cambiato statisticamente dopo un mese.

Le formulazioni **B** sono state stabili nel tempo sia per dm che PI, eccetto B1 in cui il dm è diminuito dopo 15 giorni (**B1_{0gg}** vs **B1_{15gg}** $p > 0,05$).

Anche per la serie **D** nessun cambiamento dimensionale nel tempo, ma leggera diminuzione di PI indipendentemente dalla concentrazione di co-surfattante ($p > 0,05$).

Al contrario, i PI dei campioni **F** sono aumentati nel tempo (**F1_{0gg}** vs **F1_{15gg, 30gg}**; **F2_{0gg}** vs **F2_{15gg, 30gg}**; **F3_{0gg}** vs **F3_{15gg, 30gg}** $p < 0,05$). Il loro dm è stato stabile, anche se l'uso di basse concentrazioni di PS ha fatto sì che in **F1** il dm aumenti ai 30 gg.

Essiccamento delle SLN

Grazie ai migliori risultati ottenuti nei test di stabilità, solo le dispersioni di **A3**, **E1** e **C1** sono state liofilizzate utilizzando il PVP come crioprotettore.

Le polveri di ciascuna formulazione essiccata sono state risospese in ultrasuoni ed è stato valutato l'effetto del processo di essiccamento sulle proprietà dimensionali delle SLN. I risultati hanno mostrato come il dm cambi significativamente, seppur di poco, nel caso di **A3_L** (**A3_L** vs **A3** $p < 0,05$). Una diminuzione marcata è stata data, invece, passando da **C1** a **C1_L** ($p < 0,05$), probabilmente grazie agli ultrasuoni ([Fig. 4](#)).

Per stimare anche il ruolo del processo di essiccamento sulla struttura di CB, **A3**, **C1** ed **E1** sono state essiccate per evaporazione in stufa ventilata a 28°C ottenendo le corrispondenti **A3_E**, **C1_E** ed **E1_E**, che a temperatura ambiente si sono presentate come materiali solidi e plastici (plasmabili). Ciò suggerisce che i formulati preparati a 22°C si sono ottenuti in forma di dispersioni piuttosto che emulsioni.

Comportamento delle SLN a 37°C

Di **A3_L**, **E1_L** e **C1_L** è stata esplorata la stabilità alla temperatura media corporea di 37°C mediante analisi dei dati dimensionali dopo 15, 30, 60, 120 min nelle condizioni impiegate nel test. L'analisi a 0 min corrisponde alla dispersione acquosa dei liofilizzati antecedente il test. Dopo 15 min, il dm di **A3_L** ed **E1_L** ha raggiunto valori di 320 nm indipendentemente dal tipo di co-surfattante impiegato. I parametri dimensionali si sono stabilizzati, senza alcuna differenza significativa, dopo 30 min ([Fig. 5](#)).

Per **C1_L** la riduzione particellare si è osservata dopo 15 min a 37°C, il diametro si è dimezzato senza ulteriori cambiamenti significativi sino alle 2h ($p < 0,05$). Al contrario il PI è

raddoppiato. Il fenomeno osservato conferma la teoria della presenza di aggregati particellari durante la preparazione e l'ipotesi che il Tween 80 ed EK combinati insieme non siano in grado di garantire la formazione di sistemi omogenei di NP.

Analisi ai raggi X

Le formulazioni **A3**, **E1** e **C1** aventi surfattante Tween 80 e vari co-surfattanti sono state selezionate e liofilizzate con PVP come crioprotettore. In alternativa, l'essiccamento per liofilizzazione è stato sostituito con quello per evaporazione in stufa termo-ventilata. Le polveri disidratate con entrambi i metodi sono state analizzate ai raggi X onde stimare l'influenza del processo di essiccamento sulle proprietà chimico-fisiche del CB nelle SLN.

Il pattern di diffrazione ai raggi X (XRPD) del campione CB ([Fig. 6](#)), corrisponde al polimorfo β (VI) del CB [[Wille and Lutton 1966](#); [Schenk and Peschar, 2004](#); [Guthrie et al., 2005](#)]. In particolare, il profilo di diffrazione è stato molto simile a quello della forma β (VI) del CB di Bahia (Brasile) come indicato da [Van Langevelde et al. \(2001\)](#).

La forma a campana del *background* osservata nei pattern XRPD di **A3_E**, **C1_E** ed **E1_E** è stata dipendente dalla struttura parzialmente amorfa di tali campioni ([Fig. 6](#)). D'altra parte, il CB è stato presente anche nella fase cristallina β , come messo in evidenza dai picchi nei pattern XRPD. Più precisamente, la posizione e l'intensità dei picchi nel *range* di $22\div 24^\circ$ dei profili di diffrazione di ***A3_E**, ***C1_E** ed ***E1_E** (sottratti del *background*) sono stati compatibili con il polimorfo β (V) del CB [[Wille and Lutton 1966](#); [Van Langevelde et al., 2001](#); [Schenk and Peschar, 2004](#); [Guthrie et al., 2005](#)].

I profili di **A3_L**, **C1_L** ed **E1_L** hanno indicato come queste formulazioni siano state essenzialmente amorfe ([Fig. 6](#)), infatti sono state ritrovate solo tracce del picco principale del β -CB sovrapposte al profilo di diffrazione del PVP, il polimero amorfo impiegato come crioprotettore [[Xiao-Yan et al., 2012](#)].

Nessuno dei campioni analizzati ha mostrato differenze tra i pattern ai raggi X derivanti dalla prima e seconda misurazione effettuata, indicando come la struttura non venga modificata nel corso dell'analisi stessa.

Test di vitalità cellulare (MTT test)

Il test ha validato l'atossicità delle formulazioni **A3_L** ed **E1_L** (SLN = 7,5 mg/mL) ed i loro componenti. Al contrario, con una concentrazione in SLN pari a 15 mg/mL (la più alta testata) la tossicità ha portato ad una perdita di vitalità cellulare al $48,68\pm 0,92\%$ (**A3_L**) e $66,11\pm 11,11\%$ (**E1_L**) rispetto al controllo ($p < 0,05$). Questo è in accordo con [Doktorovova et al. \(2014\)](#) in cui viene spiegata la correlazione tra la concentrazione testata e la vitalità

cellulare. Tuttavia, non è trascurabile l'effetto di alcuni componenti: particolarmente al Tween 80, come già riportato in letteratura, sono attribuiti effetti citotossici [Muller *et al.*, 1997; Arechabala *et al.*, 1999; Gavini *et al.*, 2011; Geys *et al.*, 2010]. Di fatto, il Tween 80 così come il PEG400 MS hanno ridotto, rispettivamente, la vitalità cellulare a valori di $8,44 \pm 4,58\%$ e $61,67\% \pm 3,16$ (Fig. 7). Le concentrazioni impiegate sono state di 9,1 mg/mL (Tween 80) e di 1,76 mg/mL (PEG 400 MS), quantità corrispondenti a quelle contenute in 15 mg/mL di SLN.

Le differenze osservate tra **A3_L** ed **E1_L** sono state riconducibili al co-surfattante impiegato. A differenza del PEG400 MS, utilizzato in **A3_L**, il Plurol® Stearique di **E1_L** non ha compromesso la vitalità cellulare.

Discussione

Il CB è ampiamente utilizzato nei prodotti cosmetici e farmaceutici, ma in questo studio è stato utilizzato con successo come matrice lipidica per lo sviluppo di SLN concepite come sistemi di veicolazione di farmaci per via orale.

Il metodo preparativo a₁/o/a₂ ha permesso di ottenere NP di CB, consentendo un ipotetico incapsulamento di farmaci idrofilici e termosensibili in una matrice lipidica *green*.

Le proprietà dimensionali e la stabilità di queste particelle sono state dipendenti dai parametri formulativi ed in particolare dalla miscela surfattante/co-surfattante impiegata. Come co-surfattanti sono stati utilizzati il PEG400 MS e due emulsionanti PEG-*free* quali il PS ed l'EK.

Gli studi dimensionali volti all'indagine dell'effetto delle varie combinazioni tra surfattanti e co-surfattanti, hanno rivelato che il Tween 80 è stato in grado di garantire i migliori risultati se associato con PEG400 MS o con il PS. Le formulazioni con PS si sono distinte per essere le più stabili nell'arco di un mese, a prescindere dalla sua concentrazione. Le miscele surfattanti/co-surfattanti hanno mantenuto le SLN stabili in sospensione anche post stress da centrifugazione. Le piccole dimensioni delle particelle permettono che queste siano cinematicamente stabili a discapito di fenomeni di sedimentazione e *creaming* [Fernandez *et al.*, 2004; Ee *et al.*, 2008]. Diversi autori hanno provato come la scelta degli emulsionanti e la loro concentrazione abbia un forte impatto sulla stabilità e dimensioni di SLN in dispersione: una diminuzione nella concentrazione di tensioattivo induce spesso un aumento dimensionale delle particelle durante il tempo [Ekambaram *et al.*, 2012].

Le formulazioni della serie C si sono distinte, invece, per i maggiori cambiamenti nei parametri dimensionali. Comportamento attribuibile alla presenza del co-surfattante EK, unica variante rispetto alla composizione dei formulati E. EK ha una complessa composizione chimica. Contiene cere vegetali quali quella della crusca di riso e della Candelilla la quale è capace di trattenere elevate quantità di acqua. L'altra cera contenuta, quella di Jojoba, grazie al suo stato fisico liquido facilita la spalmabilità. La ricombinazione di queste cere, in proporzioni equilibrate, e la funzionalizzazione con il poliglicerolo ha prodotto un derivato con notevoli proprietà sensoriali e capacità di trattenere acqua in quantità sei volte maggiore del suo peso, formando una sorta di cuscinetto acquoso se applicato sulla pelle [Gattefossé: *Emulium Kappa2 Brochure*]. In presenza di acqua, le cere formano una rete di cristalli liquidi intorno alle sue gocce. Come conseguenza, l'impiego di EK ha generato grosse particelle. Tuttavia, queste si sono rimpicciolite nel tempo e dopo liofilizzazione: il fenomeno potrebbe essere dovuto ad un riarrangiamento della struttura del lipide dovuto all'espulsione di acqua trattenuta in precedenza, il che conferma i risultati

ottenuti nei test di stabilità. Le dispersioni non hanno raggiunto comunque l'omogeneità, poiché il PI è aumentato sino a 0,9. Diversamente, il PS è un estere poliglicerico con minori capacità di ritenzione di acqua rispetto sia ad EK che al PEG. Quindi le formulazioni con PS hanno mostrato un'elevata stabilità e nessun cambiamento delle proprietà dimensionali dopo liofilizzazione. Il sodio stearil lactilato è il secondo componente di EK ed è dotato di buone capacità emulsionanti. Infine, EK contiene anche degli agenti di consistenza che aiutano a stabilizzare la viscosità delle formulazioni sotto elevate temperature. Al calore, la viscosità aumenta e l'emulsione consistente potrebbe avere reso difficile la dispersione particellare conducendo ad elevati valori di PI.

Sia le formulazioni **A3** che **E1** hanno mostrato elevati, ma significativamente differenti, valori di potenziale zeta: in questi la matrice lipidica ed il surfattante adoperati sono stati gli stessi ed il potenziale zeta è quindi stato solo in relazione al diverso co-surfattante.

Dallo studio sull'effetto dei componenti sulle proprietà fisiche delle SLN ne risulta, così, la necessità di una accurata selezione nell'utilizzo degli stabilizzanti più adatti per SLN in dispersione.

Ipotizzando un uso interno delle SLN e considerando il basso punto di fusione del CB, si è saggiata la stabilità di formulazioni selezionate nei confronti della temperatura media corporea umana: 37°C. Sia i preparati **A3_L** che **E1_L** hanno subito una diminuzione dimensionale ai 30 min, rimasta inalterata sino ai 120 min. Potrebbe essere avvenuta una fusione del lipide seguita da una sua successiva cristallizzazione con la formazione di particelle con dimensioni inferiori di quelle iniziali [Sanna *et al.*, 2003]. Lo stesso è stato osservato anche per **C1_L**, ma ad un miglioramento (diminuzione dimensionale) del dm, è corrisposto un parallelo peggioramento dell'uniformità dimensionale che si è manifestato in elevati valori di PI al termine del test. Si conferma perciò la teoria della formazione di aggregati particellari subito dopo l'allestimento delle formulazioni e l'ipotesi che insieme il Tween 80 e l'EK non formino un sistema nanoparticellare stabile ed omogeneo. Il comportamento non può essere giustificato dai valori di HLB, non molto diversi tra i vari co-surfattanti (PS<EK<PEG), ma piuttosto dai peculiari componenti di EK come i derivati di cere e gli agenti di consistenza.

La letteratura riporta gli effetti dei surfattanti sulla struttura della matrice lipidica, che è responsabile delle proprietà dimensionali e/o della stabilità fisica. Comunque, dall'analisi ai raggi X non è emerso nessun dato evidente sull'influenza della miscela di surfattanti/co-surfattanti sulla cristallinità delle SLN, sebbene una conferma andrebbe ricercata con un'analisi a raggi X a basso angolo (SAXS).

Il metodo di essiccamento ha inciso sulla struttura della matrice lipidica dei formulati. Il rapido raffreddamento del processo di liofilizzazione non ha permesso che il CB si sia arrangiato in una struttura ordinata in **A3**, **C1** ed **E1**, anche se il polimorfo β si è presentato in tracce. Al contrario, quando le nanodispersioni sono state disidratate per evaporazione a 28°C, dalla stessa formulazione si è potuto nucleare il polimorfo β del CB, ma la fase amorfa è rimasta comunque presente. Sarebbe interessante indagarne la stabilità nel tempo (alle usuali temperature di conservazione per farmaci) delle formulazioni liofilizzate ed evaporate, poiché i polimorfi $\beta(V)$ e $\beta(VI)$ sono stabili, mentre la forma amorfa cambia. Va notato che il CB solubilizzato in DCM sembra non seguire le stesse modalità di cristallizzazione date dal CB fuso. In realtà, nelle condizioni sperimentali adottate, la nucleazione della fase β (solo in tracce nei materiali liofilizzati, ma chiaramente presente in quelli evaporati) dovrebbe essere riconducibile al cosiddetto “effetto memoria” del CB [Van Langevelde *et al.*, 2001; Schenk and Peschar, 2004; Guthrie *et al.*, 2005].

È improbabile che il CB sia tossico ai livelli medi di consumo umano grazie alla scarsa tossicità dei singoli acidi grassi presenti nella sua composizione [Product Integrity Philip Morris USA]. Invece, i surfattanti sono spesso causa di morte cellulare, per cui se impiegati nel processo formulativo, dovrebbero essere saggiati in citotossicità. Sono stati documentati eventi di morte cellulare da surfattanti presenti in alcuni formulati [Ujhelyi *et al.*, 2012]. Come già indicato, il Tween 80 ha mostrato attività citotossica quando usato nell’allestimento di sistemi nanoparticellari; il che spiega il perché molti autori lavano le particelle prima di testarne le azioni citotossiche [Gavini *et al.*, 2011].

Conclusioni

Il burro di cacao è stato utilizzato come matrice lipidica per la preparazione delle SLN; la tecnica della doppia emulsione ha permesso di ottenere sospensioni di SLN con dimensioni particellari dipendenti dalla miscela di surfattante/co-surfattante impiegata. La migliore combinazione è stata data da Tween 80 e PEG400 MS o PS; la concentrazione del co-surfattante è risultata essere ugualmente un importante parametro formulativo.

La composizione dei preparati si è basata principalmente sull’impiego di materiali *green*. Al giorno d’oggi, grazie alla maggiore attenzione per il rispetto ambientale, le industrie farmaceutiche e cosmetiche ricercano e scelgono prodotti provenienti da fonti rinnovabili, tra questi vi è un crescente interesse per i surfattanti poliidrossilici. Inoltre, soprattutto le industrie cosmetiche prediligono stabilizzanti PEG-free. Tuttavia, anche se l’Emulium® Kappa2 rientra in tale categoria, a causa della sua composizione, non si è mostrato adatto per l’ottenimento di dispersioni stabili di SLN con CB. Rispetto a vari emulsionanti presenti sul

mercato, le formulazioni contenenti EK hanno maggiore tendenza a trattenere acqua, capacità responsabile della formazione di sistemi eterogenei e con particelle di grosse dimensioni.

I risultati ottenuti hanno dimostrato come le varie combinazioni di surfattante/co-surfattante abbiano una diversa influenza sulle dispersioni di SLN, la loro stabilità fisica è in relazione alla struttura dello stabilizzante e alle interazioni chimiche con il lipide. È stato inoltre evidenziato come il metodo di essiccamento influenzi la struttura lipidica delle SLN. Come conseguenza, lo sviluppo di preparati nanoparticellari solidi lipidici è perciò di difficile previsione e richiede un'analisi dettagliata dei parametri di processo e formulativi.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la Fondazione Banco di Sardegna per il supporto finanziario (Prat.2013.1382).

Si ringrazia inoltre la ditta Gattefossé (Gattefossé SAS, Francia) per le sostanze Emulium® Kappa2 e Plurol® SteariqueWL 1009.

Bibliografia

Abdelbary G, Fahmy RH. Diazepam-loaded solid lipid nanoparticles: design and characterization. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(1):211-19.

Anarjan N, Tan CP, Nehdi IA, Ling TC. Colloidal astaxanthin: preparation, characterisation and bioavailability evaluation. *Food Chem*. 2012;135(3):1303-9.

Anchisi C, Maccioni AM, Sinico C, Valenti D. Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. *Il Farmaco* 2001;56:427-31.

Arechabala B, Coiffard C, Rivalland P, Coiffard LJ, de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol*. 1999;19:163-165.

Attama AA, Schicke BC, Paepenmüller T, Müller-Goymann CC. Solid lipid nanodispersions containing mixed lipid core and a polar heterolipid: characterization. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;67(1):48-57.

Bittner B, Morlock M, Koll H, Winter G, Kissel T. Recombinant human erythropoietin (rhEPO) loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: influence of the encapsulation technique and polymer purity on microsphere characteristics. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998;45(3):295-305.

Bunjes H, Koch MH, Westesen K. Effects of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles. *Prog. Colloid Polym. Sci*. 2002;121:7-10.

Caldorera-Moore M, Guimard N, Shi L, Roy K. Designer nanoparticles: Incorporating size, shape, and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(4):479-95.

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.

Cavalli R, Caputo O, Marengo E, Pattarino F, Gasco MR. The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (SLN) containing a series of model molecules. *Pharmazie*. 1998;53:392-6.

Delie F, Berton M, Allémann E, Gurny R. Comparison of two methods of encapsulation of an oligonucleotide into poly(D,L-lactic acid) particles. *Int J Pharm*. 2001;214(1-2):25-30.

Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res*. 1997;14:1568-73.

Doktorovova S, Souto EB, Silva AM. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers - a systematic review of in vitro data. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(1):1-18.

Douglas S, Davies S, Illum L. Nanoparticles in drug delivery. *CRC Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1987;4(3):233-261.

Ee SL, Duan X, Liew J, Nguyen QD. Droplet size and stability of nanoemulsions produced by temperature phase inversion method. *Chem Eng J.* 2008;140:626-63.

Ekambaram P, Sathali AH, PriyankaK. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. *Sci. Revs ChemCommun.* 2012;2(1):80-102.

Fernandez P, Andre V, Rieger J, Kuhnle A. Nanoemulsions formation by emulsions phase inversion. *Colloid Surface A.* 2004;251:53-58.

Florence AT. The oral absorption of micro-nanoparticulates: neither exceptional nor unusual. *Pharm Res.* 1997;14(3):259-66.

Garti N, Yano J. The roles of emulsifiers in fat crystallization. In: Sato K, Garti S, ed. *Crystallization processes in fats and lipid systems.* New York: Marcel Dekker, 2001:211-50.

Gattefossé. Emulium Kappa2 brochure. Consultabile al: http://www.alfa-chemicals.co.uk/Libraries/Personal_Care_brochures/Emulium_Kappa_2_Brochure.sflb.ashx. Accessed on 09/10/2014.

Gavini E, Spada G, Rasso G, Cerri G, Brundu A, Cossu M, Sorrenti M, Giunchedi P. Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl- β -cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium. *J Pharm Pharmacol.* 2011;63:472-82.

Geys J, Nemery B, Hoet PHM. Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: Better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicol In Vitro.* 2010;24:620-629.

Guthrie SE, Mazzanti G, Idziak SH. X-ray phase identification of chocolate is possible without the removal of sugar. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2005;107:656-9.

Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Boulanger P, Le Lamer S, Amighi K. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of nano-sized crystals for dissolution rate enhancement of ucb-35440-3, a highly dosed poorly water-soluble weak base. *Eur J Pharm Biopharm.* 2006;64:360-8.

Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm Res.* 1990;7(9):902-10.

Jinno J, Kamada N, Miyake M, Yamada K, Mukai T, Odomi M, Toguchi H, Liversidge GG, Higaki K, Kimura T. Effect of particle size reduction on dissolution and oral absorption

of a poorly water-soluble drug, cilostazol, in beagle dogs. *J Control Release*. 2006;111(1/2):56-64.

Kima BD, Naa K, Choi HK. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan. *Eur J Pharm Sci*. 2005;24:199-205.

Kovacevic A, Müller RH, Savic S, Vuleta G, Keck CM. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloid Surface A*. 2014;444:15-25.

Kovacevic A, Savic S, Vuleta G, Müller RH, Keck CM. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *Int J Pharm*. 2011;406:163-172.

Kuo YC, Lin SC. Effect of glutamate on the electrical properties of cationic solid lipid nanoparticles containing stearylamine and dioctadecyldimethylammonium bromide. *J. Phys. ChemB*. 2008;112:4454-60.

Loisel C, Keller G, Lecq G, Bourgaux C, Ollivon M. Phase transitions and polymorphism of cocoa butter *J Aim Oil ChemSoc*. 1998;75(4):425-38.

Marangoni AG, McGauley SE. Relationship between crystallization behavior and structure in cocoa butter. *Cryst Growth Des*. 2003;3(1):95-108.

Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Adv Drug Delivery Rev*. 2012;64:83-101.

Mosmann TR. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

Müller RH, Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm*. 1998;160 (2):229-37.

Muller RH, Ruhl D, Runge S, Schulze-Forster K, Mehnert W. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharm Res*. 1997;14:458-62.

Müller RH. Zetapotential und Partikelladung - KurzeTheorie, praktische Meßdurchführung, Dateninterpretation. Stuttgart: WissenschaftlicheVerlagsgesellschaft, 1996.

Patil Y, Panyam J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing. *Int J Pharm*. 2009;367(1-2):195-203.

Product Integrity Philip Morris USA. Evaluation of Cocoa for Use as a Cigarette Ingredient. Consultabile al: (<http://legacy.library.ucsf.edu/tid/wcc34a00/pdf>). Accessed on 26 may 2014.

Qi C, Chen Y, Jing QZ, Wang XG. Preparation and characterization of catalase-loaded solid lipid nanoparticles protecting enzyme against proteolysis. *Int J Mol Sci*. 2011;12(7):4282-93.

Sanna V, Kirschvink N, Gustin P, Gavini E, Roland I, Delattre L, Evrard B. Preparation and In vivo Toxicity Study of Solid Lipid Microparticles as Carrier for Pulmonary Administration. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2003;5 (2):e27.

Sarmiento B, Martins S, Ferreira D, Souto EB. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2007;2(4):743-9.

Schenk H, Peschar R. Understanding the structure of chocolate. *Radiat Phys Chem*. 2004;71:829-35.

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

Siekmann B, Westesen K. Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids. *Pharm Pharmacol Lett*. 1992;1:123-6.

Souto EB, Müller RH. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. *J Microencapsul*. 2005;22(5):501-10.

Spada G, Gavini E, Cossu M, Rassu G, Giunchedi P. Solid lipid nanoparticles with and without hydroxypropyl- β -cyclodextrin: a comparative study of nanoparticles designed for colonic drug delivery. *Nanotechnology*. 2012;23(9):095101.

Spada G, Gavini E, Sorrenti M, Catenacci L, Rassu G, Cossu M, Giunchedi P. Evaluation of chemical influences on protein-polymeric nanoparticles adsorption process. *Curr Nanosci*. 2012;8(6):819-29.

Ujhelyi Z, Fenyvesi F, Váradi J, Fehér P, Kiss T, Veszeka S, Deli M, Vecsernyés M, Bácskay I. Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47:564-573.

Van Langevelde A, Van Malssen K, Peschar R, Schenk H. Effect of Temperature on Recrystallization Behavior of Cocoa Butter. *J Am Oil Chem Soc*. 2001;78(9):919-25.

Wille RL, Lutton ES. Polymorphism of Cocoa Butter. *J Am Oil Chem Soc*. 1966;43(8):492-6.

Xiao-Yan L, Xia W, Deng-Guang Y, Shuai Y, Qi-Kun K, Qing-Wen Y, Xin-Zhe Y. Electrospun Borneol-PVP Nanocomposites. *J Nanomaterials*. 2012; Article ID 731382, 8 pages.

Xie S, Wang S, Zhao B, Han C, Wang M, Zhou W. Effect of PLGA as a polymeric emulsifier on preparation of hydrophilic protein-loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2008;67(2):199-204.

Zhang Y, Wang Z, Gemeinhart RA. Progress in microRNA delivery. *J Control Release*. 2013;172(3):962-74.

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

Table**Tabella 1.** Parametri formulativi e di processo.

Lipide	Burro di cacao
Fase a ₁	Acqua
Fase o	diclorometano + co-surfattante
Fase a ₂	Acqua + surfattante
1 ^a omogeneizzazione (rpm, sec)	17600, 30
2 ^a omogeneizzazione (rpm, sec)	17600, 40

Tabella 2. Composizione delle SLN in dispersione riferita al tipo ed alla quantità di surfattante e co-surfattante impiegati: la concentrazione del co-surfattante (% p/v) è riferita alla prima emulsione a₁/o, la concentrazione del surfattante è riferita alla fase acquosa a₂.

lotto	Surfattante		Co-surfattante			lotto	Surfattante		Co-surfattante		
	Tween 80	PEG40 MS	PEG400 MS	EK	PS		Tween 80	PEG40 MS	PEG400 MS	EK	PS
A1	1		1			D1	1		1		
A2	1		1,5			D2	1		1,5		
A3	1		2			D3	1		2		
B1		1	1			E1	1			1	
B2		1	1,5			E2	1			1,5	
B3		1	2			E3	1			2	
C1	1			1		F1		1		1	
C2	1			1,5		F2		1		1,5	
C3	1			2		F3		1		2	

Tabella 3. Effetto della composizione del co-surfattante (%p/v) sulle proprietà dimensionali delle SLN.

Co-surfattante	Surfattante	Lotto	dm (nm)	Tween 80			Lotto	dm (nm)	PEG40 MS		
				±DS	PI	±DS			±DS	PI	±DS
1%											
PEG400 MS		A1	318,88	33,79	0,47	0,06	B1	838,67	138,76	0,64	0,07
EK		C1	911,54	8,41	0,63	0,09	D1	675,77	51,51	0,98	0,04
PS		E1	385,31	20,92	0,59	0,01	F1	626,32	57,92	0,78	0,07
1.5%											
PEG400 MS		A2	349,62	75,85	0,63	0,05	B2	670,08	52,25	0,78	0,25
EK		C2	991,13	8,62	0,50	0,09	D2	766,02	49,59	0,65	0,06
PS		E2	356,18	18,98	0,52	0,02	F2	631,98	21,99	0,46	0,10
2%											
PEG400 MS		A3	312,31	21,02	0,67	0,08	B3	693,91	106,32	1,03	0,08
EK		C3	975,39	143,53	1,02	0,22	D3	757,32	72,43	0,89	0,10

PS	E3	391,13	12,59	0,47	0,02	F3	555,39	47,37	0,52	0,03
----	-----------	--------	-------	------	------	-----------	--------	-------	------	------

Tabella 4. Proprietà dimensionali delle SLN in sospensione dopo il test di stabilità *real time*.

Lotto	0 gg				15 gg				30 gg			
	d _m (nm)	SD _m	Ip	SD _m	d _m (nm)	SD _m	Ip	SD _m	d _m (nm)	SD _m	Ip	SD _m
A1	318,88	33,79	0,47	0,06	462,80	137,07	0,55	0,15	370,51	38,82	0,53	0,16
A2	349,62	75,85	0,63	0,05	417,04	66,51	0,75	0,11	427,47	51,93	0,71	0,06
A3	312,31	21,02	0,67	0,08	292,82	20,31	0,56	0,04	361,20	31,33	0,62	0,02
B1	838,67	138,76	0,64	0,07	545,60	79,32	0,80	0,09	612,78	36,65	0,90	0,04
B2	670,08	52,25	0,78	0,25	886,63	157,94	0,72	0,23	725,98	91,32	1,06	0,14
B3	693,91	106,32	1,03	0,08	760,50	156,31	0,72	0,07	698,14	89,03	1,07	0,30
C1	911,54	8,41	0,63	0,09	603,76	132,51	0,33	0,17	446,18	51,84	0,54	0,04
C2	991,13	8,62	0,50	0,09	624,71	103,59	0,49	0,08	514,22	49,92	0,66	0,04
C3	975,39	143,53	1,02	0,22	834,94	7,07	0,62	0,05	533,96	46,59	0,74	0,02
D1	675,77	51,51	0,98	0,04	641,21	46,72	0,67	0,08	660,49	159,75	0,69	0,03
D2	766,02	49,59	0,65	0,06	756,31	51,86	0,40	0,07	809,11	54,24	0,69	0,06
D3	757,32	72,43	0,89	0,10	657,79	125,78	0,51	0,10	718,61	158,12	0,63	0,17
E1	385,31	20,92	0,59	0,01	385,31	27,86	0,64	0,19	472,09	40,07	0,76	0,15
E2	356,18	18,98	0,52	0,02	463,98	43,12	0,60	0,04	443,73	31,08	0,58	0,03
E3	391,13	12,59	0,47	0,02	422,90	33,93	0,48	0,01	443,44	27,80	0,55	0,04
F1	626,32	57,92	0,78	0,07	605,59	77,30	0,95	0,06	760,88	72,55	0,98	0,10
F2	631,98	21,99	0,46	0,10	585,86	68,79	0,85	0,02	677,27	50,11	0,84	0,03
F3	555,39	47,37	0,52	0,03	635,42	19,38	0,68	0,01	658,66	90,30	0,79	0,10

Figure

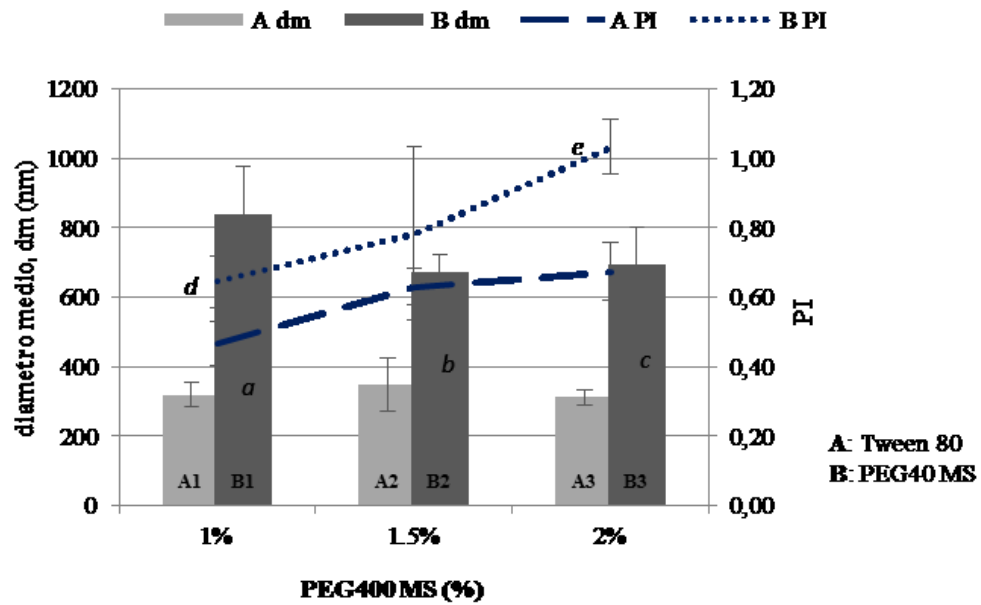


Figura 1a. Effetto del tipo di surfattante sul diametro medio (barre) ed il PI (linee) delle SLN con co-surfattante PEG400 MS. *Barre.* n=9, ^a p<0,05 vs A1, ^b p<0,05 vs A2, ^c p<0,05 vs A3. *Linee.* n=9 ^d p<0,05 vs A1, ^e p<0,05 vs A3. Le differenze significative vengono indicate da lettere.

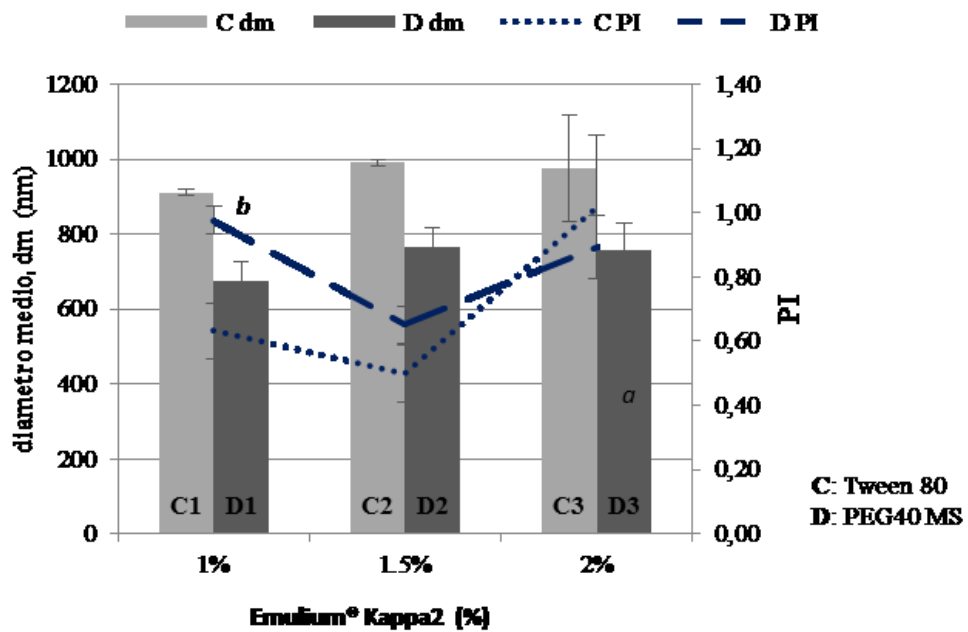


Figura 1b. Effetto del tipo di surfattante sul diametro medio (barre) ed il PI (linee) delle SLN con co-surfattante Emulium® Kappa2. *Barre.* n=9, ^a p<0,05 vs C3. *Linee.* n=9 ^b p<0,05 vs C1. Le differenze significative vengono indicate da lettere.

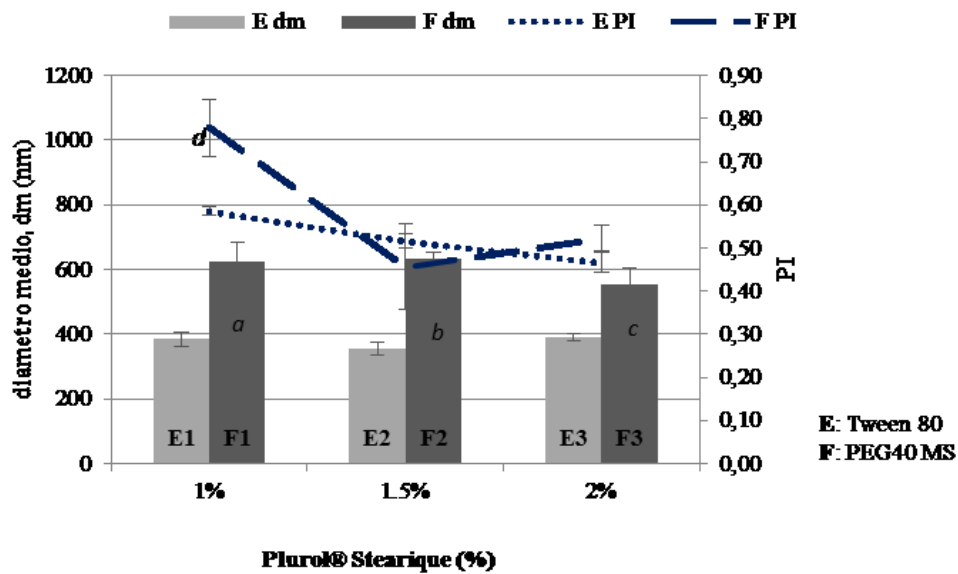


Figura 1c. Effetto del tipo di surfattante sul diametro medio (barre) ed il PI (linee) delle SLN con co-surfattante Plurol® Stearique. *Barre.* n=9, ^a p<0,05 vs E1, ^b p<0,05 vs E2, ^c p<0,05 vs E3. *Linee.* n=9 ^d p<0,05 vs E1. Le differenze significative vengono indicate da lettere.

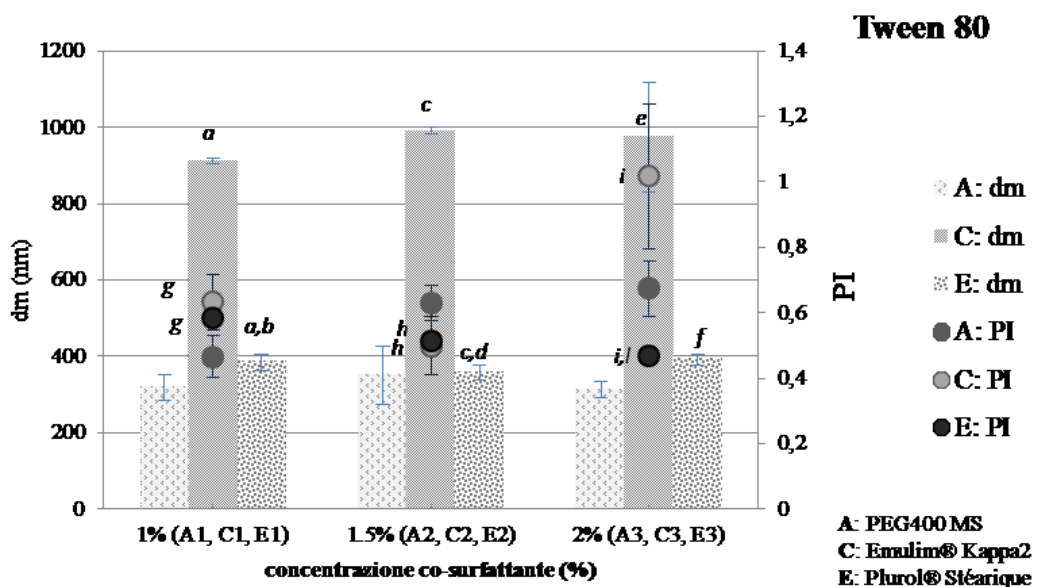


Figura 2a. Effetto del tipo e della concentrazione del co-surfattante sul diametro medio (dm) (barre) e sulla distribuzione dimensionale (PI) (pallini) delle SLN con Tween 80. *Barre.* n=9, ^a p<0,05 vs A1, ^b p<0,05 vs C1, ^c p<0,05 vs A2, ^d p<0,05 vs C2, ^e p<0,05 vs A3, ^f p<0,05 vs C3. *Pallini.* n=9, ^g p<0,05 vs A1, ^h p<0,05 vs A2, ⁱ p<0,05 vs A3, ^l p<0,05 vs C3. Le differenze significative vengono indicate da lettere.

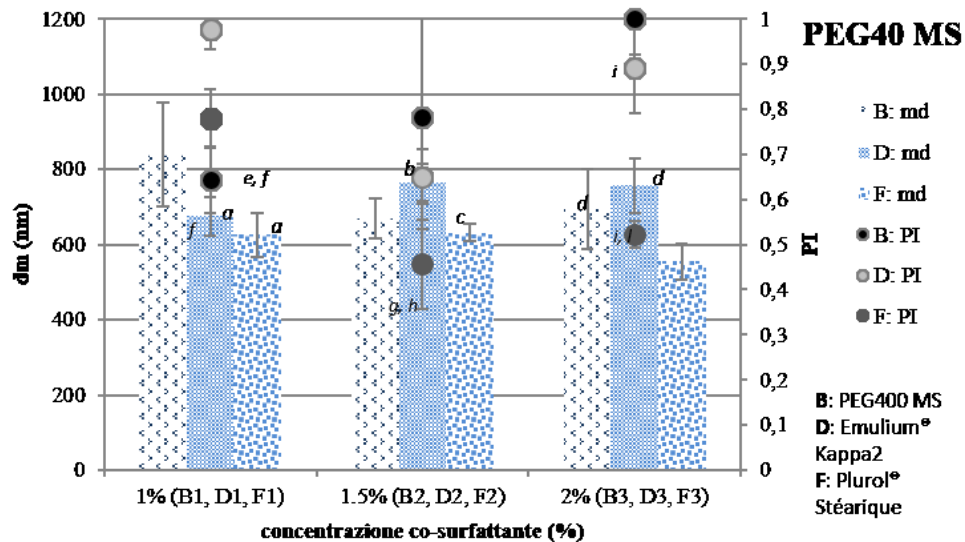


Figure 2b. Effetto del tipo e della concentrazione del co-surfattante sul diametro medio (dm) (barre) e sulla distribuzione dimensionale (PI) (pallini) delle SLN con PEG40 MS. *Barre.* n=9, ^a p<0,05 vs B1, ^b p<0,05 vs B2, ^c p<0,05 vs D2, ^d p<0,05 vs F3. *Pallini.* n=9, ^e p<0,05 vs B1, ^f p<0,05 vs D1, ^g p<0,05 vs B2, ^h p<0,05 vs D2, ⁱ p<0,05 vs B3, ^l p<0,05 vs D3. Le differenze significative vengono indicate da lettere.

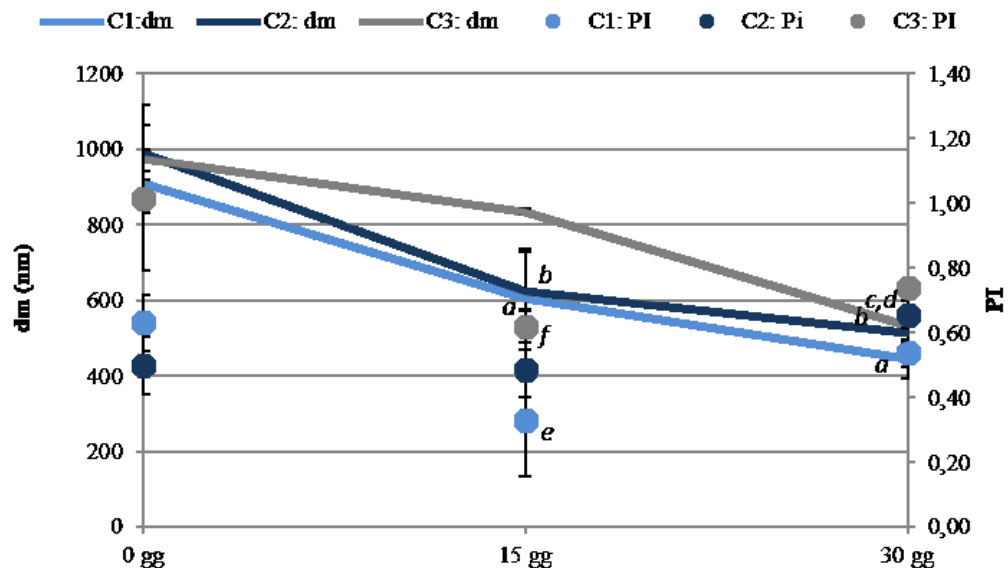


Figura 3. Stabilità *real time*. Analisi del diametro medio (dm) (linee) e della distribuzione dimensionale (PI) (pallini) delle SLN C1, C2 e C3, nello stesso giorno della preparazione (0 gg), dopo 15 e 30 giorni (gg). *Linee.* n=3, ^a p<0,05 vs C1(0 gg), ^b p<0,05 vs C2(0 gg), ^c p<0,05 vs C3(0 gg), n=3 ^d p<0,05 vs C3(15 gg). *Pallini.* n=3 ^e p<0,05 vs C1(0 gg), ^f p<0,05 vs C3(0 gg). Le differenze significative vengono indicate da lettere.

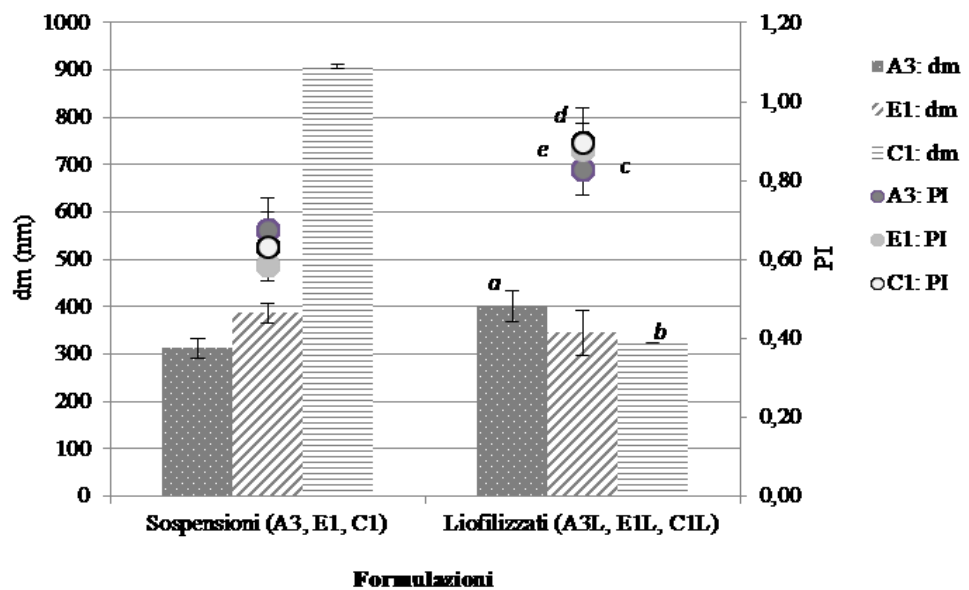


Figura 4. Diametro medio (dm) (barre) e distribuzione dimensionale (PI) (pallini) delle SLN A3, E1, C1. Confronto tra le sospensioni ed i liofilizzati. *Barre.* n=9, ^a p<0,05 vs A3, ^b

$p < 0,05$ vs C1. *Pallini*. $n=9$, $^c p < 0,05$ vs A3, $^d p < 0,05$ vs C1, $^e p < 0,05$ vs E1. Le differenze significative vengono indicate da lettere.

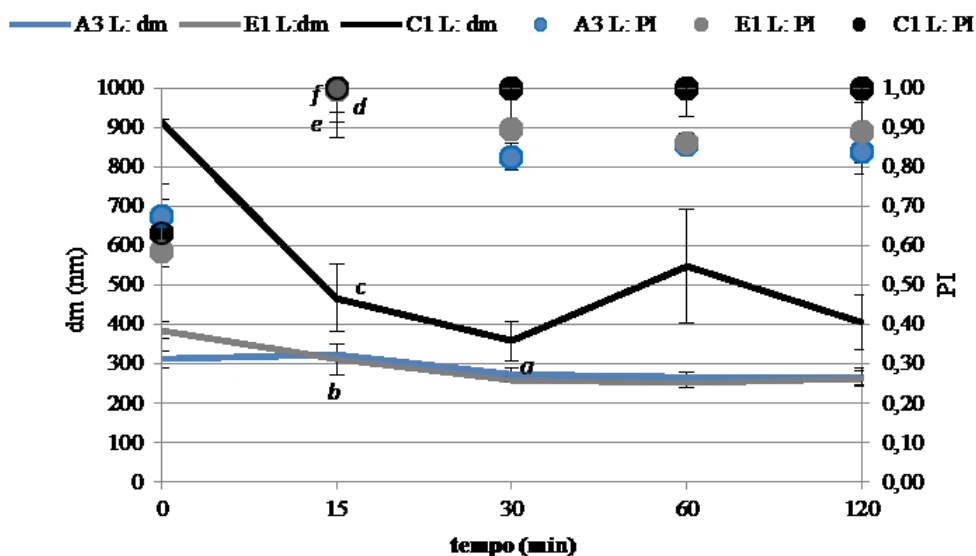


Figura 5. Stabilità a 37°C delle formulazioni A3_L, E1_L and C1_L. I risultati vengono espressi in termini di variazione del diametro medio (dm) (linee) e della distribuzione dimensionale (PI) (pallini) durante i 120 minuti di test. *Linee*. $n=3$, $^a p < 0,05$ vs A3(0 min), $^b p < 0,05$ vs E1(0 min), $^c p < 0,05$ vs C1(0 min). *Pallini*. $n=3$, $^d p < 0,05$ vs A3(0 min), $^e p < 0,05$ vs E1(0 min), $^f p < 0,05$ vs C1(0 min). Le differenze significative vengono indicate da lettere.

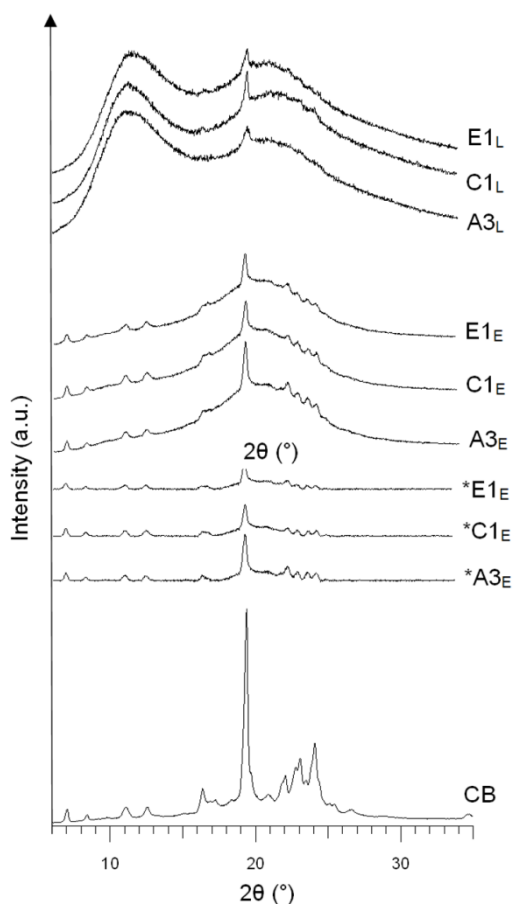


Figura 6. Diffrazione ai raggi X della materia prima burro di cacao (CB), delle formulazioni essiccate per liofilizzazione (**A3_L**, **E1_L**, **C1_L**) e delle formulazioni essiccate per evaporazione in stufa termo-ventilata (**A3_E**, **E1_E**, **C1_E**). * A3_E, *E1_E, *C1_E corrispondono ai profili di diffrazione di A3_E, E1_E, C1_E privati del *background*.

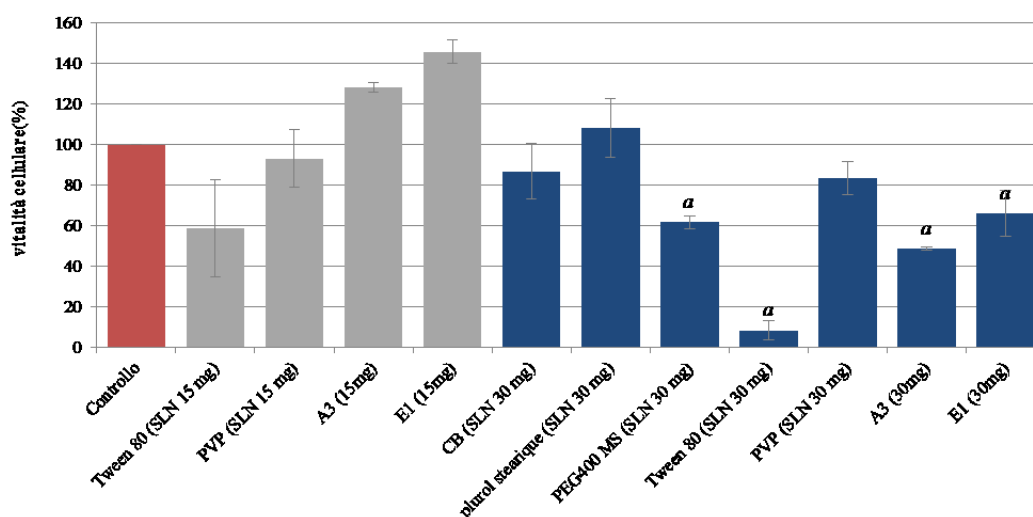


Figura 7. Test di vitalità cellulare (MTT test). n=3, ^a p<0,05 vs controllo.

Capitolo II

Nanoparticelle Polimeriche per la Veicolazione di Quercetina come Agente
Neuroprotettivo

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Abstract

La quercetina è un flavonoide dotato di molteplici ed interessanti azioni biologiche, tra cui la neuro-protezione.

Lo scopo della ricerca è stato quello di preparare e caratterizzare nanoparticelle a base di acido polilattico (PLA) per la veicolazione di un farmaco neuro-protettivo scarsamente idrosolubile, qual'è la quercetina. In particolare, lo studio si è rivolto all'individuazione dei parametri formulativi influenzanti l'ottenimento di particelle polimeriche con dimensioni omogenee, rientranti nell'ordine dei nanometri e capaci di caricare e veicolare la quercetina. I parametri principali oggetto di indagine sono stati: il metodo preparativo; la concentrazione del solido in dispersione; la presenza/assenza del co-solvente (EtOH) per il farmaco durante la fase preparativa dell'omogeneizzazione; la concentrazione del surfattante e la concentrazione di caricamento del farmaco. E' stata inoltre valutata l'influenza del processo preparativo e del sistema di veicolazione nei confronti dell'attività antiossidante della quercetina.

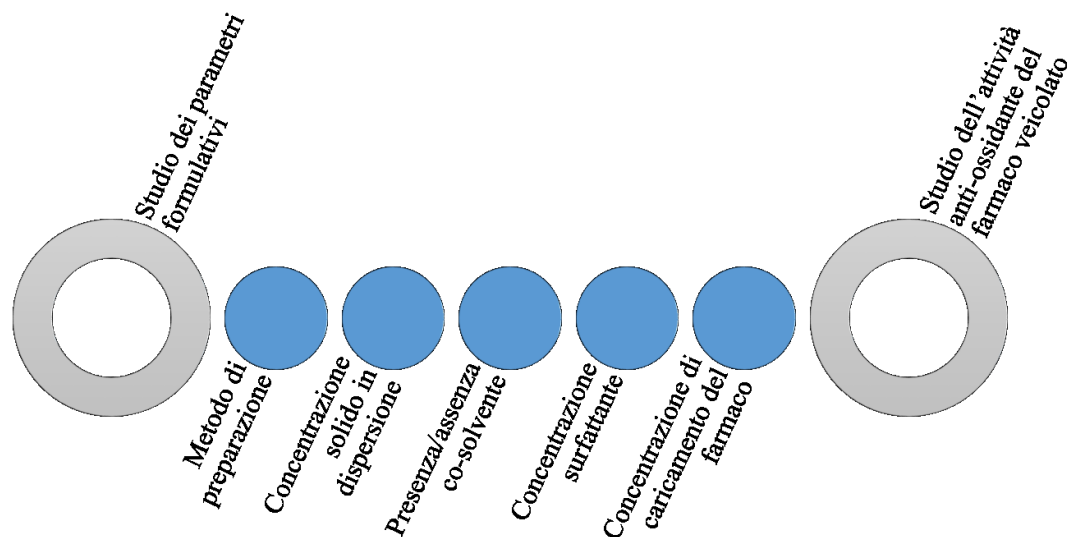
I risultati ottenuti hanno dimostrato che dispersioni omogenee di nanoparticelle a base di polilattico permettono di veicolare la quercetina quale agente antiossidante. Il metodo del *solvent deposition* ha consentito di ottenere nanoparticelle polimeriche con un diametro medio ed un indice di polidispersione rispettivamente di circa 200 nm e 0,1. Questi parametri ben si adattano alla somministrazione parenterale. L'assenza dell'EtOH e la diminuzione della concentrazione di surfattante nella fase preparativa hanno portato ad una riduzione della quercetina caricata all'interno delle nanoparticelle. Il farmaco, una volta incapsulato, ha mantenuto la sua attività antiossidante. In conclusione, è stato possibile ottenere dei *carrier* nanoparticellari capaci di veicolare la quercetina ed incrementarne la solubilità in virtù delle ridotte dimensioni delle particelle ottenute, senza che venga alterata l'attività antiossidante del flavonoide.

Introduzione

I flavonoidi, tra i polifenoli maggiormente presenti nella dieta umana, sono molecole con proprietà antiossidanti e di modulazione della proliferazione e della funzionalità cellulare nonché della risposta infiammatoria [Leonarduzzi *et al.*, 2010]. La quercetina è uno dei flavonoidi più studiati per le sue numerose proprietà biologiche, tra cui l'azione antiossidante, antitumorale, antinfiammatoria, antiaggregante e vasodilatatrice [Erlund, 2004]. Ha inoltre mostrato azioni terapeutiche e neuro-protettive nell'ambito delle patologie neurodegenerative [Ansari *et al.*, 2009; Ossola *et al.*, 2009; Sriraksa *et al.*, 2012]. La quercetina viene rapidamente metabolizzata nel tratto gastro-intestinale e nel fegato. Nel sangue sono presenti solo i suoi derivati metabolici, principalmente glucuronati e solfati, meno abili nell'attraversare la BEE e dotati di minore attività neuro-protettiva [Dhawan *et al.*, 2011; Ossola *et al.*, 2009]. La scarsa biodisponibilità orale della quercetina potrebbe venir risolta mediante somministrazione parenterale; tuttavia, l'ottenimento delle formulazioni iniettabili è reso complicato dalla sua scarsa solubilità in acqua e da processi auto-ossidativi in soluzioni acquose a pH neutro (7,5) [Schmalhausen *et al.*, 2007]. Nell'insieme questi fattori ne limitano l'utilizzo come farmaco; appare quindi evidente la necessità nell'individuare sistemi capaci di aumentarne la solubilità in acqua per *I)* facilitare la somministrazione come preparato iniettabile; *II)* incrementare il dosaggio per via parenterale; *III)* aumentare la velocità di dissoluzione, favorire l'assorbimento a livello intestinale e la biodisponibilità orale.

Numerose strategie formulative sono state messe a punto per il raggiungimento di questi obiettivi, tra queste le nanoparticelle polimeriche sono risultate essere particolarmente vantaggiose. Esse sono infatti biodegradabili e possono consentire di migliorare l'azione terapeutica di molecole bioattive idrosolubili e liposolubili, in seguito all'aumento della biodisponibilità e della solubilità del farmaco. Sono inoltre in grado di proteggere un principio attivo dalla degradazione enzimatica, di favorirne la diffusione attraverso l'epitelio e di modificarne la farmacocinetica [Patel *et al.*, 2012]. Tra i polimeri ampiamente utilizzati nella preparazione di nanoparticelle polimeriche vi sono i polilattidi, a cui appartiene l'acido polilattico, meglio conosciuto come PLA, dotato di molteplici vantaggi quali elevata idrofobicità, biodegradabilità, biocompatibilità e scarsa tossicità [Patel *et al.*, 2012].

Lo scopo della ricerca è stato quello di preparare e caratterizzare nanoparticelle a base di PLA per la veicolazione di un farmaco neuro-protettivo scarsamente idrosolubile, qual'è la quercetina (Fig. 1).



Schema illustrante le principali fasi del lavoro.

Metodi

Materiali

La quercetina (QCT) anidra è stata acquistata da Sigma-aldrich, Italia. Il PLA Resomer R 203 (P.M. 16000) ed il PLA Resomer R 202H (P.M. 10000-18000) sono stati acquistati da Boehringer Ingelheim, Germania. Il Tween 80, il Trolox 97% ed il 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), sono stati acquistati da Acros Organics, Belgio. Il cloruro di ferro (III) anidro 97% è stato acquistato da Janssen chimica, Belgio. L'acetone e l'etanolo 96° sono stati acquistati da Carlo Erba, Italia. L'acqua è stata ottenuta da un sistema di purificazione Milli-Q R4, Millipore, Milano.

Preparazione delle nanoparticelle polimeriche di quercetina

Scelta del polimero e dei parametri formulativi principali

Le nanoparticelle (NP) polimeriche per la veicolazione della quercetina (QCT) sono state preparate utilizzando la metodica opportunamente modificata del *solvent deposition* [Musumeci *et al.*, 2006] (Fig. 1). Sono stati impiegati due differenti PLA: il Resomer 202H ed il Resomer 203. I due polimeri differiscono tra loro sia per la viscosità intrinseca che per idrofilia; il Resomer R 202H è infatti più idrofilo e meno viscoso. La QCT ed il polimero, in rapporto p/p di 1:5, sono stati solubilizzati in acetone. La fase organica ottenuta, è stata lentamente addizionata, sotto costante agitazione magnetica, alla fase acquosa rappresentata da una miscela etanolo/acqua (1:1, v/v) contenente il tensioattivo Tween 80 allo 0,5% (p/v). Sono stati mantenuti costanti il rapporto tra la fase organica e quella acquosa (1:2, v/v) e la concentrazione di solido (QCT + PLA) in dispersione (0,1%, p/v) (Tab. 1). Il solvente organico è stato allontanato per evaporazione (pr, 30°C), mentre il surnattante acquoso è stato allontanato per centrifugazione (13000 rpm, 20', 4°C). Il pellet ottenuto è stato lavato due volte con acqua milliQ, al fine di eliminare l'eccesso del surfattante, mediante centrifugazione nelle stesse condizioni. Infine, il pellet è stato essiccato in stufa (35°C) per tutta la notte.

Ottimizzazione dei parametri formulativi:

Rapporto tra farmaco e polimero

L'influenza del rapporto tra farmaco e polimero sulle dimensioni e sulla distribuzione dimensionale delle NP è stata studiata preparando tre formulazioni con un rapporto (p/p) di 1:5 (SQ1a, SQ1b), di 1:10 (SR2a, SR2b) e di 1:20 (p/p) (SL3a, SL3b). La concentrazione di solido (QCT+PLA) in dispersione è stata mantenuta pari a 0,1% (p/v). In aggiunta, sono

stati preparati campioni privi di farmaco (**BSL3a**, **BSL3b**) per valutare l'influenza del processo di caricamento della QCT rispetto alle formulazioni (**SL3a**, **SL3b**) ([Tab. 2](#)).

Sulla base delle analisi dimensionali, tra tutte le precedenti formulazioni ottenute, la **SL3a**, avendo dato i migliori risultati, è stata selezionata come formulazione *leader* e sottoposta ad ulteriori modifiche ([Fig. 2](#)).

Ottimizzazione dei parametri formulativi nelle formulazioni selezionate **SL3a**

Concentrazione di solido totale

La concentrazione di solido totale (QCT+PLA) nella dispersione è stata aumentata da 0,1% a 0,175% (p/v) riducendo i volumi della fase organica e di quella acquosa.

Dalla fase acquosa è stato anche eliminato l'EtOH (**QE**), poiché essendo la QCT solubile in questo solvente, ne favorisce il passaggio in soluzione riducendone l'incapsulamento.

Concentrazione del surfattante

Poiché è noto che il surfattante impiegato può avere un effetto citotossico [[Gavini et al., 2011](#)], si è valutata la concentrazione minima necessaria per l'ottenimento di NP stabili. La concentrazione del Tween 80 è stata ridotta da 0,5% a 0,3% (p/v) mantenendo la fase acquosa come miscela H₂O/EtOH (**Q0,3**).

Concentrazione del surfattante e del co-solvente

Per permettere l'utilizzo di minori quantità di tensioattivo impiegato e facilitare l'incorporazione della QCT, è stata ridotta la concentrazione di Tween 80 (da 0,5% a 0,3% (p/v) ed eliminato il co-solvente EtOH (**Q0,3E**).

Concentrazione del farmaco

La quantità della QCT impiegata è stata aumentata (**Q20**) passando da 5 mg, sino a 10 e 20 mg.

Ottimizzazione dei parametri formulativi nelle formulazioni selezionate **Q20**

Dai risultati ottenuti sulla caratterizzazione della precedente serie di nanodispersioni, la formulazione **Q20** è stata presa come base per ulteriori variazioni dei parametri formulativi ([Fig. 2](#)). In seguito a tali variazioni, sono state preparate le nanodispersioni **Q20E** per eliminazione dell'EtOH, e la **Q20-0,3** per riduzione del Tween 80 a 0,3% (p/v), nonché è stata valutata la contemporanea eliminazione dell'EtOH con la riduzione del Tween 80. Infine, sono stati preparati i bianchi, privi di farmaco, delle formulazioni **Q20** e **Q20E**, denominati **BQ20** e **BQ20E**. In [Tab. 3](#) è riportata la composizione quali-quantitativa delle formulazioni prodotte.

Tutte le formulazioni sono state preparate in triplicato.

Caratterizzazione dimensionale

Tutte le formulazioni sono state analizzate in triplicato tramite spettroscopia di correlazione fotonica (PCS) (Beckman-Coulter Inc. Miami, Florida, USA), al fine di determinare il diametro medio (dm) e la distribuzione dimensionale (PI) delle sospensioni particellari.

Le formulazioni sono state analizzate trasferendo in cuvetta una goccia del campione, diluendo con acqua milliQ precedentemente filtrata con filtri a membrana (pori di 0,45 μm) ed agitando al vortex per qualche secondo.

Tutte le analisi sono state condotte in triplicato ed i risultati ottenuti sono stati espressi in termini di $\text{dm} \pm \text{DS}$ e di $\text{PI} \pm \text{DS}$.

Determinazione del potenziale zeta

Per le formulazioni **Q20**, **Q20E** e per i rispettivi bianchi, è stato misurato il potenziale zeta al fine di determinare la carica superficiale delle NP e l'eventuale influenza della QCT sulla carica delle formulazioni preparate.

Test di stabilità

Delle formulazioni **QE**, **Q0,3E**, **Q20**, **Q20E**, **Q20-0,3**, **BQ20** e **BQ20E** è stata valutata la stabilità dimensionale in un periodo di tempo predefinito (1 e 7 giorni) durante il quale i campioni sono stati conservati ad una temperatura di 4°C.

Determinazione del contenuto in QCT

Il contenuto di QCT è stato determinato nelle formulazioni selezionate **SL3a**, **QE**, **Q0,3**, **Q0,3E**, **Q20**, **Q20E** e **Q20-0,3**. Dieci mg di pellet di ciascun campione sono stati solubilizzati in 500 μL di acetone, quindi la soluzione è stata portata a volume con NaOH (20 mM) ed incubata al riparo dalla luce per 30'. La soluzione filtrata (PTFE; 0,45 μm) è stata sottoposta ad analisi spettrofotometrica (350 nm) (Thermo-Spectronic, Helios Gamma, UK). La lettura è stata effettuata dopo 30' per garantire la stabilizzazione della soluzione. Da studi preliminari, e come confermato dalla letteratura [Yang *et al.*, 2010], è stato infatti riscontrato che con il passare del tempo si ha un cambiamento delle bande di assorbimento (Fig. 3), dovuto alla reazione tra la QCT e l'idrossido di sodio, con conseguente formazione di prodotti intermedi e finali. Al tempo $t=0$, quando ancora nessuna reazione è avvenuta, si ha un picco massimo di assorbimento a 430 nm. Dopo cinque minuti l'intensità del picco di

assorbimento della QCT diminuisce sensibilmente, mentre compaiono due picchi di assorbimento a 350 nm e a 313 nm. Dopo 30' si ha la scomparsa del picco di assorbimento a 430 nm ed il massimo valore di assorbanza dei picchi a 350 nm e a 313 nm, caratteristici del prodotto finale corrispondente alla forma chinonica della QCT.

I risultati sono stati espressi in termini di efficacia di incapsulamento (EE%):

$$EE\% = \frac{\text{quercetina nel pellet}}{\text{quercetina totale}} \times 100$$

Test di dissoluzione *in vitro*

Il test è stato eseguito utilizzando un dissolutore a pala (velocità pala 100 rpm) in 250 mL di acqua bidistillata ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Una quantità esattamente pesata di pellet di **Q20** e **Q20E** con un contenuto di QCT pari a 2,23 mg e 3,4 mg, rispettivamente, sono stati introdotti nel dissolutore. Ad intervalli di tempo prestabiliti (5', 10', 15', 30', 45', 60', 120', 240', 300' e 24 h) sono stati prelevati i campioni (1 mL) dal fluido accettore successivamente ripristinato al fine di mantenere le condizioni *sink*. I campioni sono stati diluiti 1:1 (v/v) con NaOH (20 mM), incubati al riparo della luce per 30' e sottoposti ad analisi spettrofotometrica (350 nm). La percentuale rilasciata dalle formulazioni è stata confrontata con quella della QCT tal quale.

Determinazione dell'attività antiossidante

L'attività antiossidante delle formulazioni **Q20** e **Q20E** è stata valutata in termini di *hydrogen donating* o *radical scavenging ability*, usando due radicali stabili: il 2,2-difenil-1-picrililidrazil (DPPH) ed il 2,4,6-tri(2-piridil)s-triazina (TPTZ).

DPPH test

Per ogni formulazione, 10 mg di pellet sono stati solubilizzati in acetone (10 mL). Adattando la metodica di [Ravichandran et al. \(2014\)](#) la soluzione è stata ulteriormente diluita di 1:20 (v/v) con acetone ed addizionata di una soluzione etanolica (500 μL) di DPPH (200 μM). L'analisi è stata effettuata tramite spettroscopia UV-vis (517 nm). La percentuale di inibizione del radicale con i campioni è stata calcolata come segue:

$$\text{Inibizione \%} = \frac{[At_0 - At_{30}]}{At_0} \times 100$$

At_0 = assorbanza del controllo al tempo 0; At_{30} = assorbanza della soluzione DPPH/campione a 60'. I dati della percentuale di inibizione sono stati espressi come equivalenti di Trolox utilizzando l'opportuna retta di calibrazione.

FRAP test

L'attività antiradicalica delle formulazioni **Q20** e **Q20E** è stata valutata mediante il FRAP test. Per ogni formulazione, 10 mg di pellet sono stati solubilizzati in acetone (10 mL). Adattando la metodica di [Soobratee et al. \(2005\)](#), la soluzione è stata ulteriormente diluita di 1:20 (v/v) con acetone ed addizionata di 500 µL di reattivo, composto da una soluzione estemporanea ottenuta da 25 mL di tampone acetato (pH 3,6), 2,5 mL di TPTZ (una soluzione 10 mmol/L di TPTZ in una soluzione 40 mmol/L di acido cloridrico), 2,5 mL di FeCl₃ anidro (una soluzione 20 mmol/L). Dopo 30' di incubazione, il campione è stato analizzato per spettroscopia UV-vis (593 nm).

I risultati ottenuti sono stati espressi come equivalenti di *Trolox*.

Analisi statistica

Le differenze statistiche sono state determinate applicando analisi ANOVA *one-way* con *multiple comparison* test (GraphPad software Incorporated). Le differenze sono state considerate significative con $p < 0,05$.

Risultati

Preparazione delle nanoparticelle polimeriche di QCT

Il metodo impiegato ha consentito di ottenere, velocemente e con buone rese, sospensioni di NP. La variazione della quantità di QCT da 5 mg a 20 mg e la riduzione del Tween 80 da 0,5 a 0,3% (p/v) ha incrementato la resa di produzione ([Tab. 4](#)).

Caratterizzazione dimensionale delle formulazioni

Tipo di polimero e rapporto tra farmaco e polimero

Sono state preparate differenti formulazioni variando il tipo di polimero PLA (Resomer R 203 e R 202H) ed il rapporto tra farmaco e polimero. Tutte le sospensioni ottenute ([Tab. 5](#)) hanno dimensioni comprese tra 130 e 300 nm circa. L'impiego del Resomer R 203, rispetto al Resomer 202H, ha portato a NP di dimensioni maggiori ($p < 0,05$) ad eccezione del caso di **SQ1b**, in cui la sostituzione con il Resomer 202H determina un incremento di circa 100 nm del diametro medio ($p < 0,001$). Nel complesso, il Resomer 203 permette di ottenere NP più omogenee, per le quali i valori di PI non si discostano da 0,1, indipendentemente dalla percentuale di polimero impiegata ($p < 0,05$). Infatti, con il Resomer 203, la quantità di polimero utilizzata e la presenza della QCT, non influenzano le caratteristiche dimensionali dei preparati ([Fig. 4](#)) ($p > 0,05$), a differenza del Resomer 202H il cui utilizzo porta invece a variazioni dimensionali statisticamente significative ($p < 0,001$). Precisamente con quest'ultimo, quando la quantità del polimero viene ridotta a 83% (p/p) si osserva un

incremento del dm circa doppio rispetto alle corrispondenti formulazioni prive di QCT o con un rapporto farmaco/polimero maggiore (Fig. 4).

Nessuna differenza dimensionale è stata osservata tra le altre formulazioni **SR2b** e **SL3b** rispetto alle corrispondenti prive di QCT (**BSL3b**) e tra loro ($p > 0,05$).

SL3a (dm: $168,35 \pm 15,90$ PI: $0,10 \pm 0,02$) ha mostrato avere migliori proprietà dimensionali, soprattutto in termini di omogeneità, rispetto alle restanti formulazioni (Tab. 5) ottenute durante la fase iniziale di ottimizzazione dei parametri formulativi (rapporto farmaco/polimero). Tuttavia, studi di *drug content* atti a valutare la capacità delle NP di caricare il farmaco, hanno dimostrato la scarsa *performance* della formulazione nel raggiungimento di questo obiettivo e perciò, a partire da **SL3a** sono state introdotte ulteriori variazioni dei parametri formulativi per aumentare la quantità di QCT incapsulata. Questo ha portato all'ottenimento delle formulazioni **QE**, **Q0,3**, **Q0,3E** e **Q20** che sono state analizzate in termini di *drug content* e di proprietà dimensionali (Tab. 6, Fig. 5). In tutte queste, la concentrazione di solido totale (QCT+PLA) nella dispersione è stata aumentata da 0,1% a 0,175% (p/v) riducendo i volumi della fase organica e di quella acquosa. L'aumento della concentrazione del solido, ed in particolare quella del polimero, ha lo scopo di migliorare l'efficacia d'incapsulazione del farmaco [Mehta *et al.*, 2006]. Il polimero, altamente concentrato, precipita molto velocemente sulla superficie della fase dispersa, prevenendo la diffusione del farmaco attraverso il limite di fase [Rafati *et al.*, 1997]. Inoltre, riducendo il volume della fase organica, si ha una diminuzione della quantità di solvente che deve essere evaporata. L'entità e la velocità di rimozione del solvente influenza la velocità di solidificazione della fase dispersa, la quale a sua volta influenza l'efficacia d'incapsulamento del farmaco [Mehta *et al.*, 2006]. In generale, più velocemente avviene l'evaporazione del solvente maggiore sarà la velocità di solidificazione della fase dispersa e maggiore sarà l'efficacia d'incapsulamento [Yeo and Park, 2004].

Nella serie ottenuta dall'ottimizzazione dei parametri formulativi a partire **SL3a**, si è osservato che le differenti variazioni introdotte portano ad un incremento delle dimensioni delle NP, effetto evidente nel caso della riduzione del Tween 80 (**Q0,3**) ($p < 0,001$). Il PI rimane invariato, sia in seguito all'eliminazione dell'EtOH, che in seguito all'aumento del farmaco utilizzato, mentre in **Q0,3**, nel quale è stata ridotta la quantità di Tween 80, inaspettatamente esso si riduce, portando a un sistema maggiormente omogeneo ($p < 0,05$). Come in **SL3a**, la formulazione **Q0,3E** non è stata presa come formulazione di riferimento, nonostante fosse dimensionalmente omogenea, con particelle a basso dm (circa 175 nm) ed ottenuta con basse concentrazioni di tensioattivo. Infatti, gli studi sul contenuto in QCT hanno rivelato scarse concentrazioni di farmaco.

Tuttavia, aumentando la quantità di farmaco da 5 a 20 mg (**Q20**), è stato possibile ottenere maggiori capacità di caricamento della QCT rispetto alle formulazioni precedenti. Attraverso la variazione dei parametri formulativi impiegati in **Q20** sono state ottenute nuove formulazioni o per eliminazione dell'etanolo (**Q20E**) o per riduzione del tensioattivo (**Q20-0,3**). La contemporanea eliminazione dell'etanolo da quest'ultimo campione ha comportato instabilità dell'emulsione e quindi incapacità nell'ottenere una formulazione di NP in sospensione. Il fenomeno si potrebbe ricondurre al fatto che l'aumento della quantità di QCT e la riduzione del Tween 80 conferiscano al co-solvente un ruolo di maggiore importanza per l'ottenimento di sistemi stabili. I risultati dimensionali ([Tab. 7](#), [Fig. 6](#)) mostrano come non ci siano variazioni significative in termini di dm e PI ($p > 0,05$) quando è presente la QCT, indipendentemente dalla presenza del co-solvente, mentre nei formulati privi di farmaco l'eliminazione dell'EtOH conduce a NP più piccole. Tra **BQ20E**, priva di farmaco e la corrispondente **Q20E**, caricata con QCT, si ha una differenza dimensionale significativa, indicando che l'eliminazione del co-solvente, che partecipa nel processo di solubilizzazione della QCT, porta ad un incremento del diametro medio particellare.

Determinazione potenziale zeta

L'analisi è stata effettuata per le formulazioni **Q20**, **Q20E**, **BQ20** e **BQ20E** ([Tab. 8](#)).

Sia il polimero polilattico che la QCT sono carichi negativamente. Il caricamento con il farmaco in **Q20** non ha condotto a differenze significative nel potenziale zeta ($p > 0,05$), mentre in **Q20E** si è osservato un aumento significativo verso valori negativi ($p < 0,05$) rispetto al corrispondente preparato mancante del farmaco (**BQ20E**). Il metodo impiegato per l'ottenimento di **Q20E** e di **BQ20E** non prevede l'impiego di etanolo, solvente nel quale la QCT è molto solubile per cui la distribuzione del farmaco all'interno della matrice polimerica potrebbe non essere omogenea e perciò la probabilità che la QCT si disponga sulla superficie particellare aumenta, spostando così il potenziale zeta verso valori più negativi rispetto a **BQ20E**.

Test di stabilità

Tutte le formulazioni sono stabili ($p > 0,05$), sia in termini di PI che di dm, nell'arco di tempo indagato ([Fig. 7](#)) ad eccezione di **Q20-0,3**, per la quale la riduzione della concentrazione del surfattante ha determinato una minore stabilità; una diminuzione nella concentrazione di tensioattivo induce spesso un aumento dimensionale delle particelle durante il tempo [[Ekambaram et al., 2012](#)].

Contenuto in QCT

Nelle formulazioni in cui è stata impiegata una quantità di QCT di 5 mg si è ottenuta un'efficacia di incapsulamento molto ridotta ([Tab. 9](#)). Le modifiche apportate al campione **SL3a**, quale eliminazione dell'EtOH e riduzione della quantità di Tween 80, non hanno portato ad un incremento della quantità di farmaco caricata.

L'aumento a 20 mg di QCT, ha migliorato invece la percentuale di farmaco caricata ($p < 0,05$) da valori di 0,2-0,5% a 9-12% circa ([Fig. 8](#)). Inoltre, l'eliminazione dell'etanolo (**Q20E**) o la riduzione del Tween 80 (**Q20-0,3**) hanno determinato un caricamento maggiore ($p < 0,05$) con valori rispettivamente di 13% e 12% in QCT incapsulata. Aumentare la quantità di utilizzo della QCT porta, in generale, ad un incremento dell'efficacia di incapsulazione del farmaco.

Test di dissoluzione delle formulazioni

Le formulazioni **Q20** e **Q20E** hanno dimostrato di aumentare la dissoluzione della QCT in acqua rispetto al farmaco tal quale ([Fig. 9](#)) ($p < 0,001$).

L'incapsulazione di farmaci poco solubili in sistemi micro o nanoparticellari è una strategia formulativa in grado di favorire il processo di solubilizzazione. La riduzione dimensionale particellare comporta un aumento dell'area superficiale determinando un maggiore contatto con il solvente e quindi un aumento della solubilità [[Savjani et al., 2012](#); [Chaudhary et al., 2012](#)]. I risultati mostrano che la massima quantità di QCT disciolta si ottiene dopo 1 h di contatto con acqua a 37°C ed in agitazione. Entrambe le formulazioni sono capaci di aumentare la quantità disciolta di QCT, rispettivamente, del doppio nel caso di **Q20E** e di circa 5 volte per quanto riguarda **Q20**. La formulazione **Q20**, con un più basso caricamento ma, nella quale si è ipotizzato sulla base dei risultati del potenziale zeta che il farmaco fosse incapsulato, è stata in grado di rilasciare una maggiore quantità di farmaco.

Determinazione dell'attività antiossidante delle formulazioni

L'incorporazione del farmaco nelle nanoparticelle **Q20** e **Q20E** non modifica la capacità antiossidante della QCT. Infatti i dati sperimentali mostrano che l'attività antiossidante della QCT corrisponde a 652,9 e 744,9 equivalenti di Trolox ($\mu\text{mol/L}$) rispettivamente nel FRAP e nel DPPH test. I valori ottenuti per le due formulazioni non si discostano significativamente da questi. Tuttavia, vista la differente capacità di dissoluzione della QCT dalle due formulazioni, si potrebbe affermare che la formulazione **Q20**, se lasciata in acqua a 37°C per 1 h presenta una attività antiossidante pari al doppio rispetto alla **Q20E** a parità di contenuto in farmaco.

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

Discussione

La quercetina è uno dei flavonoidi più studiati per le sue numerose attività biologiche quale sostanza antiossidante, antitumorale, antinfiammatoria, antiaggregante e vasodilatatrice [Erlund, 2004]. Dai i suoi effetti antiossidanti deriva l'efficacia terapeutica e neuro-protettiva nell'ambito delle patologie neurodegenerative [Ansari *et al.*, 2009;Ossola *et al.*, 2009;Sriraksa *et al.*, 2012]. Il cervello è un organo ad elevato rischio di danno indotto da stress radicalico, come osservato nelle patologie neurodegenerative, in quanto consumatore di elevate quantità di ossigeno e possedente scarsi meccanismi di difesa per l'attacco da specie radicaliche all'ossigeno (ROS). In ciò, trova spiegazione l'impiego e l'efficacia di sostanze antiossidanti, come la QCT, nella sperimentazione su modelli animali di neurotossicità e neurodegenerazione [Ossola *et al.*, 2009]. Nel contesto del morbo di Alzheimer, il pretrattamento di cellule ippocampali con QCT si è mostrato utile nel ridurre la tossicità dovuta al β -amiloide, per mezzo di una riduzione dello stress ossidativo [Ansari *et al.*, 2009]. Tuttavia, l'impiego della QCT in forma agliconica è limitato a causa della sua incapacità nel solubilizzarsi in acqua, fenomeno che, associato all'elevato metabolismo, ne limita la biodisponibilità orale o la possibilità di una somministrazione parenterale [Kumari *et al.*, 2010;Natarajan *et al.*, 2011]. Infatti la solubilità della QCT è pari a 0,00215 g/L a 25,6°C e 0,00469 g/L a 41,5 °C [Srinivas *et al.*, 2010]. Le NP polimeriche hanno rappresentato un importante sistema per aumentare la biodisponibilità della QCT, in quanto ne aumentano la solubilità, ne controllano il rilascio e ne riducono la tossicità [Kumari *et al.*, 2010;Pool *et al.*, 2012;Tan *et al.*, 2011]. Le NP ottenute si sono mostrate in grado di incapsulare il flavonide agliconico e grazie a questa caratteristica potrebbero conferire protezione nei confronti dei meccanismi metabolici che portano ai coniugati glucuronati e solfati dotati di minore capacità di attraversamento della barriera e di minori azioni neuro-protettive [Dhawan *et al.*, 2011;Ossola *et al.*, 2009]. Già in passato le NP hanno infatti permesso la protezione dal metabolismo epatico di un farmaco in esse caricato (epirubicina, curcumina, estradiolo) [Kadam *et al.*, 2012]; in aggiunta, le NP con dimensioni fino a circa 200 nm sono meno suscettibili all'attacco da parte del sistema del complemento responsabile dell'eliminazione ematica delle NP [Moghimi *et al.*, 2005]. Inoltre, in virtù delle dimensioni particellari ottenute, anche la biodisponibilità orale della QCT potrebbe venire migliorata. Hecq *et al.* (2006) hanno difatti dimostrato che NP con diametro compreso tra 100-300 nm migliorano la biodisponibilità orale di farmaci poco idrosolubili. Inoltre, NP di dimensioni comprese tra 100-200 nm sono captate dal tessuto intestinale in misura significativamente maggiore di particelle più grandi [Desai *et al.*, 1997;Caldorera-Moore *et al.*, 2010]. Al contempo, poiché l'azione antiossidante del flavonoide diminuisce drasticamente quando è

esposta alle zone acide o alcaline ed al metabolismo del tratto gastro-intestinale nonché di quello epatico [Pool *et al.*, 2012], il sistema potrebbe preservare l'attività farmacologica della QCT in tali condizioni.

Conclusioni

Il lavoro ha dimostrato che attraverso un'opportuna scelta dei parametri formulativi e preparativi è possibile ottenere NP a base di PLA per veicolare la QCT. In particolare la quantità di farmaco incapsulata dipende dal rapporto tra QCT e PLA usato.

La formulazione selezionata contiene particelle con un diametro medio di circa 238 nm, risulta omogenea, per i bassi valori di PI (0,11), e stabile per una settimana. Le ridotte dimensioni permettono di incrementare la quantità di QCT che si solubilizza rispetto al farmaco tal quale. Queste proprietà rendono idonea la formulazione ad una somministrazione parenterale; inoltre sistemi con queste caratteristiche potrebbero incrementare la biodisponibilità orale della QCT in seguito ad un aumento dell'*up-take* delle nanoparticelle a livello della mucosa intestinale ed una protezione dai processi metabolici.

La QCT incapsulata non perde la sua attività antiossidante.

In seguito ai risultati ottenuti, la formulazione Q20 è stata selezionata per essere ottimizzata al fine di consentire una somministrazione parenterale e quindi valutare la stabilità ematica del *carrier*, la cinetica di rilascio della QCT nel sangue ed il passaggio di questa nel cervello.

Bibliografia

Ansari MA, Abdul HM, Joshi G, Opii WO, Butterfield DA. Protective effect of quercetin in primary neurons against A β (1-42): relevance to Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*. 2009;20(4):269-75.

Caldorera-Moore M, Guimard N, Shi L, Roy K. Designer nanoparticles: Incorporating size, shape, and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(4):479-95.

Chaudhary A, Nagaich U, Gulati N, Sharma VK, Khosa RL. Enhancement of solubilization and bioavailability of poorly soluble drugs by physical and chemical modifications: A recent review. *JAPER*. 2012;2(1):32-67.

Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res* 1997;14:1568-73.

Dhawan S, Kapil R, Singh B. Formulation development and systematic optimization of solid lipid nanoparticles of quercetin for improved brain delivery. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(3):342-51.

Ekambaram P, Sathali AH, PriyankaK. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. *Sci. Revs ChemCommun*. 2012;2(1):80-102.

Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 2004;24:851-74.

Gavini E, Spada G, Rasso G, Cerri G, Brundu A, Cossu M, Sorrenti M, Giunchedi P. Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl- β -cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63:472-82.

Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Boulanger P, Le Lamer S, Amighi K. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of nano-sized crystals for dissolution rate enhancement of ucb-35440-3, a highly dosed poorly water-soluble weak base. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;64:360-8. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(7):1380-8.

Kadam RS, Bourne DW, Kompella UB. Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: contribution of reduced clearance.

Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;75:1-18.

Leonarduzzi G, Testa G, Sottero B, Gamba P, Poli G. Design and Development of Nanovehicle-Based Delivery Systems for Preventive or Therapeutic Supplementation with Flavonoids. *Curr Med Chem*. 2010;17(1):74-95.

Mehta RC, Thanoo BC, DeLuca PE. Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly(d,l-lactide-co-glycolide). *J Control Release*. 1996;41:249-57.

Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 2005;19(3):311-30.

Musumeci T, Ventura CA, Giannone I, Ruozi B, Montenegro L, Pignatello R, Pugliesi G. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int J Pharm.* 2006;325:172-9.

Natarajan V, Krithica N, Madhan B, Sehgal PK. Formulation and Evaluation of Quercetin Polycaprolactone Microspheres for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J Pharm Sci.* 2011;100(1):195-205.

Ossola B., Kääriäinen T.M., Männistö P.T. The multiple faces of quercetin in neuroprotection. *Expert Opin Drug Saf.* 2009;8:397-409.

Patel T, Zhou J, Piepmeier JM, Saltzman WM. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:701-5.

Pool H, Quintanar D, Figuerosa J, Bechara JEHB, Meclements DJ, Mendoza S. Polymeric Nanoparticles as Oral Delivery Systems for Encapsulation and Release of Polyphenolic Compounds: Impact on Quercetin Antioxidant Activity and Bioaccessibility. *Food Biophys.* 2012;7:276-88.

Rafati H, Coombes AGA, Adler J, Holland J, Davis SS. Protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: formulation, structural and release characteristics. *J Control Release.* 1997;43:89-102.

Ravichandran R, Rajendran M, Devapiriam D. Antioxidant study of quercetin and their metal complex and determination of stability constant by spectrophotometry method. *Food Chem.* 2014;146:472-8.

Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug Solubility: Importance and Enhancement. *ISRN Pharm.* 2012; 2012: 195727.

Schmalhausen EV, Zhlobek EB, Shalova IN, Firuzi O, Saso L, Muronetz VI. Antioxidant and prooxidant effects of quercetin on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Food Chem Toxicol.* 2007; 45:1988-93.

Srinivas K, King JW, Howard LR, Jeana K, Monrad JK. Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *J Food Eng.* 2010;100:208-18.

Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolic as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005;579:200-13.

Sriraksa N, Wattanathorn J, Muchimapura S, Tiamkao S, Brown K, Chaisiwamongkol K. Cognitive-Enhancing Effect of Quercetin in a Rat Model of Parkinson's Disease Induced by 6-Hydroxydopamine. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;1-9.

Tan Q, Liu W, Chenyu Guo C, Zhai G. Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1621-30.

Yang LJ, Li P, Gao YJ, Wu DC. Qualitative observation of chemical change rate for quercetin in basic medium characterized by time resolved UV-vis spectroscopy. *J Mol Liq* 2010;151:134-7.

Yeo Y, Park K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch Pharm Res*. 2004;27(1):1-12.

Tabelle**Tabella 1.** Composizione quali- quantitativa delle formulazioni di riferimento.

Lotto	QCT (mg)	Resomer R 203 (mg)	Resomer R 202H (mg)	Acetone (mL)	Tween 80 (mg)	H ₂ O/EtOH 1/1 (mL)
SQ1a	10	50	-	20	200	40
SQ1b	10	-	50	20	200	40

Tabella 2. Composizione delle formulazioni con rapporto QCT/PLA 1:10 e 1:20 p/p.

Lotto	QCT (mg)	Resomer R 203 (mg)	Resomer R 202H (mg)	Acetone (mL)	Tween 80 (mg)	H ₂ O/EtOH 1/1 (mL)
SR2a	5	50	-	18	180	36
SR2b	5	-	50	18	180	36
SL3a	5	100	-	35	350	70
SL3b	5	-	100	35	350	70
BSL3a	-	100	-	35	350	70
BSL3b	-	-	100	35	350	70

Tabella 3. Tabella riassuntiva della composizione quali-quantitativa delle formulazioni a base di QCT prodotte.

Lotto	QCT (mg)	Resomer R 203 (mg)	Resomer R 202H (mg)	Acetone (mL)	Tween 80 (mg)	H ₂ O/EtOH 1/1 (mL)	H ₂ O (mL)
SQ1a	10	50	-	20	200	40	-
SQ1b	10	-	50	20	200	40	-
SR2a	5	50	-	18	180	36	-
SR2b	5	-	50	18	180	36	-
SL3a	5	100	-	35	350	70	-
SL3b	5	-	100	35	350	70	-
QE	5	100	-	20	200	-	40
Q0,3	5	100	-	20	120	40	-
Q0,3E	5	100	-	20	120	-	40
Q20	20	100	-	20	200	40	-
Q20E	20	100	-	20	200	-	40
Q20-0,3	20	100	-	20	120	40	-

Tabella 4. Resa percentuale delle formulazioni.

Lotto	SL3a	QE	Q0,3	Q0,3E	Q20	Q20E	Q20-0,3
Resa (%)	59,2 ±	51,9 ±	78,7 ±	64,5 ±	81,2 ±	80,1 ±	88,6 ±
± DS	4,86	2,43	1,98	3,22	3,35	0,71	11,9

Tabella 5. Diametro medio (dm) ed indice di polidispersione (PI) formulazioni nella fase iniziale dell'ottimizzazione dei parametri formulativi.

<u>Lotto</u>	<u>dm ± DS</u>	<u>PI ± DS</u>
SQ1a	178,5 ± 2,47	0,117 ± 0,01
SQ1b	294,2 ± 11,03	0,251 ± 0,01
SR2a	193,2 ± 3,46	0,078 ± 0,03
SR2b	131,4 ± 0,141	0,14 ± 0,04
SL3a	168,35 ± 15,90	0,10 ± 0,02
BSL3a	186,8 ± 51,77	0,1 ± 0,05
SL3b	136,4 ± 1,06	0,15 ± 0,05
BSL3b	143,25 ± 3,32	0,24 ± 0,09

Tabella 6. Diametro medio (dm) ed indice di polidispersione (PI) delle formulazioni ottenute dall'ottimizzazione dei parametri formulativi di **SL3a**.

<u>Lotto</u>	<u>dm ± DS</u>	<u>PI ± DS</u>
SL3a	168,35 ± 15,90	0,10 ± 0,02
QE	178,2 ± 0,68	0,12 ± 0,01
Q0,3	286,7 ± 4,46	0,046 ± 0,03
Q0,3E	174,3 ± 2,7	0,067 ± 0,02
Q20	238,6 ± 10,69	0,12 ± 0,03

Tabella 7. Diametro medio (dm) ed indice di polidispersione (PI) delle formulazioni ottenute dall'ottimizzazione dei parametri formulativi di **Q20**.

<u>Lotto</u>	<u>dm ± DS</u>	<u>PI ± DS</u>
Q20	238,6 ± 10,69	0,116 ± 0,034
BQ20	242,03 ± 3,23	0,041 ± 0,021
Q20E	234,38 ± 63,12	0,229 ± 0,04
BQ20E	167,6 ± 1,55	0,148 ± 0,02
Q20 0,3	257,42 ± 8,84	0,152 ± 0,05

Tabella 8. Valori di potenziale zeta (zp).

<u>Lotto</u>	<u>zp (mV)</u>	<u>DS</u>
Q20	-27,24	± 1,39
BQ20	-24,78	± 1,36
Q20E	-27,80	± 4,68
BQ20E	-21,42	± 3,79
QCT	-38,83	± 2,73

Tabella 9. Contenuto in QCT nelle formulazioni.

<u>Campione</u>	<u>QCT teorica</u>	<u>QCT incapsulata (mg)</u>	<u>QCT incapsulata (%)</u>
-----------------	--------------------	-----------------------------	----------------------------

	(mg)		
SL3a	5,3	0,36	0,53
QE	5,4	0,10	0,18
Q0,3	5,1	0,40	0,40
Q0,3E	4,9	0,36	0,53
Q20	20,2	8,3	8,60
Q20E	20,1	13,0	12,90
Q20-0,3	20,2	12,5	11,70

Figure

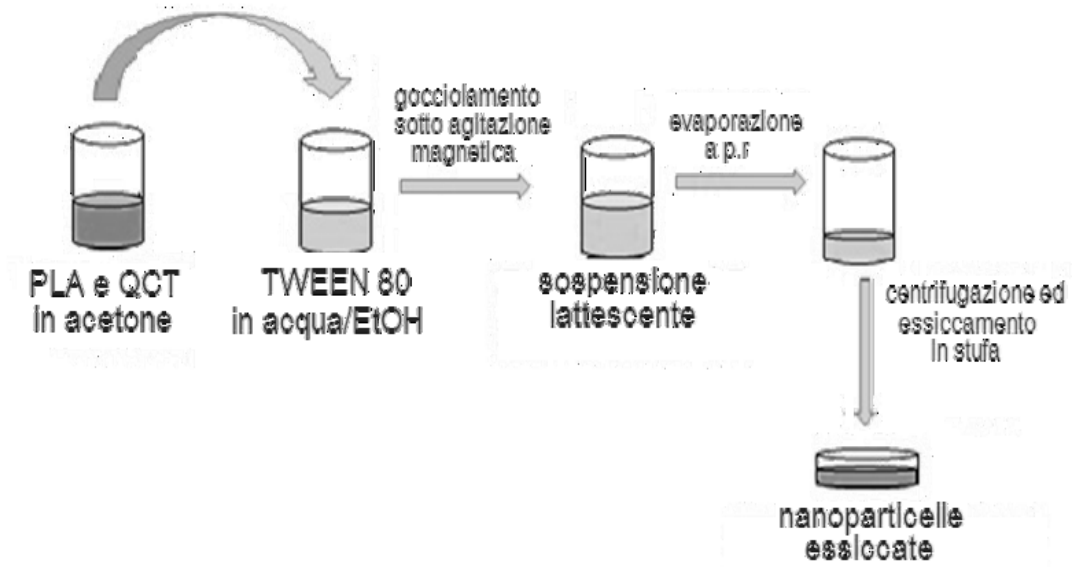


Figura 1. Schema del metodo preparativo impiegato per l’ottenimento delle nanoparticelle veicolanti la quercetina.

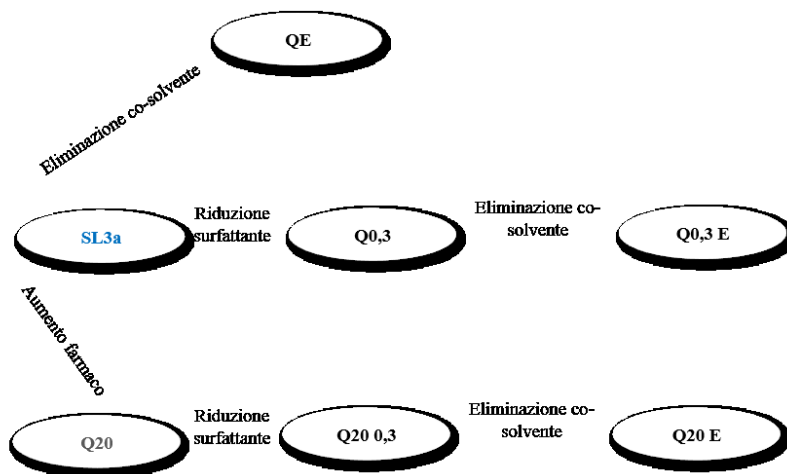


Figura 2. Schema riassuntivo sull’ottimizzazione dei parametri formulativi a partire dalle formulazioni selezionate **SL3a** e **Q20**.

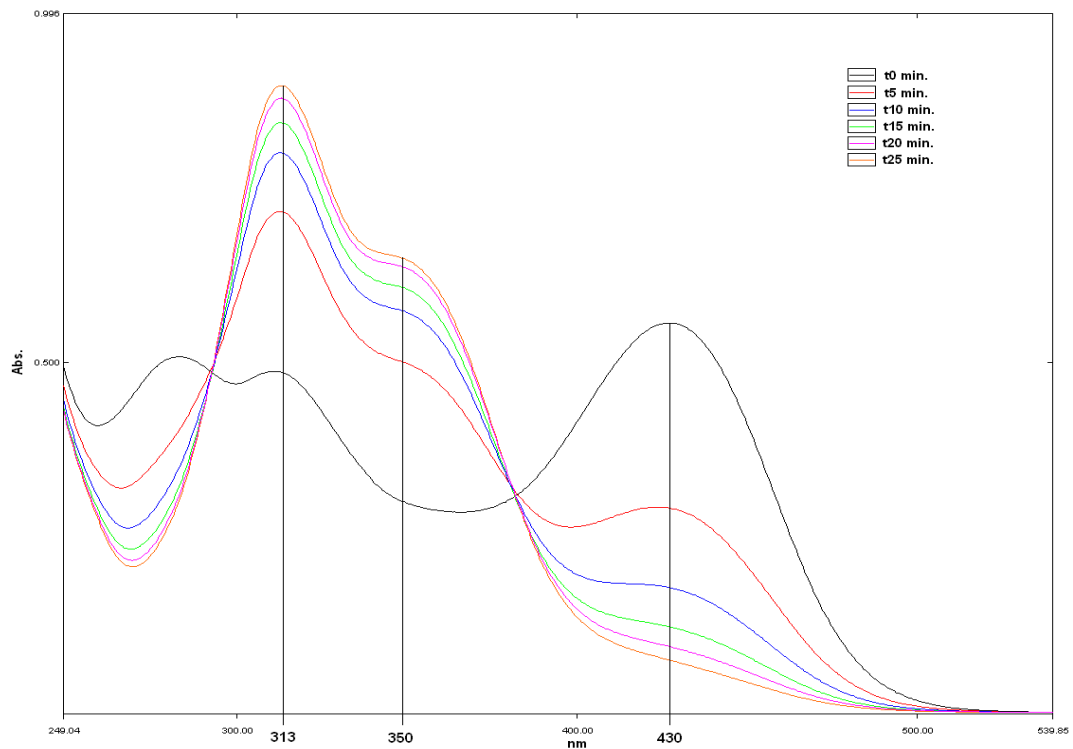


Figura 3. Spettro di assorbimento della quercetina in NaOH 0,02M.

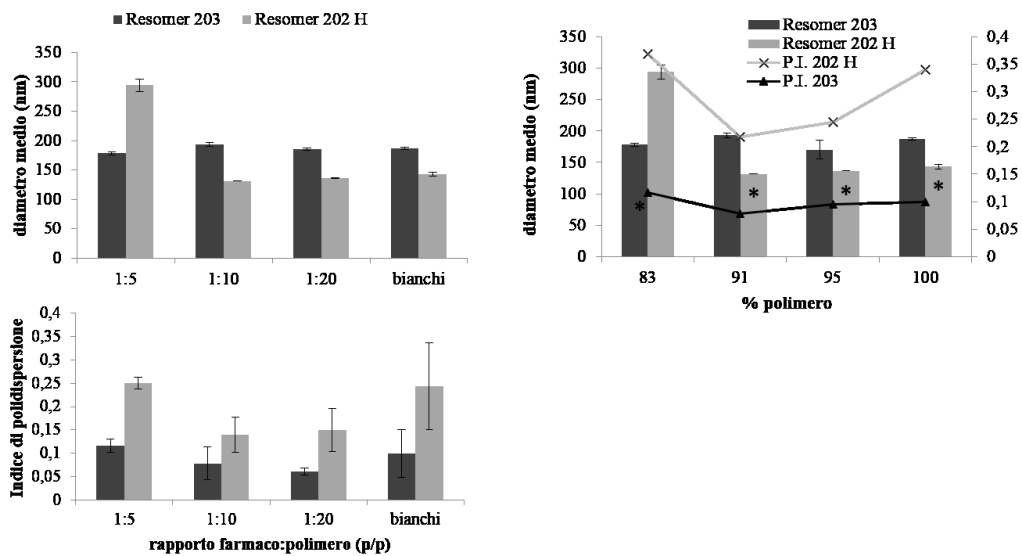


Figura 4. Effetto del tipo e della quantità di polimero sul diametro medio (dm) (barre) e sull'indice di polidispersione (PI) (linee) delle nanoparticelle. Sinistra. Rapporto in peso tra farmaco e polimero. Destra. Percentuale di polimero nelle formulazioni. (Barre. n=9, * p<0,05 vs Resomer 202 H 83%).

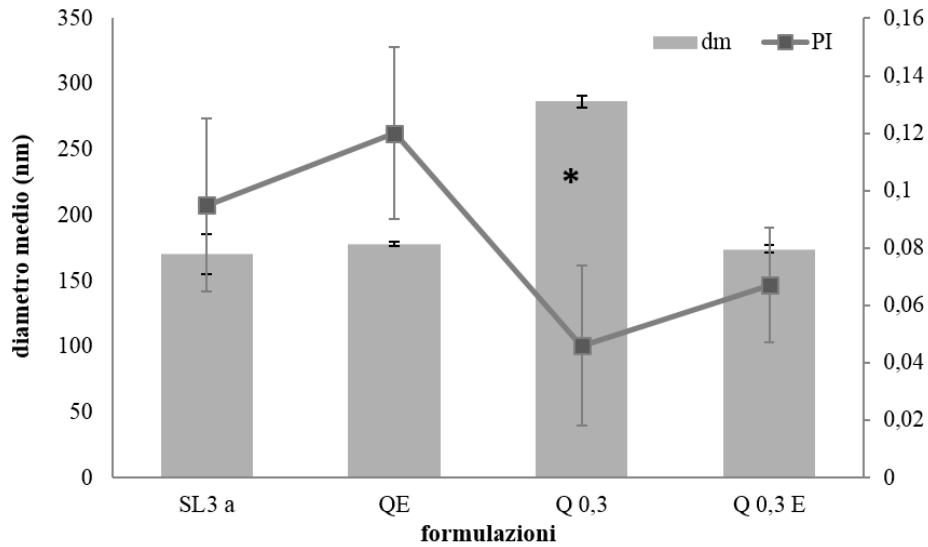


Figura 5. Variazione diametro medio (dm) (barre) ed indice di polidispersione (PI) (linee) sulla seconda serie di formulazioni confrontate con **SL3a**. (Barre. n=9, *p<0,05 vs tutti).

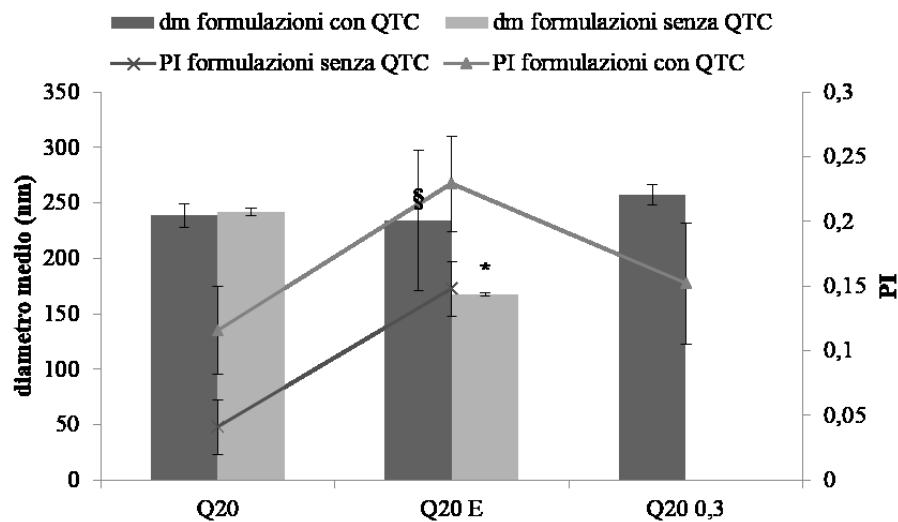


Figura 6. Variazione diametro medio (dm) (barre) ed indice di polidispersione (PI) (linee) delle formulazioni ottenute dall'ottimizzazione dei parametri formulativi di **Q20**. (Barre. n=9, p<0,05 * vs Q20_{senza QTC}; § p<0,05 vs Q20E_{senza QTC}).

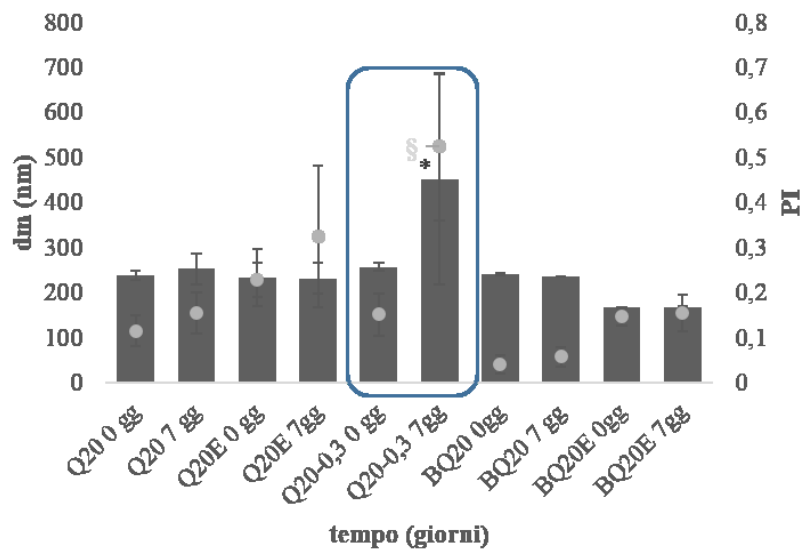


Figura 7. Diametro medio (dm) (barre) ed indice di polidispersione (PI) (pallini) delle formulazioni sottoposte a test di stabilità durante 7 giorni (gg). (Barre. n=3, * p<0,05 vs Q20-0,3(0 gg)). (Pallini. § p<0,05 vs Q20-0,3(0 gg)).

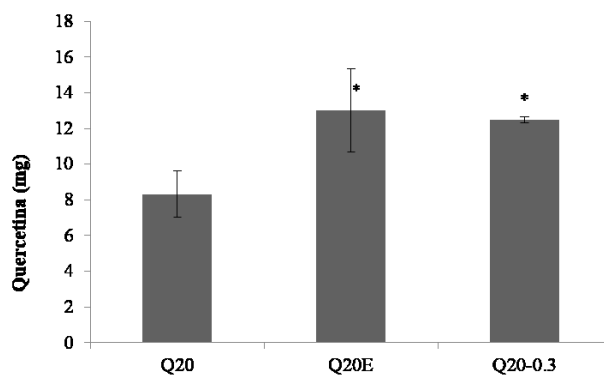
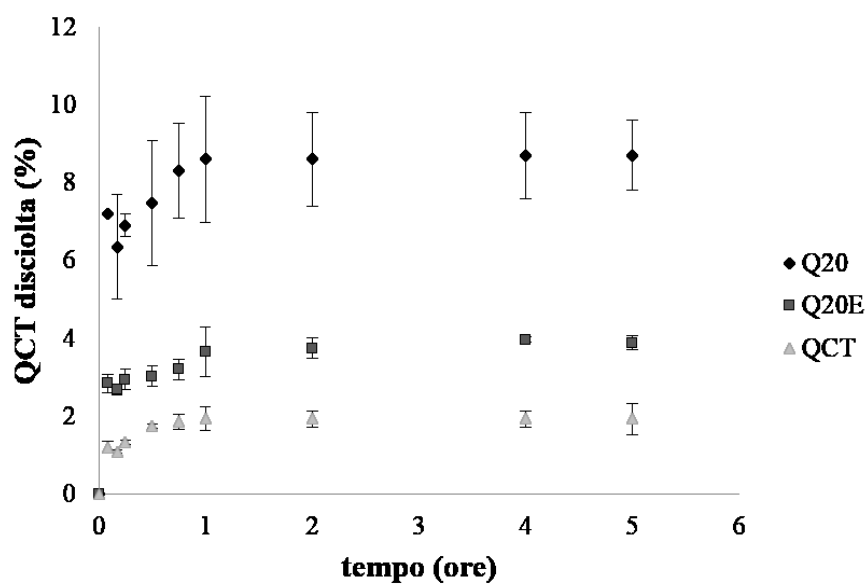


Figura 8. Contenuto in farmaco nelle formulazioni preparate con 20 mg di quercetina. (n=3, * p<0,05 vs Q20).



[Figura 9](#). Profilo di rilascio della QCT dalle formulazioni Q20 e Q20E.

Capitolo III

SLN come *carrier* per la Veicolazione di Materiale Oligonucleotidico come
Agente nel Trattamento della Patologia di Alzheimer

Questo è un lavoro svolto nell'ambito del progetto Erasmus
tra
l'Università di Sassari (**Italia**)
e
L'Instituto Superior de Ciencias da Saude-Norte (CESPU) (Porto, **Portogallo**)

Il lavoro sperimentale è stato eseguito presso l'Instituto Superior de Ciencias da Saude-Norte (CESPU) sotto la guida del Prof. Bruno Sarmento, presso il Dipartimento di Chimica e Farmacia e presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari sotto la guida del Prof. Gianfranco Pintus e della Dott.ssa Anna Maria Posadino

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Abstract

I siRNA rappresentano una promettente classe di farmaci oligonucleotidici impiegabili per il trattamento e/o la prevenzione delle patologie neurodegenerative. Il BACE1siRNA ne è un esempio per la terapia dell'Alzheimer.

Lo scopo del progetto è stato quello di sviluppare nanoparticelle solide lipidiche (SLN) destinate alla somministrazione orale di un neuro-farmaco di natura oligonucleotidica, qual'è il BACE1siRNA, in forma complessata con un peptide neuro-specifico (RVG-9R). L'obiettivo principale è stato quello di utilizzare sistemi nanoparticellari per consentire una protezione del complesso RVG-9R/BACE1siRNA destinato a somministrazione orale. Il lavoro si è articolato nelle seguenti fasi: *I)* studio dei parametri di formazione del complesso RVG-9R/BACE1siRNA; *II)* studio dei parametri formulativi per la preparazione di SLN non rivestite e rivestite con chitosano destinate alla veicolazione del complesso; *III)* caratterizzazione dimensionale e morfologica delle particelle ottenute; *IV)* studi di permeazione in tre differenti modelli intestinali cellulari; *V)* studi preliminari di espressione genica su colture cellulari neuronali (IMR-32).

Lo studio dei parametri di formazione del complesso ha dimostrato che, con un rapporto molare tra siRNA/peptide di 1:10, il siRNA viene completamente complessato e circondato dal peptide. La tecnica della doppia emulsione con omogeneizzazione per sonicazione ha permesso di ottenere SLN veicolanti il complesso. Gli studi formulativi hanno consentito di identificare le condizioni ottimali per ottenere il *carrier* veicolante il complesso. Con gli studi di permeazione su modelli intestinali si è osservato che i *carrier* modulano il passaggio di RVG-9R/BACE1siRNA attraverso le cellule. Infine, è stato dimostrato come le cellule IMR-32 siano degli utili modelli neuronali per la determinazione dell'attività farmacologica dell'oligonucleotide impiegato in quanto esprimenti l'enzima BACE-1.

Introduzione

L'applicazione terapeutica di un neuro-farmaco viene spesso ostacolata dalla barriera emato-encefalica (BEE) [Pardridge, 2001]. Questo è anche il caso dei farmaci oligonucleotidici ed in particolare dei siRNA (*short/small interfering RNA*), piccoli frammenti di RNA (21 nucleotidi) a doppio filamento coinvolti nel *pathway* dell'*RNA interference*. Sono responsabili, a concentrazioni nanomolari, del silenziamento di specifiche sequenze geniche [Krichevsky and Kosik, 2002]. Questa loro caratteristica li rende un'interessante ed innovativa classe di farmaci per patologie in cui si osserva un'alterata espressione genica, come ad esempio tumori, infezioni virali, ipercolesterolemia e patologie neurodegenerative. Nell'ambito dell'Alzheimer, è stato documentato che l'inibizione dell'espressione del BACE1 porta ad un miglioramento del morbo [Stockley *et al.*, 2006; Kao *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2003]. Nonostante il potenziale dei siRNA, l'applicazione in campo neuro-terapeutico è limitata a causa dell'elevata idrofilia, dell'alto peso molecolare e della suscettibilità alla degradazione enzimatica che nel complesso impediscono a queste molecole l'attraversamento della BEE e quindi il raggiungimento del SNC.

Alcune neurotossine si sono mostrate utili strumenti nel *targeting* mirato al cervello. Tra queste rientra RVG-9R, un derivato peptidico della glicoproteina del virus della rabbia che si lega ai recettori nicotinici (nAChR) $\alpha 7$ abbondantemente espressi nell'endotelio cerebrale. La complessazione del peptide con materiale oligonucleotidico permette a quest'ultimo di raggiungere il cervello, in seguito a somministrazione periferica, e di mantenerne inalterata l'azione biologica [Kumar *et al.*, 2007].

La via orale è la via di somministrazione d'elezione nel caso di patologie croniche come quelle neurodegenerative poiché è un metodo non invasivo, indolore, facilmente eseguibile, di basso costo e con elevata *compliance* da parte dei pazienti. La permeazione di un farmaco, destinato alla via orale, viene dapprima predetta *in vitro* impiegando modelli cellulari, i quali consentono di effettuare studi preliminari evitando l'utilizzo di modelli animali. A tal fine vengono spesso impiegati modelli cellulari di epitelio semplice (Caco-2), che hanno la caratteristica di presentare *tight junction* così come quelle intestinali, ma sono comunque ben lontani dal riprodurre le condizioni ben più complesse ritrovate nell'intestino umano. Per questo motivo, la ricerca si è indirizzata nello sviluppo di nuovi modelli cellulari per lo studio della permeazione di un farmaco destinato ad una somministrazione orale [Antunes *et al.*, 2013; Araújo *et al.*, 2013].

I sistemi nanoparticellari vengono spesso impiegati per garantire la protezione di una molecola dall'ambiente circostante e, nell'ambito della somministrazione orale, sono spesso impiegati per far fronte alle aggressive condizioni di pH ed enzimatiche incontrate nel tratto

gastro-intestinale, nonché favorire la biodisponibilità orale del farmaco [Desai *et al.*, 2011; Severino *et al.*, 2012]. I sistemi nanoparticellari per la veicolazione di siRNA rappresentano un approccio che consente di superare le barriere extra- ed intracellulari affinché il siRNA sia in grado di innescare, con un'entità rilevante, i suoi effetti biologici [Ballarín-González *et al.*, 2013].

Le nanoparticelle costituite da lipidi, specialmente cationici, si sono mostrate utili strumenti per favorire il processo di trasfezione cellulare di oligonucleotidi, grazie alle loro caratteristiche chimico-fisiche che permettono il passaggio pressochè indisturbato attraverso le membrane cellulari [Tseng *et al.*, 2009]. Nel presente lavoro, l'obiettivo è stato quello di sviluppare dei sistemi nanoparticellari il cui compito principale fosse quello di proteggere dall'ambiente gastro-intestinale e favorire la permeazione attraverso la mucosa intestinale di un complesso siRNA/RVG capace di per sè di raggiungere la BEE ed esplicare il suo ruolo biologico. E' stato condotto anche uno studio per determinare il rapporto ideale tra siRNA e RVG-9R per l'ottenimento di una massima interazione tra le due sostanze.



Schema illustrante le principali fasi del lavoro.

Metodi

Materiali

Il 6-FAM–BACE1siRNA (6-FAM nell'estremità 3' del filamento senso), il polivinilalcol (PVA) (PM 30000-70000, idrolizzato al 87-90%) ed il chitosano (PM 50 kDa, grado di deacetilazione 75-85%) sono stati acquistati da Sigma-aldrich, Italia. Il frammento chimero del virus della rabbia (RVG-9R) è stato acquistato da AnaSpec, Belgio. L'anticorpo policlonale di coniglio anti-BACE1 è stato acquistato dalla ditta Abcam, USA.

Il Witepsol E85 è stato gentilmente donato da CremerOleo, Germania.

EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*): identificazione oligonucleotide e peptide

Per l'EMSA, 100 pmol di 6-FAM–BACE1siRNA sono state incubate con il peptide RVG-9R ad un rapporto molare (siRNA/peptide) di 1:0,1; 1:0,5; 1:1; 1:5 e 1:10 in acqua di grado biologico, per 15', al riparo dalla luce e sottoposti ad elettroforesi in gel d'agarosio al 2%. Il siRNA e l'RVG-9R non complessati sono stati utilizzati come controllo. L'analisi qualitativa dell'oligonucleotide è stata effettuata utilizzando 6-FAM–BACE1siRNA. Per l'identificazione del peptide, il gel è stato immerso in una soluzione di colorante (40% metanolo, 10% acido acetico glaciale, 0,25% Coomassie® Brilliant Blue) per 3 h, in blanda oscillazione, ed infine decolorato (20% metanolo, 10% acido acetico glaciale) per tutta la notte a 4°C.

Preparazione delle SLN

Sono stati allestite due differenti formulazioni di SLN: non rivestite (**NR**) e rivestite con chitosano (**C**). Le **NR** sono state ottenute con il metodo della doppia emulsione acqua/olio/acqua ($a_1/o/a_2$). Da queste, in seguito al rivestimento con chitosano, è stato ottenuto il lotto **C**. Nello specifico, il lotto **NR** è stato prodotto solubilizzando la matrice lipidica Witepsol E85 (200 mg) nel solvente organico CH_2Cl_2 (2 mL) ed addizionandola di una soluzione acquosa del complesso RVG-9R/BACE1siRNA (200 μ L; siRNA 1 μ M) con un rapporto molare di 1:10 in siRNA/RVG9R, scelto sulla base dei precedenti esperimenti. L'emulsione primaria a_1/o è stata omogenizzata per sonicazione (Bioblock Vibracell sonicator Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France), a 70% *amplitude* per 30''. Questa è stata addizionata ad una soluzione di tensioattivo (10 mL) PVA al 2% (p/v) ed omogeneizzata nelle stesse condizioni. L'emulsione $a_1/o/a_2$ è stata lasciata sotto costante agitazione magnetica, a temperatura ambiente, sino a completa evaporazione del solvente organico con il conseguente ottenimento di una sospensione di SLN.

Il lotto **C** è stato ottenuto aggiungendo goccia a goccia la sospensione **NR** ad una soluzione di chitosano 1% (p/v), in 1% (v/v) di acido acetico (pH 4,6) addizionata di PVA 2% (p/v). Il rapporto in volume tra soluzione di chitosano e sospensione **NR** è stato di 1:1 ([Tab. 1](#)).

Il siRNA impiegato è stato il 6-FAM-BACE1siRNA. Ciascuna formulazione è stata preparata in triplicato. Ciascun campione è stato analizzato tre volte.

Caratterizzazione dimensionale delle SLN

Delle sospensioni ottenute, 100 uL (**NR**) e 200 uL (**C**) sono stati trasferiti in cuvetta, diluiti sino a 4,5 mL con H₂O milliQ filtrata ed analizzati in termini di diametro medio (dm), indice di polidispersione (PI) e potenziale zeta (pz) (90Plus/BI-MAS, ZetaPlus, Brookhaven Instruments Corporation, USA).

Ciascuna analisi è stata effettuata in triplicato.

Caratterizzazione morfologica delle SLN

Le analisi SEM/EDS sono state condotte sui campioni **NR** e **C** utilizzando un microscopio elettronico a scansione ambientale ad alta risoluzione (Schottky) con microanalisi a raggi X e diffrazione elettronica da retrodiffusione (Quanta 400 FEG ESEM / EDAX Genesis X4M).

Il rivestimento dei campioni è stato effettuato per *sputtering* con un sottile strato di Au/Pd utilizzando la metodica SPI di rivestimento per *sputtering* dello strumento.

Ciascuna immagine è provvista di una barra dati con le principali condizioni di analisi.

Cellule

Le cellule Caco-2 (passaggio 35) e HT29-MTX (passaggio 44) sono state fatte crescere separatamente in fiasche per coltura (Orange Scientific, Belgio) in medium completo consistente di DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) addizionato del 10% (v/v) di siero fetale bovino inattivato, 1% (v/v) L-glutammina, 1% (v/v) amminoacidi non essenziali e 1% (v/v) di una miscela di antibiotici-antimicotici (concentrazione finale di 100 U/mL Penicillina e 100 U/mL Streptomicina). Le cellule sono state *splittate* una volta alla settimana con 0,25% tripsina-EDTA (1x) e seminate alla densità di 5×10^5 cellule in fiasche da 75 cm². Il mezzo di coltura è stata rimpiazzato ogni 2 giorni. Dove non indicato, tutti i reagenti sono stati acquistati da Gibco[®] (Invitrogen Corporation, Life Technologies, UK). Le cellule sono state incubate (CellCulture[®] CO₂ Incubator, ESCO GB Ltd., UK) a 37°C e 5% CO₂ in atmosfera satura di acqua. Le cellule Raji B (passaggio 14) sono state fatte crescere in fiasche utilizzando medium completo con la stessa composizione sopra riportata.

Le cellule IMR-32 (passaggio 5) sono state fatte crescere in fiasche utilizzando un medium consistente di DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) addizionato del 10% (v/v) di siero fetale bovino inattivato.

Permeazione in modelli intestinali cellulari

Gli esperimenti di permeazione cellulare sono stati condotti utilizzando tre differenti modelli cellulari: cellule Caco-2 in mono-coltura; cellule Caco-2 + HT29-MTX in co-coltura; cellule Caco-2 + HT29-MTX + Raji B in co-coltura. I modelli di coltura cellulari sono stati seminati utilizzando il protocollo messo a punto da [Antunes *et al.* \(2013\)](#).

Brevemente, le cellule Caco-2 sono state seminate in mono-coltura, in di-coltura con le cellule HT29-MTX ed in tri-coltura con le cellule HT29-MTX e Raji B con un rapporto tra Caco-2 e HT29-MTX di 90:10 in inserti Transwell™ per piastre da 6 pozzetti (diametro pori 3µm, policarbonato, 4,67 cm²) (Corning Life Sciences, Olanda). Le cellule Caco-2 e HT29-MTX sono state seminate nel compartimento apicale degli inserti Transwell™, ad una concentrazione finale di 1x10⁵ cellule/cm² per inserto. Le cellule sono state mantenute nelle stesse condizioni delle mono-culture e lasciate crescere per 14 giorni, rinnovando il mezzo di crescita ogni 2. Trascorso tale tempo, le cellule Raji B (1x10⁶ cellule) sono state addizionate nel compartimento basolaterale ed il modello in tri-coltura è stato lasciato in crescita per circa 6-7 giorni prima di effettuare gli esperimenti di permeazione. La co-coltura Caco-2:HT29-MTX è stata seminata come precedentemente descritto senza l'aggiunta delle Raji B. Tutti i monostrati cellulari sono stati utilizzati dopo 14-21 giorni in coltura effettuando un monitoraggio costante sull'integrità del monostrato mediante misurazione TEER.

Per gli esperimenti di permeazione è stato rimosso il medium di crescita ed il monostrato è stato lavato nel compartimento apicale con 1,5 mL ed in quello basolaterale con 2,5 mL di HBSS (Hank's balanced salt solution) a 37°C. Sia il complesso non formulato (**L**) che formulato in SLN (**NR**, **C**) sono stati addizionati al compartimento apicale in una quantità complessiva in 6-FAM-BACE1siRNA di 1,39 µg/pozzetto.

A differenti intervalli di tempo (15', 30', 60', 120', 240') dal compartimento basolaterale sono stati prelevati 200 µL di campione, successivamente ripristinati, ed al termine dell'esperimento è stato prelevato un volume uguale dal compartimento apicale. I campioni sono stati trasferiti in piastre nere per analisi di fluorescenza (96 pozzetti, MICROTEST™ Falcon) e sottoposti ad analisi spettrofotometrica (λ_{ex} : 492 nm; λ_{em} : 520 nm).

Studi preliminari in cellule neuronali: *western blot*

Le cellule IMR-32, precedentemente coltivate in fiasche T25, sono state raccolte ed omogeneizzate in *lysis buffer* contenete una miscela di inibitori delle proteasi. Gli estratti cellulari, preparati dopo centrifugazione a 13000 rpm, sono stati risolti tramite SDS-PAGE. Le proteine sono state quindi trasferite in membrane di nitrocellulosa e *blotted* con l'appropriato anticorpo primario anti-BACE1 a differenti gradi di diluizione (1:1000, 1:500; 1:250; 1:100) ed anticorpi secondari anti-rabbit HRP (Santa Cruz). La rivelazione è stata condotta tramite ECL (Amersham Biosciences, Milano, Italia).

Risultati

EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*): identificazione oligonucleotide e peptide

L'inibizione dell'espressione del BACE1 porta ad un miglioramento della patogenesi dell'Alzheimer [Kao *et al.*, 2004; Singer *et al.*, 2005]. Un siRNA complessato a RVG-9R è in grado di raggiungere selettivamente il cervello e di esplicare le sue azioni farmacologiche in seguito a somministrazione parenterale [Kumar *et al.*, 2007]. In ciò viene trovata la spiegazione nella scelta del RVG-9R per la veicolazione sito-specifica del BACE1siRNA per il trattamento del morbo di Alzheimer.

Il test è stato eseguito al fine di valutare il rapporto ideale per la formazione del complesso tra il peptide e l'oligonucleotide. Sulla base della fluorescenza emessa dal 6-FAM-BACE1siRNA è stato possibile individuare l'oligonucleotide. Dall'analisi qualitativa è emerso che l'impiego di rapporti molari di 1:5 e 1:10 (siRNA/RVG) porta alla formazione di complessi in cui tutto l'oligonucleotide impiegato interagisce con il peptide (Fig. 1). Con rapporti inferiori (1:0,1; 1:0,5; 1:1) il siRNA ha la stessa mobilità elettroforetica rispetto al controllo (siRNA libero) indicando come in questi non si sia avuta una sufficiente interazione elettrostatica con il peptide (Fig. 1).

La presenza del peptide nel gel è stata successivamente evidenziata tramite la tecnica di colorazione con Coomassie® Brilliant Blue [Lonza Bench Guides]. Questa ha permesso di stimare che solo con un rapporto molare di 1:10 il peptide riesce a complessare l'oligonucleotide circondandolo completamente. Solamente in questo caso, infatti, il peptide si è legato al colorante (Fig. 2). Il risultato ha indotto a pensare che il siRNA venga completamente circondato e quindi protetto da RVG-9R se il rapporto molare di quest'ultimo è maggiore di 10 volte rispetto all'oligonucleotide. Ciò giustifica la scelta nell'utilizzo del rapporto 1:10 nelle fasi successive del lavoro. Inoltre, del complesso così formato, è documentata la buona capacità di trasfezione cellulare, nonché le capacità di raggiungere il cervello in seguito a somministrazione parenterale [Kumar *et al.*, 2007].

Preparazione e caratterizzazione dimensionale delle nanoparticelle solide lipidiche

Il dm e il PI hanno dimostrato come il metodo utilizzato abbia portato all'ottenimento di SLN in sospensione. L'analisi del pz ha confermato la presenza del rivestimento di chitosano nelle formulazioni C ([Tab. 2](#)). Il metodo preparativo si è rivelato semplice e veloce ed ha consentito di lavorare in blande condizioni di stress termici e meccanici, caratteristiche importanti vista la sensibilità del materiale impiegato. Le analisi al SEM hanno confermato i parametri dimensionali ottenuti tramite DLS, mostrando inoltre una morfologia particellare irregolare ([Fig. 3](#)).

Permeazione SLN in modelli intestinali cellulari

Gli studi di permeazione sono stati condotti in tre differenti modelli intestinali cellulari. Il modello in mono-coltura di cellule Caco-2 è il modello *in vitro* più utilizzato per predire il grado di permeazione di un farmaco nell'epitelio intestinale [[Ungell et al., 2004](#); [Shah et al., 2006](#)]. Tuttavia, è un modello semplice e lontano dalle reali condizioni riscontrate nel piccolo intestino dell'uomo. Il modello in di-coltura, grazie alla presenza delle HT29-MTX è in grado di simulare un epitelio intestinale umano secernente muco. Infine, il modello in tri-coltura permette di riprodurre le stesse caratteristiche della di-coltura con in più l'espressione di cellule M, cellule presenti nelle placche di Payer dell'intestino tenue, coinvolte nel passaggio di una sostanza dall'intestino alla linfa. Questi ultimi due modelli sono in grado di riprodurre *in vitro* una situazione più simile a quella riscontrata nel tenue umano [[Antunes et al., 2013](#); [Araújo et al., 2013](#)].

I risultati hanno evidenziato che il complesso non formulato permea allo stesso modo nei differenti modelli cellulari impiegati con un passaggio immediato e quasi totale già ai 15' di incubazione ([Fig. 4](#)). Le formulazioni rivestite con chitosano (C) sono quelle che hanno mostrato un minore grado di permeazione, la quale è maggiore nel modello della di-coltura. Il fenomeno potrebbe essere attribuito ad una interazione tra il muco, carico negativamente, ed il polimero mucoadesivo presente sulla superficie delle SLN [[Fonte et al., 2012](#)]. Le formulazioni non rivestite (NR), invece, permettono un maggiore passaggio dell'oligonucleotide nei modelli in mono- e tri-coltura rispetto alle C, che hanno una permeazione maggiore nel modello in di-coltura, confermando quanto detto sopra ([Fig. 4](#)). Nell'insieme i dati hanno mostrato come il passaggio del complesso peptide/oligonucleotide venga modulato dalle SLN. Ulteriori studi (microscopia a fluorescenza) si rendono necessari affinché venga definita la modalità di passaggio cellulare: complesso dissociato, complesso rilasciato dal *carrier* o complesso associato al *carrier*.

Studi preliminari in cellule neuronali: *western blot*

Le SLN sviluppate hanno lo scopo di veicolare al cervello il materiale oligonucleotidico, sotto forma di complesso peptidico sito-specifico, il cui passaggio al cervello è stato dimostrato da [Kumar et al. \(2007\)](#).

Al fine di valutare la capacità dei *carrier* di fungere da tali senza modificare l'attività del farmaco, sono stati progettati studi su cellule neuronali.

Cellule di neuroblastoma (IMR-32) sono state scelte poiché esprimono il recettore target per il peptide [[Ween et al., 2010](#)] che, in seguito all'interazione con quest'ultimo, permette l'ingresso del complesso peptide/siRNA [[Kumar et al., 2007](#); [Alvarez-Erviti et al., 2011](#)].

Lo studio preliminare ha riguardato la ricerca dell'enzima target (BACE-1) dell'oligonucleotide nelle cellule IMR-32. La conferma dell'espressione di questo consente l'utilizzo della linea cellulare per i propositi fissati.

Il *western blot* è stato eseguito con differenti concentrazioni (1:1000; 1:500; 1:250; 1:100) di anticorpo primario anti-BACE1 in modo da determinare sperimentalmente anche la diluizione ideale da applicare nel ricercare l'enzima sul modello cellulare.

I risultati hanno mostrato che le IMR-32 esprimono costitutivamente l'enzima di interesse e che la concentrazione ideale dell'anticorpo primario anti-BACE1 acquistato è di 1:100 ([Fig. 5](#)).

Discussione

La scelta delle molecole oligonucleotidiche quali farmaci è in continuo crescendo grazie alla possibilità dell'impiego nel trattamento di patologie clinicamente differenti ma tutte accumulate da alterata espressione proteica. In virtù di queste interessanti caratteristiche, gli oligonucleotidi sono stati ampiamente oggetto di studi per rendere possibile una loro applicazione terapeutica, tanto che hanno raggiunto con successo fasi avanzate di ricerca. Sono infatti in atto *trial* clinici (I, II) per morbi di cui alcuni esempi sono tumori, infezioni virali, ipercolesterolemia ed insufficienza renale [Kanasty *et al.*, 2013]. Interessante notare che nella quasi totalità di questi il principio attivo è stato formulato in sistemi nanoparticellari. Tuttavia, non sono stati ancora raggiunti studi così avanzati nel caso di oligonucleotidi destinati alla prevenzione o al trattamento delle patologie del SNC, specialmente a causa della difficoltà nel trovare metodiche non invasive per il superamento della BEE, garantendo al tempo stesso che il farmaco raggiunga il sito d'azione in concentrazioni sufficienti. In questo studio, sono state ottenute SLN come *carrier* per la veicolazione dell'oligonucleotide BACE1siRNA sottoforma di complesso con il peptide sito-specifico RVG-9R. L'ottenimento delle SLN può essere raggiunto mediante molteplici metodiche. Nel lavoro, le SLN sono state ottenute impiegando un metodo rapido ed evitando stress termici e meccanici i quali porterebbero ad un danneggiamento del complesso oligonucleotide/peptide. Le SLN sono state prodotte sia in forma non rivestita che rivestite con chitosano, il quale è un polimero biocompatibile e biodegradabile con azioni di mucoadesione e di *penetration enhancer* e, per le citate caratteristiche, facilita il passaggio di molecole idrofiliche (come i siRNA) attraverso le membrane epiteliali. Queste azioni scaturiscono dall'interazione tra le cariche positive del chitosano e quelle negative delle membrane cellulari, da cui ne deriva un riarrangiamento strutturale nelle proteine costituenti le *tight junction* [Andrade *et al.*, 2011]. Il chitosano ha dimostrato così di incrementare la biodisponibilità orale di diversi farmaci, tra i quali molecole soggette ad elevata degradazione enzimatica e scarsa abilità di passaggio attraverso le membrane biologiche, come i peptidi e proteine [Qian *et al.*, 2006]. Questa potrebbe essere una spiegazione per i risultati ottenuti negli studi di permeazione attraverso i modelli cellulari intestinali. Si è infatti osservato un maggiore passaggio delle formulazioni **C**, rispetto alle **NR**, attraverso i modelli in co-coltura di Caco-2 ed HT29-MTX, rappresentanti un epitelio secernente muco, osservazione in accordo con quanto riportato dalla letteratura: il chitosano favorisce la permeazione in un epitelio secernente muco [Vilasaliu *et al.*, 2012]. È stato documentato che la presenza del chitosano in sistemi nanoparticellari promuove la protezione e l'assorbimento orale di farmaci idrofili e soggetti a degradazione enzimatica lungo il tratto gastro-intestinale

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

[Bowman and Leong, 2006; Fonte *et al.*, 2011]. In aggiunta, nel tessuto intestinale, le NP con un diametro medio compreso tra i 100 ed i 200 nm subiscono un maggiore *up-take* rispetto a particelle di più grosse dimensioni [Desai *et al.*, 1997; Caldorera-Moore *et al.*, 2010]; tuttavia, anche particelle più grandi (400 nm) si sono mostrate adatte nella veicolazione orale di farmaci [Sarmiento *et al.*, 2007]. La permeazione di C è stata di minore entità nel modello di epitelio semplice ed in quello più complesso in cui sono presenti anche le cellule M, dove è minore la presenza di muco. Tuttavia dagli studi di permeazione è emerso che il complesso è in grado di passare attraverso i modelli cellulari intestinali senza che questo venga formulato in SLN (L), con percentuali addirittura maggiori rispetto a quelle osservate prendendo in considerazione le formulazioni. Il suo comportamento si è inoltre mostrato simile in tutti e tre i modelli. Il fenomeno potrebbe essere probabilmente dovuto ad un'interazione con le cellule intestinali che conduce ad un meccanismo di transitosi per adsorbimento promosso dalle cariche positive del peptide complessante il siRNA, con la possibile esclusione di meccanismi recettoriali. È stato infatti documentato che RVG-9R riconosce con specificità i recettori nicotinici $\alpha 7$, la cui presenza nel sito intestinale sembra essere ridotta a livello del sistema nervoso enterico, innervato dal nervo vago e coinvolto nella risposta infiammatoria [Costantini *et al.*, 2012]. Tale sistema è comunque assente nei modelli cellulari impiegati, mentre dagli studi preliminari è emerso che nel complesso siRNA/RVG-9R (rapporto molare di 1:10) il peptide circonda completamente il siRNA e porta alla formazione di un sistema carico positivamente.

Conclusioni

Le SLN sviluppate come sistema di trasporto per materiale oligonucleotidico destinato alla somministrazione orale, rivestite e non rivestite con chitosano, in modelli intestinali cellulari modulano il grado di permeazione del complesso RVG-9R/BACE1siRNA veicolato, se confrontato al complesso non formulato.

Resta da chiarire come il complesso permea attraverso le cellule, sia quando si tratti della sua forma libera che veicolata in sistemi nanoparticellari. Va inoltre considerata la presenza dei recettori $\alpha 7$ nAChR nel sistema nervoso enterico [Costantini *et al.*, 2012] coinvolti nella protezione dell'intestino ed espressi nei macrofagi qui residenti [Pelissier-Rota *et al.*, 2013] che potrebbero influenzare il passaggio ematico del complesso. La dimostrazione che il *carrier* determini un passaggio del complesso intatto, proteggendolo nel tratto gastro-intestinale dall'ambiente circostante, permetterebbe l'uso dei sistemi nella somministrazione orale di oligonucleotidi destinati al trattamento mirato di patologie centrali. La stabilità

ematica di un siRNA complessato al peptide RVG-9R e la sua capacità di raggiungere il SNC mantenendo l'attività farmacologica, è stata già provata [Kumar *et al.*, 2007].

Bibliografia

Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhali S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* 2011;29(4):341-5.

Andrade F, Antunes F, Nascimento AV, da Silva SB, das Neves J, Ferreira D, Sarmiento B. Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. *Curr Drug Discov Technol.* 2011;8(3):157-72.

Andreani T, SofiaMacedo A, Fangueiro JF, Santana MA, Silva AM, Souto EB. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *J Drug Deliv.* 2012; 2012: 750891. Consultabile al: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228282/#!po=2.08333>).

Antunes F, Andrade F, Araújo F, Ferreira D, Sarmiento B. Establishment of a triple co-culture in vitro cell models to study intestinal absorption of peptide drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;83(3):427-35.

Araújo F, Sarmiento B. Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies. *Int J Pharm.* 2013;458(1):128-34.

Ballarín-González B, Dagnaes-Hansen F, Fenton RA, Gao S, Hein S, Dong M, Kjems J, Howard KA. Protection and Systemic Translocation of siRNA Following Oral Administration of Chitosan/siRNA Nanoparticles. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;5;2:e76.

Bowman K, Leong KW. Chitosan nanoparticles for oral drug and gene delivery. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(2):117-28.

Caldorera-Moore M, Guimard N, Shi L, Roy K. Designer nanoparticles: Incorporating size, shape, and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010;7(4):479-95.

Costantini TW, Krzyzaniak M, Cheadle GA, Putnam JG, Hageny AM, Lopez N, Eliceiri BP, Bansal V, Coimbra R. Targeting α -7 nicotinic acetylcholine receptor in the enteric nervous system: a cholinergic agonist prevents gut barrier failure after severe burn injury. *Am J Pathol.* 2012;181(2):478-86.

Desai PP, Date AA, Patravale VB. Overcoming poor oral bioavailability using nanoparticle formulations - opportunities and limitations. *Drug Discov Today Technol.* 2012;9(2):e71-e174.

Desai MP, Labhasetwar V, Walter E, Levy RJ, Amidon GL. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm Res.* 1997;14:1568-73.

Fonte P, Nogueira T, Gehm C, Ferreira D, Sarmento B. Chitosan-coated solid lipid nanoparticles enhance the oral absorption of insulin. *Drug Deliv and Transl Res.* 2011;1(4):299-308.

Fonte P, Andrade F, Araújo F, Andrade C, Neves Jd, Sarmento B. Chitosan-coated solid lipid nanoparticles for insulin delivery. *Methods Enzymol.* 2012;508:295-314.

Kanasty R, Dorkin JR, Vegas A, Anderson D. Delivery materials for siRNA therapeutics. *Nature Materials.* 2013;12:967-77.

Kao SC, Krichevsky AM, Kosik KS, Tsai LH. BACE1 Suppression by RNA Interference in Primary Cortical Neurons. *J Biol Chem.* 2004;279(3):1942-9.

Krichevsky AM, Kosik KS. RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(18):11926-9.

Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Le SK, Shankar P, Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature.* 2007;448:39-43.

Lonza Bench Guides. Protein Separation in Agarose Gels: Consultabile al: http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_BenchGuides_SourceBook_Section_XIII_-_Protein_Separation_in_Agarose_Gels.pdf.

Miller VM, Gouvion CM, Davidson BL, Paulson HL. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(2):661-8.

Pardridge WM. Brain drug targeting: the future of brain drug development. Cambridge: Cambridge University Press; 2001.

Pelissier-Rota M, Lainé M, Ducarouge B, Bonaz B, Jacquier-Sarlin M. Role of Cholinergic Receptors in Colorectal Cancer: Potential Therapeutic Implications of Vagus Nerve Stimulation? *JCT.* 2013; 4(6): 1116-31.

Qian F, Cui F, Ding J, Tang C, Yin C. Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization. *Biomacromolecules.* 2006;7:2722-7.

Sarmento B, Martins S, Ferreira D, Souto EB. Oral insulin delivery by means of solid lipid nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2007;2(4):743-9.

Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog.* 2006;22(1):186-98.

Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci.* 2005;8(10):1343-9.

Stockley JH, Ravid R, O'Neill C. Altered beta-secretase enzyme kinetics and levels of both BACE1 and BACE2 in the Alzheimer's disease brain. *FEBS Lett.* 2006;580(28-29):6550-60.

Tseng YC, Mozumdar S, Huang L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(9):721-31.

Ungell AL. Caco-2 replace or refine? *Drug Discov Today Technol.* 2004;1(4):423-30.

Vllasaliu D, Casettari L, Fowler R, Exposito-Harris R, Garnett M, Illum L, Stolnik S. Absorption-promoting effects of chitosan in airway and intestinal cell lines: a comparative study. *Int J Pharm.* 2012;430(1-2):151-60.

Ween H, Thorin-Hagene K, Andersen E, Grønlien JH, Lee CH, Gopalakrishnan M, Malysz J. *Neurochem Int.* 2010;57(3):269-77.

Tabelle**Tabella 1.** Parametri formulativi e di processo per l'allestimento delle SLN.

Lotto	Fase lipidica (o)	Fase acq. esterna (a ₂)	Fase acq. interna (a ₁)	Rivestimento	Parametri di processo
NR, C	200 mg Witepsol E85 in 2 mL CH ₂ Cl ₂	PVA 2% (p/v) 10 mL	RVG-9R/BACE1siRNA in 200 μL H ₂ O RNase-DNase free	Chitosano 1% (p/v) in 1% (v/v) acido acetico + 2% (p/v) PVA, pH 4,6	sonicazione 70% amplitude, 30''

Tabella 2. Analisi dimensionale delle SLN espressa in termini di diametro medio (dm), indice di polidispersione (PI) e potenziale zeta (pz) ± deviazione standard (DS).

<u>Lotto</u>	<u>dm (nm) ± DS</u>	<u>PI ± DS</u>	<u>zp (mV) ± DS</u>
NR	335,76±34,81	0,013±0,00	-17,31±0,68
C	358,44±25,89	0,028±0,02	+10,54±0,75

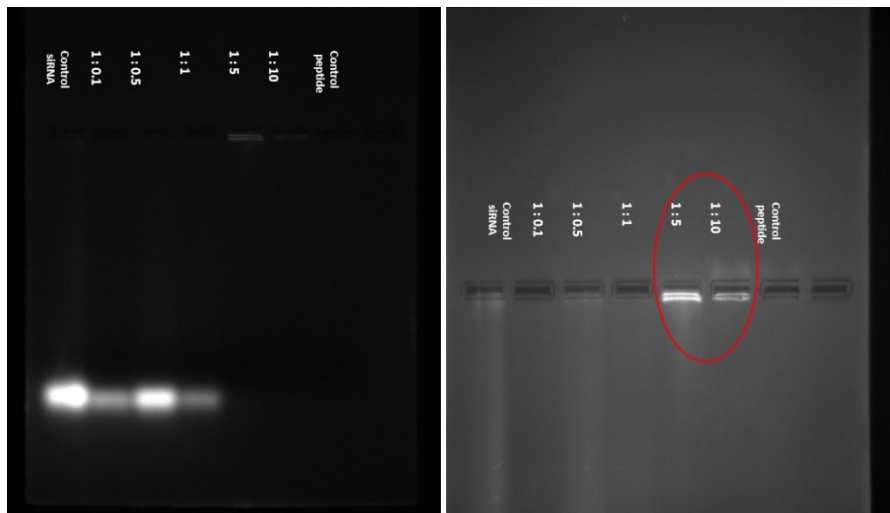
Figure

Figura 1. EMSA. Identificazione del 6FAM-BACE1siRNA libero o complessato con il peptide in rapporti molari di 1:0,1, 1:0,5; 1:1, 1:5 e 1:10 siRNA/peptide. *Sinistra.* Dettaglio del gel con, in evidenza, i rapporti del complesso in cui l'oligonucleotide viene completamente complessato dal peptide.

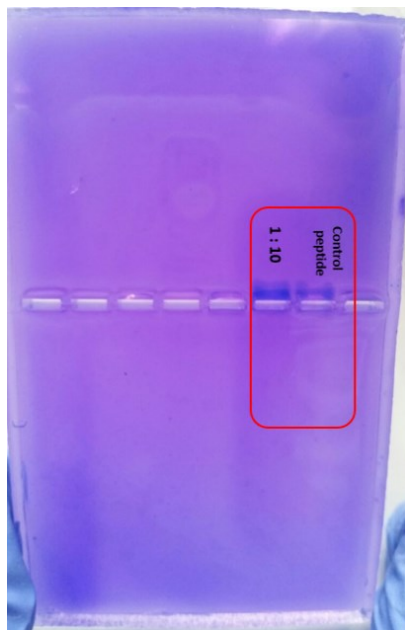


Figura 2. EMSA. Identificazione RVG-9R libero o complessato con l'oligonucleotide in rapporti molari di 1:0,1, 1:0,5; 1:1, 1:5 e 1:10 siRNA/peptide.

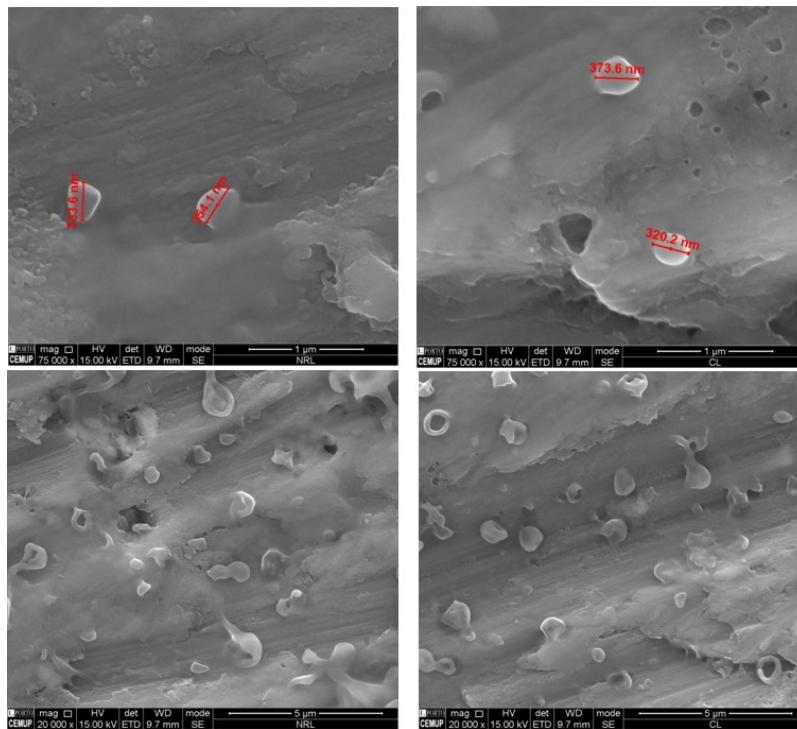


Figura 3. Immagini al SEM. Sinistra. Formulazioni NR. Destra. Formulazioni C.

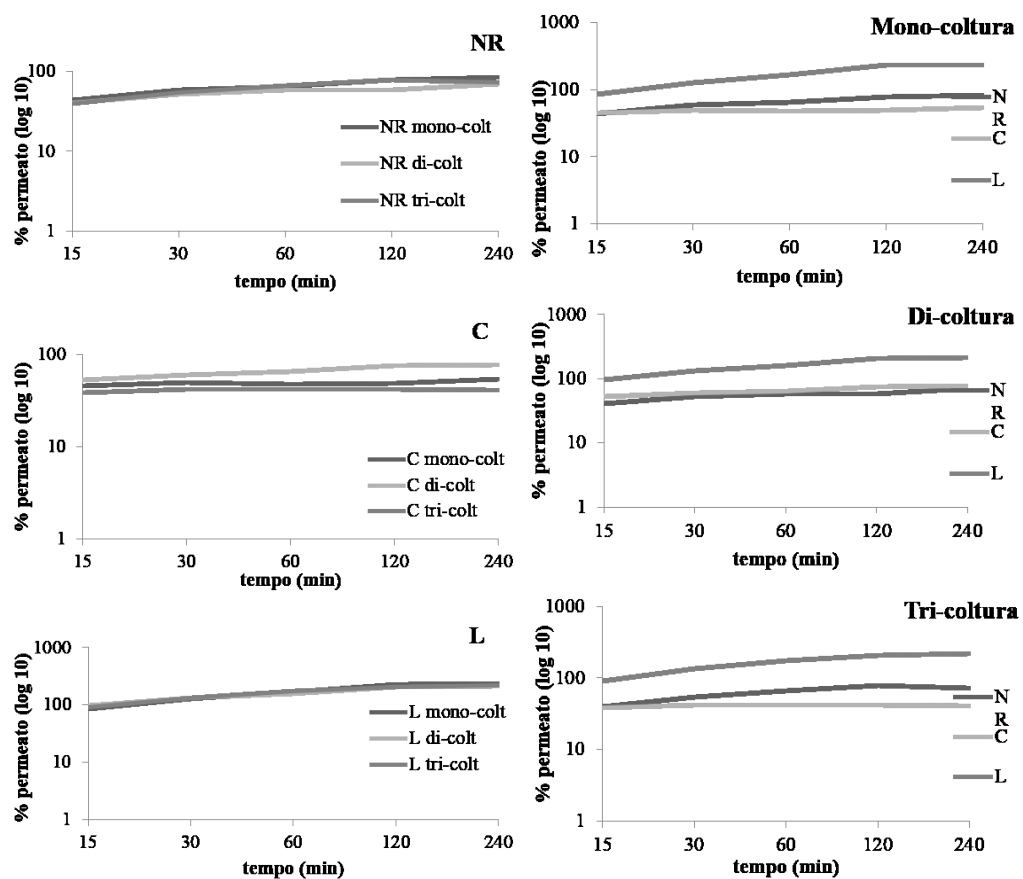


Figura 4. Studi di permeazione *in vitro* in modelli intestinali cellulari. *Destra.* Dall'alto verso il basso, confronto nella permeazione delle singole sostanze testate come formulazioni SLN non rivestite (**NR**), rivestite con chitosano (**C**) e del complesso non formulato (**L**) nei tre modelli cellulari. *Sinistra.* Dall'alto verso il basso, confronto nella permeazione delle diverse formulazioni in uno stesso modello cellulare di mono-coltura, di-coltura e tri-coltura. I risultati sono stati espressi come $\log(10)$. (Mono-colt = mono-coltura; di-colt = di-coltura; tri-colt = tri-coltura).

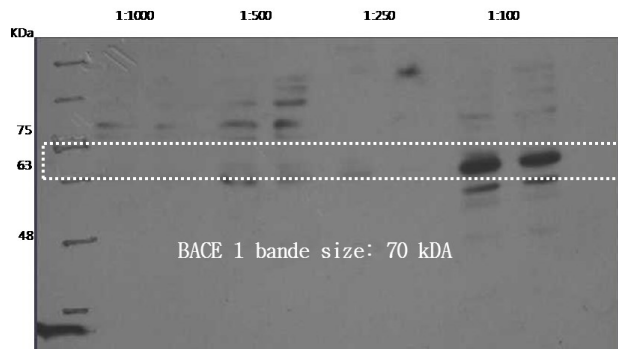


Figura 5. *Western blot.* Riconoscimento dell'anticorpo anti-BACE1 dell'enzima target a differenti gradi di diluizione.

Parte Terza

PROGETTAZIONE E SVILUPPO DI STRATEGIE PER IL *NOSE- TO-BRAIN*

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Capitolo I

Progettazione e Sviluppo di Nanoparticelle Solide Lipidiche come *Carrier* per la Vaccinazione *Nose-to-Brain*

Questo è un lavoro svolto nell'ambito del progetto Erasmus

tra

l'Università di Sassari (**Italia**)

e

il Dipartimento di Farmacia e Tecnologia Farmaceutica dell'Università dei Paesi Baschi
(Vitoria-Gasteiz, **Spagna**)

Il lavoro sperimentale è stato eseguito presso il Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università di Sassari ed il Dipartimento di Farmacia e Tecnologia Farmaceutica dell'Università dei Paesi Baschi (Vitoria-Gasteiz, Spagna) sotto la guida della Prof.ssa Rosa Hernandez.

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Abstract

L'interesse per la via nasale come sito di somministrazione di vaccini nasce dai numerosi vantaggi associati alla mucosa nasale, quali: elevata permeabilità, bassa attività enzimatica e presenza di cellule immunocompetenti. Inoltre, a differenza delle classiche modalità di vaccinazione, è un tipo di somministrazione indolore.

L'utilizzo di sistemi nanoparticellari, oltre a proteggere e facilitare il trasporto di un antigene, grazie alle caratteristiche dimensionali, è in grado di favorire un maggiore *up-take* da parte delle cellule tra cui quelle immuno-competenti.

Il progetto sviluppato ha previsto lo studio di nanoparticelle solide lipidiche (SLN) come possibili *carrier* per la vaccinazione intranasale, via sicura e di facile accesso.

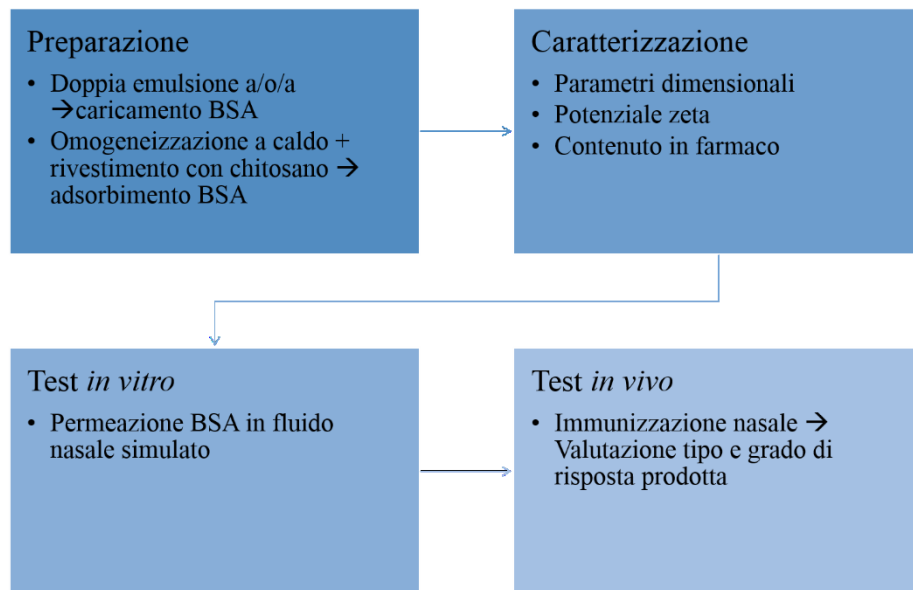
Lo studio si è articolato in una fase iniziale di tipo formulativo con la preparazione dei *carrier* nano-lipidici destinati ad un adsorbimento o un caricamento di una proteina antigene modello, la BSA. A tale scopo, sono state adottate due differenti tecniche, rispettivamente: l'omogeneizzazione a caldo seguita dal rivestimento con chitosano e la doppia emulsione acqua/olio/acqua ($a_1/o/a_2$) con evaporazione del solvente. Nella fase successiva sono stati valutati i parametri dimensionali e di carica superficiale, il contenuto di farmaco incorporato od adsorbito e la permeazione della BSA *in vitro*. Nell'ultima fase le formulazioni sono state saggiate *in vivo* in modo da stimare il grado ed il tipo di risposta immunitaria prodotta.

I risultati hanno indicato che le metodiche impiegate hanno permesso di ottenere SLN, le quali si sono mostrate capaci di adsorbire e veicolare la BSA, grazie alla presenza del rivestimento con chitosano, ma sono state incapaci nel caricarla. Gli studi di permeazione *in vitro* hanno evidenziato un passaggio modulato della BSA nell'arco del tempo indagato (2 h) in condizioni simulanti la mucosa nasale. Dai test *in vivo*, basati sull'uso delle formulazioni con BSA adsorbita, è stato evidenziato un picco di risposta immunitaria già dopo la prima settimana dalla somministrazione, con un tipo di risposta prevalentemente umorale. I sistemi sviluppati, privi dell'antigene, non hanno scatenato nessuna risposta immunitaria e si possono quindi definire innocui.

Introduzione

La via nasale è una strategia di somministrazione non invasiva che consente ad un neurofarmaco di bypassare la barriera emato-encefalica (BEE) e raggiungere il cervello; ne è stata infatti documentata la validità nel permettere ad un principio attivo di pervenire alle sedi centrali [Dalpiaz *et al.*, 2008;Fazil *et al.*, 2012;Gavini *et al.*, 2013]. Rappresenta un'interessante alternativa rispetto ai comuni metodi di vaccinazione in quanto la mucosa nasale ha un elevato grado di assorbimento, ridotta attività enzimatica nonché presenza di cellule immuno-competenti [Davis, 2001;Csaba *et al.*, 2009].

Le nanoparticelle, per le loro caratteristiche chimico/fisiche, si prestano ad essere dei sistemi capaci di modulare la risposta immunitaria. Un controllo della risposta immunitaria si rivela utile a fini terapeutici: una stimolazione può risultare efficace nella terapia dei tumori o nella vaccinazione, mentre una soppressione è auspicabile nel trattamento delle allergie, delle patologie autoimmuni o per prevenire il rigetto di trapianti [Landesman-Milo and Peer, 2012]. La modulazione della risposta immunitaria può avere un riscontro positivo anche nel contesto delle patologie neurodegenerative [Mestre and Ibarra, 2011], con particolare riguardo al morbo di Alzheimer [Fu *et al.*, 2005]. Questo lavoro è stato progettato con l'obiettivo di sviluppare nanoparticelle solide lipidiche (SLN) come possibili *carrier* di antigeni destinati ad una somministrazione nasale, scelta come via preferenziale per un'azione di immunizzazione mirata al SNC.



Schema illustrante le principali fasi del lavoro.

Metodi

Materiali

Il Plurol® SteariqueWL 1009INCI: poligliceril-6-distearato ed il Plurol® Oleique CC 497INCI: poligliceril-3-dioleato, sono stati gentilmente donati da Gattefossé (Gattefossé SAS, Saint-Priest Cedex, Francia). Il chitosano glutammato è stato ottenuto da PRIMEX EHF, Siglujordur, Islanda. L'albumina di siero bovino (BSA) è stata ottenuta da VWR Prolabo, International Ltd., Italia. Il Tween 80 è stato acquistato da Aeros Organics, Gees, Belgio. Il diclorometano (DCM) (CH₂Cl₂) è stato acquistato da Merck KGA, Darmstadt, Germania. Il mannitolo, Pearlitol 400 DC-Mannitol, è stato acquistato da Cruciani prodotti Crual s.r.l., Roma, Italia. Il Bradford Reagent è stato acquistato da Amresco, Solon Ind., Ohio, USA, mentre la MicroBCA Protein Assay Kit da Pierce Teknovas, Bilbao, Spagna. L'acqua è stata ottenuta da un sistema di purificazione Milli-Q R4, Millipore, Milano, Italia.

Preparazione delle nanoparticelle solide lipidiche

Due differenti metodiche sono state impiegate per l'ottenimento di nanoparticelle solide lipidiche (SLN) destinate alla veicolazione per adsorbimento o per caricamento della BSA (*bovine serum albumine*), scelta come molecola antigene modello.

Caricamento della BSA nelle SLN. Il metodo della doppia emulsione a₁/o/a₂ è stato impiegato per la preparazione di SLN destinate al caricamento della BSA. La matrice lipidica (Plurol®Stearique) ed il co-surfattante (Plurol®Oléique) sono stati solubilizzati nel solvente organico (CH₂Cl₂) ed addizionati goccia a goccia, sotto costante agitazione magnetica, di una soluzione acquosa contenente la BSA. La pre-emulsione ottenuta è stata quindi omogeneizzata in Ultra-Turrax (Ultra-Turrax®, T 25, IKA) (17600 rpm, 30 sec) e l'emulsione primaria (a₁/o) derivante, è stata lentamente addizionata, sotto costante agitazione magnetica, ad una fase acquosa contenente il tensioattivo allo 0,5% (p/v) (Tween 80) ed infine ancora omogeneizzata in Ultra-Turrax (17600 rpm, 5 min). Tale metodica è stata impiegata in modo da ottenere due differenti formulati di SLN in sospensione aventi una concentrazione pari a 1 mg/mL (**C BSA 1s**) e a 5 mg/mL di BSA (**C BSA 5s**). Con lo stesso metodo è stato preparato un terzo campione privo di farmaco (**C BSA 0s**) ([Tab. 1](#)). Ciascuna formulazione è stata allestita in triplicato.

Adsorbimento della BSA. Il metodo dell'omogeneizzazione a caldo è stato impiegato per la preparazione delle SLN destinate all'adsorbimento con la BSA. A tal fine, la procedura è stata sviluppata in modo da ottenere inizialmente delle sospensioni di SLN rivestite con chitosano le quali, in una fase successiva, sono state adsorbite con la BSA. Il chitosano, infatti, essendo carico positivamente, è in grado di interagire con le cariche negative della

BSA determinandone l'adsorbimento nella superficie particellare. Per la preparazione delle SLN, la fase oleosa, composta dalla matrice lipidica (Plurol®Stearique) e dal co-surfattante (Plurol®Oléique) è stata fusa (60°C) e quindi addizionata, sotto costante agitazione magnetica, ad una soluzione acquosa (60°C) all'1% (p/v) in Tween 80 e 0,5% (p/v) in chitosano glutammato (Tab. 2). L'emulsione è stata infine omogeneizzata in Ultra-Turrax (17600 rpm, 5 min) e lasciata raffreddare a temperatura ambiente con l'ottenimento della sospensione nanoparticellare. Per l'adsorbimento proteico, la sospensione delle SLN è stata addizionata ad un pari volume di una soluzione acquosa di BSA (pH 7,6) in modo da ottenere una concentrazione finale di 1 mg/mL (L BSA 1s) o 5 mg/mL (L BSA 5s) e lasciata sotto agitazione magnetica (15 sec). Allo stesso modo sono state ottenute le formulazioni bianche (prive di farmaco) (L BSA 0s).

Ciascun campione è stato preparato in triplicato.

Misura delle dimensioni e del potenziale zeta

Tutte le formulazioni sono state analizzate in triplicato tramite spettroscopia di correlazione fotonica (PCS) (Malvern® Zetasizer Nano ZS Model ZEN 3600), al fine di determinare il diametro medio (dm) e la distribuzione dimensionale (PI) delle sospensioni e dei relativi essiccati particellari. Le formulazioni sono state analizzate trasferendo in cuvetta una goccia del campione delle sospensioni o dei liofilizzati risospesi, diluendo con acqua milliQ precedentemente filtrata con filtri a membrana (0,45 µm) ed agitando al vortex (sospensioni) o sonicando (essiccati) per qualche secondo.

I risultati sono stati espressi in termini di $dm \pm$ deviazione standard (DS) e di $PI \pm DS$.

Il potenziale zeta ($p\zeta$) delle SLN è stato misurato nelle dispersioni delle formulazioni essiccate e risospese in acqua mediante ausilio del vortex. Tutte le analisi sono state effettuate in triplicato. La mobilità elettroforetica delle dispersioni è stata ottenuta tramite Zetasizer Nano (Malvern® ZS Model ZEN 3600, Malvern Instruments Ltd).

I risultati sono stati espressi come $p\zeta \pm DS$.

Essiccamento delle SLN

Al fine di garantirne una maggiore stabilità, i preparati in sospensione sono stati essiccati per liofilizzazione previa aggiunta del crioprotettore mannitolo (2,5 % (p/v)). Le sospensioni sono state pre-congelate a -80°C e quindi liofilizzate tramite Lio 5P freeze-drier (Cinquescal srl Milan, Italia). La liofilizzazione è stata condotta a -54°C sotto vuoto (0,909 bar) per un tempo sufficiente (8 h) ad ottenere SLN essiccate. In seguito

all'essiccamento si sono ottenuti i campioni **C BSA 0_L**, **C BSA 1_L**, **C BSA 5_L**, **L BSA 0_L**, **L BSA 1_L**, **L BSA 5_L**.

Determinazione del contenuto di BSA: Bradford test

Il Bradford test è una metodica spettroscopica impiegata nell'analisi quantitativa di proteine [Bradford, 1975]. È basata sulla formazione di un complesso tra il colorante blu di *Coomassie* con le proteine in soluzione, visibile da un cambiamento nel colore della soluzione da rosso o verde a blu dovuto allo spostamento del picco di assorbimento del *Coomassie* da 465 nm (rosso/verde) a 595 nm (blu). La quantità di colorante che si lega è direttamente proporzionale alla concentrazione della proteina in soluzione, di conseguenza anche l'intensità della colorazione blu che si produce è proporzionale ed indicativa della quantità di proteina. È risaputo che alcune sostanze di natura non proteica possono interferire con il test [Sigma Aldrich®. Bradford Reagent, technical bulletin]. Tra queste vi sono la maggior parte dei detergenti ionici e non ionici che alterano i cambiamenti di colorazione e possono causare precipitazione del reagente. In base a tali considerazioni, prima di procedere alla quantificazione proteica, è stata valutata una possibile interferenza associata ai componenti delle formulati.

Valutazione grado di interferenza

I campioni **C BSA 0** ed **L BSA 0**, privi di farmaco proteico, in seguito ad allontanamento delle particelle per centrifugazione, sono stati sottoposti a Bradford. In questi si è osservato un picco di assorbimento a 595 nm, indicando l'interferenza del tensioattivo con il reagente.

Al fine di validare il metodo per l'eliminazione dell'interferenza associata al tensioattivo non ionico Tween 80, il liofilizzato **C BSA 0_L** (20 mg) è stato uniformemente sospeso in H₂O milliQ (10 mL) ed un'aliquota della sospensione (1 mL) è stata centrifugata (3 cicli, 13000 rpm, 5 min). La fase acquosa (200 µL) è stata addizionata di acetato di etile (AcOEt) (500 µL) e ricentrifugata nelle stesse condizioni. Da studi preliminari è emerso che il solvente organico è capace di estrarre selettivamente il Tween 80 senza influenzare la concentrazione della proteina in soluzione acquosa. La fase acquosa estratta (100 µL) è stata sottoposta al Bradford test (Fig. 1).

Per eliminare l'interferenza associata al Tween 80 nelle SLN dei lotti **L BSA** è stata adottata la metodica precedente apportandovi alcune modifiche. Il campione **L BSA 0_L** (20 mg) è stato uniformemente sospeso in H₂O milliQ (5 mL) ed un'aliquota della sospensione (1 mL) è stata centrifugata (3 cicli, 13000 rpm, 5 min). La fase acquosa (200 µL) è stata addizionata di AcOEt (500 µL) e ricentrifugata nelle stesse condizioni. Per eliminare

l'interferenza associata anche al chitosano, la fase acquosa estratta del Tween 80 (100 μL) è stata addizionata di una soluzione acquosa a pH 11 (900 μL) e centrifugata (13000 rpm, 10 min) onde favorire l'allontanarsi del chitosano per precipitazione. La fase acquosa ottenuta (100 μL) è stata sottoposta al Bradford test ($\lambda = 595 \text{ nm}$) ([Fig. 1](#)).

Quantificazione BSA

In modo da portare in soluzione il Tween 80, il mannitolo e la BSA libera nelle formulazioni, un quantitativo esatto (20 mg) di SLN essiccate **C BSA 1_L** e **C BSA 5_L** è stato uniformemente sospeso in H₂O milliQ ottenendo una concentrazione teorica in proteina di 58 $\mu\text{g/mL}$ (**C BSA 1_L**) e 43 $\mu\text{g/mL}$ (**C BSA 5_L**). La sospensione (1 mL) è stata centrifugata (3 cicli, 13000 rpm, 5 min) e, la fase acquosa ottenuta (200 μL), addizionata di AcOEt (500 μL) è stata ricentrifugata nelle stesse condizioni. L'estratto acquoso (100 μL) è stato analizzato tramite Bradford test ($\lambda = 595 \text{ nm}$).

Per separare i componenti idrosolubili dalle SLN, la stessa procedura è stata adottata nei campioni con la BSA adsorbita. Un quantitativo esatto (150 mg) di **L BSA 1_L** e **L BSA 5_L** (40 mg) è stato uniformemente sospeso in H₂O milliQ ottenendo una concentrazione teorica in proteina di 402 $\mu\text{g/mL}$ (**L BSA 1_L**) e 475 $\mu\text{g/mL}$ (**L BSA 5_L**). La sospensione (1 mL) è stata centrifugata (3 cicli, 13000 rpm, 5 min) e, la fase acquosa (200 μL) addizionata di AcOEt (500 μL), ricentrifugata nelle stesse condizioni. La fase acquosa così estratta (100 μL) è stata addizionata di una soluzione acquosa a pH 11 (900 μL) e ricentrifugata (13000 rpm, 10 min). La soluzione estratta dal chitosano (100 μL) è stata sottoposta Bradford test ($\lambda = 595 \text{ nm}$).

Ciascun campione è stato analizzato in triplicato.

Determinazione del contenuto di BSA: test BCA

Il test BCA (*bicinchoninic acid assay*) è un altro comune metodo per la determinazione quantitativa di proteine. In tale contesto, è stato adottato onde confermare i risultati ottenuti con il test Bradford. È stato eseguito solo per le formulazioni **L BSA_L**, uniche selezionate per i successivi test *in vivo*. Poiché anche con il BCA si osserva interferenza da parte dei componenti, l'analisi è stata preceduta dall'eliminazione degli interferenti adottando la stessa metodica impiegata nel test di Bradford. Ciascuna determinazione è stata ripetuta in triplicato.

Permeazione in fluido nasale simulato

Per lo studio di permeazione del peptide contenuto nelle formulazioni nanoparticellari sono state impiegate celle di Franz modificate [Gavini *et al.*, 2011]. Al fine di simulare *in vitro* le condizioni presenti nella mucosa nasale, nelle celle è stata interposta una membrana in policarbonato (Nuclepore, 0,05 μm) in cui è stato fatto scorrere del fluido nasale simulato (FNS) (NaCl: 7,45 mg/mL; KCl: 1,29 mg/mL; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,32 mg/mL) [Zaki *et al.*, 2007]. I parametri impiegati sono stati: pH = 5,5 [England *et al.* 1999; Lee *et al.*, 2009]; T = 35 \pm 0,5°C [Lindemann *et al.*, 2002], flusso = 3 mL/min e volume totale FNS = 50 mL/cella.

Un quantitativo esattamente pesato di ciascuna formulazione (**C BSA 1_L**, **C BSA 5_L**, **L BSA 1_L** e **L BSA 5_L**) contenente 4,5 mg di BSA, ed una pari quantità di BSA non formulata, sono stati uniformemente dispersi al di sopra delle membrane. Ad intervalli di tempo prefissati (5, 15, 30, 45, 60 e 120 min) un'aliquota (300 μL) del campione in esame è stata prelevata dal mezzo accettore e successivamente ripristinata con FNS fresco, al fine di mantenere le condizioni *sink*. I permeati (200 μL) sono stati estratti del Tween 80 con AcOEt (500 μL). La fase acquosa estratta dopo centrifugazione (13000 rpm, 5 min) è stata quindi sottoposta al Bradford test ($\lambda=595$ nm) per la quantificazione della BSA permeata.

Le analisi ed il test sono stati effettuati in triplicato.

Animali

Topi femmina del genere Balb/c di 6-8 settimane (Harlan Interfauna Iberica S.L., Barcelona, Spain) sono stati suddivisi in maniera random in 3 gruppi da 10. Per tutto il periodo dello studio, gli animali sono stati mantenuti in condizioni ambientali standard (22°C, ciclo 12 h luce/ombra) ed è stato garantito loro libero accesso al cibo ed all'acqua.

Immunizzazione *in vivo*

In base alla discrepanza tra i risultati ottenuti dai due diversi metodi di quantificazione della proteina (test Bradford e BCA) e dato che queste differenze porterebbero ad incertezza nell'effettiva dose somministrata, le formulazioni testate *in vivo* sono state le **L BSA 0_L** e **L BSA 1_L**. Solo per queste ultime, infatti, è stato possibile determinare con precisione e riproducibilità il quantitativo in BSA.

Per gli esperimenti *in vivo*, gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi (n=10): *i*) controllo positivo: 60 μg /topo di **BSA** in PBS:Alum 1:1 (v/v) (Alhydrogel 2%, Invivogen); *ii*) **L BSA 1_L** in PBS (30 μL): 60 μg /topo di **BSA**; *iii*) controllo negativo: **L BSA 0_L** in PBS (30 μL).

Nel controllo positivo, la BSA è stata somministrata per via sottocutanea, mentre nei restanti gruppi per via nasale depositando le sospensioni nanoparticellari sulla mucosa di

entrambe le narici (1 volta al giorno per 3 giorni consecutivi). Tutte le somministrazioni sono state precedute da anestesia con isoflurano (Abbot Laboratories Ltd., USA).

Dal plesso mascellare del topo sono stati prelevati campioni di sangue pre-immunizzazione ($t=0$) e post-immunizzazione periodicamente sino alla XII settimana. Alla III settimana è stato effettuato un richiamo nel gruppo del controllo negativo ed in quello **L BSA 1_L**; alla VIII settimana è stato effettuato un richiamo in tutti i gruppi (Tab. 3). L'esperimento è stato realizzato con un protocollo messo a punto in precedenza dalla Prof.ssa Rosa Hernandez, sviluppato da ricerche sul ruolo delle nanoparticelle come veicoli per la somministrazione di vaccini [Puras *et al.*, 2011].

Valutazione del grado e tipo di risposta immunitaria

Il grado di risposta immunitaria prodotto è stato valutato confrontando i risultati ottenuti dal gruppo **L BSA 1_L** con quelli del gruppo di controllo positivo e negativo.

Per la ricerca degli anticorpi presenti nel siero animale, i campioni sono stati analizzati mediante il test ELISA. Questo è stato eseguito utilizzando placche a fondo piatto precedentemente trattate affinché gli anticorpi del siero reagiscano selettivamente con l'antigene assorbito sulla placca. Le condizioni impiegate nel *coating* sono state: incubazione per tutta la notte a 4°C con una soluzione di 1,5 mg/mL di BSA in PBS (100 µL/pozzetto). Il *blocking* è stato eseguito mediante: 200 µL/pozzetto di PBSTM (soluzione al 2% di siero di latte in PBS con Tween 20) seguito da lavaggi con PBST.

Prima dell'analisi i sieri sono stati sottoposti ad una serie di diluizioni scalari (da 1:100 a 1:700) con la soluzione di *blocking* e, 100 µL di questi, sono stati addizionati alla placche di analisi. È stato impiegato l'anticorpo secondario anti-topo IgG (anti IgG-Mouse, Sigma-Aldrich, Spagna) ed il coniugato antiperossidasi di capra con anti-topo IgG (1:1000).

Le analisi sono state effettuate a $\lambda=405$ nm.

Il tipo di risposta immunitaria è stato stimato sulla base del rapporto IgG2a/IgG1. Per la quantificazione è stato impiegato il test ELISA applicando la metodica precedentemente indicata ed utilizzando un coniugato antiperossidasi di capra con anti-topo IgG (1:4000).

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati usando l'analisi della varianza (ANOVA). Le differenze individuali tra i dati sono stati identificate mediante test post-hoc non-parametrici, Tukey's test. I valori sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS). Livelli di $p<0,05$ vengono considerati come statisticamente significativi.

Risultati

Preparazione delle SLN

Il metodo della doppia emulsione $a_1/o/a_2$ con evaporazione del solvente ha permesso di ottenere delle sospensioni di SLN. La tecnica impiegata ha consentito di lavorare in condizioni tali da evitare un danneggiamento della proteina durante la fase di caricamento; i parametri formulativi impostati non hanno contemplato l'uso di elevate temperature e stress meccanici. Nel complesso, la tecnica è risultata semplice, veloce e basata sull'uso di una matrice lipidica costituita da sostanze biocompatibili e atossiche per l'organismo.

La tecnica dell'omogeneizzazione a caldo è stata tra le prime metodiche impiegate per l'ottenimento di SLN [Siekman *et al.*, 1994] ed è tra le più adottate, in quanto di semplice applicazione, rapida e di basso costo. L'omogeneizzazione a caldo ha consentito di ottenere velocemente delle sospensioni di SLN rivestite con chitosano destinate al successivo adsorbimento della proteina.

Misura delle dimensioni e del potenziale zeta

Il processo di caricamento della BSA nei formulati **C BSA_s** ha mostrato influenzare il dm delle SLN in sospensione con un aumento in correlazione con quello della concentrazione di proteina impiegata. Il dm cresce gradualmente passando dal campione privo di farmaco a quello caricato (**C BSA 0_s** e **C BSA 1_s** vs **C BSA 5_s** $p < 0,05$), tuttavia il PI non ha mostrato nessun cambiamento rilevante ($p > 0,05$). D'altro canto, l'adsorbimento della BSA nei formulati **L BSA_s**, non ha portato a nessuna variazione significativa sulle caratteristiche dimensionali delle particelle ($p > 0,05$) (Fig. 2).

La liofilizzazione dei preparati ha portato ad un incremento significativo del dm solo nei preparati **C BSA** (**C BSA 0_s** vs **C BSA 0_L** $p < 0,05$; **C BSA 1_s** vs **C BSA 1_L** $p < 0,05$), mentre per la serie **L BSA** vi è significatività solo nell'aumento dei PI dei campioni bianchi (**L BSA 0_s** vs **L BSA 0_L** $p < 0,05$) (Fig. 3).

Gli essiccati della serie **C BSA** hanno mostrato caratteristiche dimensionali simili tra di loro sia in termini di PI che di dm ($p > 0,05$), mentre maggiore variabilità è stata osservata per gli essiccati della serie **L BSA**, ma solamente in termini di omogeneità dimensionale (**L BSA 1_L** e **L BSA 5_L** vs **L BSA 0_L** $p < 0,05$). È ipotizzabile che il mannitolo interferisca con la BSA adsorbita; è stato infatti riportato che a causa di una sua cristallizzazione, il mannitolo tenda a separarsi dalla frazione proteica, diminuendo la sua efficacia di crioprotettore [Costantino *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2010].

Infine, se paragonate tra loro le serie **C BSA_L** ed **L BSA_L** liofilizzate, hanno valori dimensionali più vicini rispetto alle corrispondenti in sospensione (Fig. 4).

La misurazione del potenziale zeta ($p\zeta$) ha permesso di avere una stima di tipo qualitativo sull'avvenuto caricamento o adsorbimento della BSA nelle SLN. Il caricamento non ha portato a nessuna variazione significativa del $p\zeta$ nella serie **C BSA_L** ($p > 0,05$) (Tab. 4), indicando che la BSA potrebbe essere stata incapsulata efficacemente. Nelle formulazioni **L BSA** (Tab. 4) l'elevato valore positivo di $p\zeta$ in **L BSA 0** ha confermato l'avvenuto rivestimento con chitosano. Lo spostamento del $p\zeta$ in **L BSA 0** verso valori meno positivi, nelle formulazioni **L BSA 1** ed **L BSA 5** ha indicato l'avvenuto adsorbimento proteico (**L BSA 0_s** vs **L BSA 5_s** $p < 0,05$) (Tab. 4). Grazie alla carica positiva associata a tali preparati, ciò favorirebbe il contatto, il tempo di permanenza e quindi l'*up-take* cellulare nella mucosa nasale, negativamente carica [Andrade *et al.*, 2011].

Determinazione del contenuto di BSA: test Bradford e BCA

Il contenuto in farmaco adsorbito o caricato è stato determinato indirettamente dopo aver calcolato la concentrazione della BSA libera in soluzione (FL) mediante il test Bradford o BCA. Il contenuto in farmaco è stato espresso in termini di efficacia di associazione (EA%):

$$EA\% = \frac{\text{Farmaco libero (FL)}}{\text{Farmaco totale}} \times 100$$

La metodica volta alla determinazione della presenza di interferenti nelle formulazioni, ne ha confermato l'esistenza con entrambi i test impiegati. Sono stati infatti ottenuti dei falsi positivi, che hanno indicato presenza di proteina nei *carrier* che, in realtà, ne erano privi (**C BSA 0_L**, **L BSA 0_L**).

I risultati hanno mostrato che la proteina non è stata efficacemente caricata nei campioni **C BSA**, in quanto la totalità o quasi è stata ritrovata come FL. Questi sistemi si sono dunque rivelati inadatti per l'incapsulamento della BSA.

Al contrario, i sistemi **L BSA** hanno mostrato di rispondere maggiormente ai requisiti per i quali sono stati sviluppati. Sia nel test Bradford che nel BCA nella formulazione **L BSA 1_L** la BSA è stata completamente adsorbita, mentre nella formulazione **L BSA 5_L** si sono ottenuti risultati contrastanti in quanto nel Bradford si è avuta una $EA\% = 28,18\%$ mentre nel BCA del $98,19\%$.

Permeazione in fluido nasale simulato

La permeazione della BSA non formulata è avvenuta dopo 15 min dall'inizio del test e si è mantenuta costante dai 30 ai 120 min, raggiungendo un valore massimo di circa il 55% (**BSA 0_{min}** vs **BSA 15-120_{min}** $p < 0,05$; **BSA 15_{min}** vs **BSA 30-120_{min}** $p < 0,05$). Nelle formulazioni della serie **C BSA_L** non si è avuto nessun passaggio della proteina, nonostante

questa si presentasse per la totalità in forma libera (non incapsulata) come indicato dai test per la quantificazione proteica nelle formulazioni. Anche per i preparati **L BSA 5_L** non si è osservata permeazione ($p > 0,05$). Solo nel caso di **L BSA 1_L**, la proteina è passata attraverso le membrane (L BSA 1 120_{min} vs L BSA 1 5-60_{min} $p < 0,05$), con, tuttavia, un valore massimo di circa 8%. La scarsa o nulla permeazione della BSA presente nelle formulazioni potrebbe essere dovuta ad un intasamento ed ostruzione dei pori (50 nm) della membrana di permeazione da parte delle SLN, influenzando così negativamente sul saggio ([Fig. 5](#)).

Studi *in vivo*: valutazione grado e tipo di risposta immunitaria

Le SLN (**L BSA 1_L**) somministrate per via nasale hanno prodotto una risposta anticorpale già alla I settimana dalla somministrazione e si è protratta, con un andamento altalenante, sino alla XII settimana. Il grado di risposta prodotto sia alla I che alla X e XII settimana è stato di entità simile a quello ottenuto con l'impiego dell'adiuvante Alum ($p > 0,05$) ([Fig. 6](#)).

La risposta generata alla I settimana indicherebbe, *in vivo*, un rapido rilascio dell'antigene dalle SLN. Nel complesso le nanoparticelle lipidiche hanno dimostrato di produrre un aumento graduale della risposta anticorpale. La loro potenza non è stata però superiore a quella ottenuta quando la BSA non formulata è stata somministrata con il co-adiuvante Alum, il quale ultimo è comunemente utilizzato nei vaccini per aumentare la potenza e la durata della risposta immunitaria [[Kanchan et al., 2009](#)]. Vi è tuttavia da sottolineare, che negli animali trattati con Alum complessato con la BSA, la risposta osservata è stata più alta della norma se confrontata con quella data in altri esperimenti precedentemente effettuati e basati sullo stesso protocollo.

Alla V settimana è stato valutato il tipo di risposta immunitaria prodotto mediante valutazione del rapporto IgG2a/IgG1. $IgG2a/IgG1 > 1$ è indicativo di una risposta Th1 mediata (cellulo-mediata), mentre $IgG2a/IgG1 < 1$ di una risposta Th2 mediata (umorale). I risultati hanno mostrato che sia le SLN che la BSA non formulata e co-somministrata con l'Alum hanno portato alla produzione di IgG1 e quindi ad una risposta umorale Th2 mediata ([Fig. 7](#)).

Dal test è emerso che i *carrier* privi dell'antigene (**L BSA 0**) non hanno scatenato alcuna risposta immunitaria, indicando come essi siano di per sé innocui ([Tab. 5](#)).

Discussione

La vaccinazione nasale rappresenta un'interessante alternativa rispetto ai comuni metodi di vaccinazione in quanto la mucosa nasale ha un elevato grado di assorbimento, ridotta attività enzimatica nonché presenza di cellule immuno-competenti [Davis, 2001;Csaba *et al.*, 2009]. La somministrazione nasale è per di più una via di facile accesso, indolore ed utile per il raggiungimento del SNC in quanto permette di bypassare la BEE.

Un vaccino deve essere sviluppato in modo che sia capace di scatenare un'appropriata risposta immunitaria ed al contempo essere sicuro, stabile e riproducibile. Ulteriori fattori da prendere in considerazione sono il costo, il tipo e la frequenza di somministrazione [Perrie *et al.*, 2008]. Gli antigeni di natura proteica o peptidica vengono impiegati nella vaccinazione in sostituzione di microrganismi inattivati. Sono più facili da manipolare e più sicuri, ma hanno lo svantaggio di essere suscettibili a degradazione enzimatica e di avere scarsa capacità di penetrazione cellulare, il che ne riduce la biodisponibilità e l'azione. Le nanoparticelle possono così fungere da *carrier* per gli antigeni peptidici, ed oltre a garantire la protezione della molecola, in virtù delle loro caratteristiche particellari possono venire captati dalle cellule presentanti l'antigene, contribuendo alla risposta immunitaria [Salvador *et al.*, 2011]. Nel presente lavoro sono state ottenute con successo SLN capaci di veicolare un antigene peptidico modello (BSA), adsorbito sulla superficie particellare. Il metodo impiegato è stato semplice, rapido e di basso costo ed eseguito in condizioni tali da evitare stress chimici, meccanici e termici che possono distruggere la molecola peptidica.

L'immunizzazione per via nasale è stata condotta con successo nell'ambito di sistemi particellari veicolanti antigeni [Carcaboso *et al.*, 2004]. In via teorica, i formulati nanoparticellari **L BSA 1_L** (dm \approx 488 nm), in base alle loro dimensioni, dovrebbero scatenare una risposta immunitaria del tipo cellulo-mediata (Th1). Kanchan *et al.* (2008) riportano infatti che nanoparticelle con un dm compreso tra 200-600 nm hanno maggiore probabilità di scatenare una risposta di questo tipo. Tuttavia, a discapito di questa osservazione, dalla presente indagine ne è derivata una prevalente risposta del tipo umorale (Th2).

La vaccinazione viene comunemente utilizzata nella prevenzione dall'attacco da parte di microrganismi patogeni. Tuttavia l'immunizzazione può avere un'utilità per il trattamento di diverse categorie patologiche come quelle neurodegenerative. Nello specifico, nei meccanismi patogenetici dell'Alzheimer (AD) è coinvolto il peptide β -amiloide (A β) che porta alla formazione di aggregati responsabili di morte neuronale in sedi localizzate del cervello. L'immunoterapia contro A β si è mostrata un valido approccio terapeutico per l'AD poiché abile nel prevenire o ridurre la formazione delle placche amiloidee [Schenk *et al.*, 1999], e l'immunizzazione (sia attiva che passiva) ha raggiunto fasi di sperimentazione a

livello clinico [Tabira, 2010; Garcon and Van Mechelen, 2011]. Nel presente lavoro è stato possibile ottenere una risposta immunitaria in seguito ad un'immunizzazione attiva (vaccinazione); per somministrazione nasale di *carrier* veicolanti la BSA (**L BSA 1_L**) è stata raggiunta una risposta anticorpale già alla prima settimana dall'immunizzazione. Andrebbe tuttavia valutato il grado di risposta nel tessuto cerebrale, in modo da confermare un'azione mirata dei sistemi. Va comunque sottolineato che la produzione di anticorpi a livello ematico non è un fattore limitante per l'immunizzazione di patologie a sede centrale, poiché gli anticorpi diretti contro uno specifico antigene, possono essere in grado di passare attraverso la BEE [Morgan, 2011], raggiungendo così i loro siti di azione. Inoltre si sottolinea che l'ottenimento di una risposta del tipo Th2 è un fattore rilevante nel AD, in quanto una risposta Th1 è indesiderata poiché, da sperimentazioni cliniche, è emerso essere promotrice di encefaliti meningee ed infiammazioni neuronali [Ferrer *et al.*, 2004].

Conclusioni

I metodi preparativi impiegati hanno permesso l'ottenimento di SLN. Tuttavia, gli studi di caratterizzazione *in vitro* hanno mostrato che i sistemi sviluppati per il caricamento dell'antigene modello BSA non si sono rivelati adatti ad una incapsulazione della proteina. Al contrario, le SLN rivestite con chitosano si sono mostrate in grado di adsorbire e veicolare la proteina. Dagli studi di immunizzazione *in vivo* è emerso che le SLN con BSA adsorbita, hanno favorito una risposta immunologica simile a quella di un comune adiuvante usato nei vaccini, l'Alum, già alla prima settimana dall'immunizzazione, ma il preparato non è stato più potente del coadiuvante nel prolungare ed aumentare la risposta immunitaria. La risposta prodotta è stata del tipo umorale.

In conclusione, la metodica preparativa e/o i materiali impiegati per l'allestimento delle SLN andrebbero modificati in modo da ottenere un efficiente caricamento della BSA. I *carrier* caratterizzati da BSA efficientemente adsorbita necessitano, tuttavia, di studi ulteriori onde stimarne la capacità di raggiungere le sedi centrali, in seguito alla somministrazione nasale, e proporre così un loro utilizzo per il *targeting* sito specifico di neuro-vaccini.

Bibliografia

Andrade F, Antunes F, Nascimento AV, da Silva SB, das Neves J, Ferreira D, Sarmiento B. Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. *Curr Drug Discov Technol.* 2011;8(3):157-72.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Carcaboso AM, Hernández RM, Igartua M, Rosas JE, Patarroyo ME, Pedraz JL. Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles. *Vaccine.* 2004;22:(11-12):1423-32.

Costantino HR, Firouzabadian L, Wu C, Carrasquillo KG, Griebenow K, Zale SE, Tracy MA. Protein spray freeze drying. 2. Effect of formulation variables on particle size and stability. *J Pharm Sci.* 2002;91(2):388-95.

Csaba N, Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Nanoparticles for nasal vaccination. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61(2):140-57.

Dalpiaz A, Gavini E, Colombo G, Russo P, Bortolotti F, Ferraro L, Tanganelli S, Scatturin A, Menegatti E, Giunchedi P. Brain uptake of an antiischemic agent by nasal administration of microparticles. *J Pharm Sci.* 2008;97(11):4889-903.

Davis SS. Nasal vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;51(1-3):21-42.

England RJ, Homer JJ, Knight LC, Ell SR. Nasal pH measurement: a reliable and repeatable parameter. *Clin Otolaryngol.* 1999;24:67-68.

Fazil M, Md S, Haque S, Kumar M, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(1):6-15.

Ferrer I, Boada Rovira M, Sanchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussa F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2004;14:11-20.

Fu HJ, Liu B, Frost JL, Lemere CA. Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2010;9(2):197-206.

Garçon N, Van Mechelen M. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing adjuvant systems. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10:471-86.

Gavini E, Rassa G, Ferraro L, Beggiato S, Alhalaweh A, Velaga S, Marchetti N, Bandiera P, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of polymeric microcarriers on the in vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;83(2):174-83.

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

Gavini E, Spada G, Rassa G, Cerri G, Brundu A, Cossu M, Sorrenti M, Giunchedi P. Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl- β -cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63:472-82.

Kanchan V, Panda AK. Interactions of antigen-loaded polylactiden particles with macrophages and their correlation with the immune response. *Biomaterials*. 2007;28(35):5344-57.

Kanchan V, Katare YK, Panda AK. Role of alum in improving the immunogenicity of biodegradable polymer particle entrapped antigens. *Eur J Pharm Sci*. 2009;38(1):18-28.

Landesman-Milo D, Peer D. Altering the immune response with lipid-based nanoparticles. *J Control Release*. 2012;161(2):600-8.

Lee HJ, Choi JC, Yoon JH, Joe NS, Kim CH, Kim JY. The Study of pH in Nasal Secretion in Normal and Chronic Rhinosinusitis. *J Rhinol*. 2009;16(2):105-9.

Lindemann J, Leiacker R, Rettinger G, Keck T. Nasal mucosal temperature during respiration. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 2002;27(3):135-9.

Mestre H, Ibarra A. Immunization with Neural-Derived Peptides as a Potential Therapy in Neurodegenerative Diseases. INTECH Open Access Publisher, 2011. Consultabile al: (<http://www.intechopen.com/books/neurodegenerative-diseases-processes-prevention-protection-and-monitoring/immunization-with-neural-derived-peptides-as-a-potential-therapy-in-neurodegenerative-diseases>).

Morgan D. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med*. 2011;269:54-63.

Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm*. 2008;364(2):272-80.

Puras G, Salvador A, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. Encapsulation of A β 1–15 in PLGA Microparticles Enhances Serum Antibody Response in Mice Immunized by Subcutaneous and Intranasal Routes. *Eur J Pharm Sci*. 2011;44(3):200-6.

Salvador A1, Igartua M, Hernández RM, Pedraz JL. An Overview on the Field of Micro- and Nanotechnologies for Synthetic Peptide-Based Vaccines. *J Drug Deliv*. 2011;2011:181646. Consultabile al: (<http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/181646/>).

Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999;400:173-77.

Sharma A, Pasha JM, Deep S. Effect of the sugar and polyol additives on the aggregation kinetics of BSA in the presence of N-cetyl-N,N,N-trimethyl ammonium bromide. *J Colloid Interface Sci.* 2010;350(1):240-8.

Siekmann B, Westesen K. Melt-homogenized solid lipid nanoparticles stabilized by the nonionic surfactant tyloxapol. I. Preparation and particle size determination. *Pharm Pharmacol.* 1994; Lett. 3:194-7.

Sigma Aldrich®. Bradford Reagent, technical bulletin. Consultabile al: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/b6916bul.pdf>.

Tabira T. Immunization therapy for Alzheimer disease: a comprehensive review of active immunization strategies. *Tohoku J Exp Med.* 2010;220:95-106.

Zaki NM, Awad GA, Mortada ND, Abd ElHady SS. Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with modulated rheological and mucociliary transport properties. *Eur J Pharm Sci.* 2007;32(4-5):296-307.

Tabelle**Tabella 1.** Composizione quali-quantitativa SLN per caricamento BSA.

fase o	C BSA 0s	C BSA 1s	CBSA5s
Plurol St. (g)	0,5	0,5	0,5
Plurol Ol. (g)	0,1	0,1	0,1
CH ₂ Cl ₂ (mL)	5	5	17,5
<u>fase a1</u>			
H ₂ O (mL)	2	2	7
BSA (mg)	0	50	250
<u>fase a2</u>			
H ₂ O (mL)	48	48	43
Tween 80 (g)	0,24	0,24	0,22

Plurol St.: Plurol Stearique; Plurol Ol.: Plurol Oleique

Tabella 2. Composizione quali-quantitativa SLN per adsorbimento BSA.

fase o	L BSA 0s	L BSA 1s	L BSA 5s
Plurol St. (g)	0,5	0,5	0,5
Plurol Ol.(g)	0,1	0,1	0,1
<u>fase a rivestimento</u>			
H ₂ O (mL)	50	50	50
Tween 80 (g)	0,5	0,5	0,5
<u>fase a adsorbimento</u>			
chitosano glut. (g)	0,25	0,25	0,25
H ₂ O (mL)	50	50	50
BSA (mg)	0	50	250

Plurol St.: Plurol Stearique; Plurol Ol.: Plurol Oleique

Tabella 3. Schema riassuntivo su tempi e numero di somministrazioni *in vivo*.

Settimana	I ^a	III ^a	V ^a	VIII ^a	XII ^a
Controllo positivo (s.c.)	X	X		X	
L BSA 1L (i.n.)	X X X			X	
Controllo negativo (i.n.)	X X X			X	

x= n°1 somministrazione, s.c.= somministrazione sotto cute; i.n.= somministrazione intranasale.

Tabella 4. Potenziale zeta formulazioni.

Lotti	potenziale zeta (±mV)	±DS
C BSA 0s	-35	6,79
C BSA 1s	-37,7	5,08
C BSA 5s	-39,2	6,36
L BSA 0s	+47,2	3,88
L BSA 1s	+31,2	10,1
L BSA 5s	+21,8	7,16

[Tabella 5.](#) Valutazione del tipo di risposta immunitaria prodotta in termini di produzione IgG2a ed IgG1.

responder	IgG2a	IgG1
ALUM	08/10	10/10
L BSA 0	nessuno	nessuno
L BSA 5	05/10	10/10

Figure

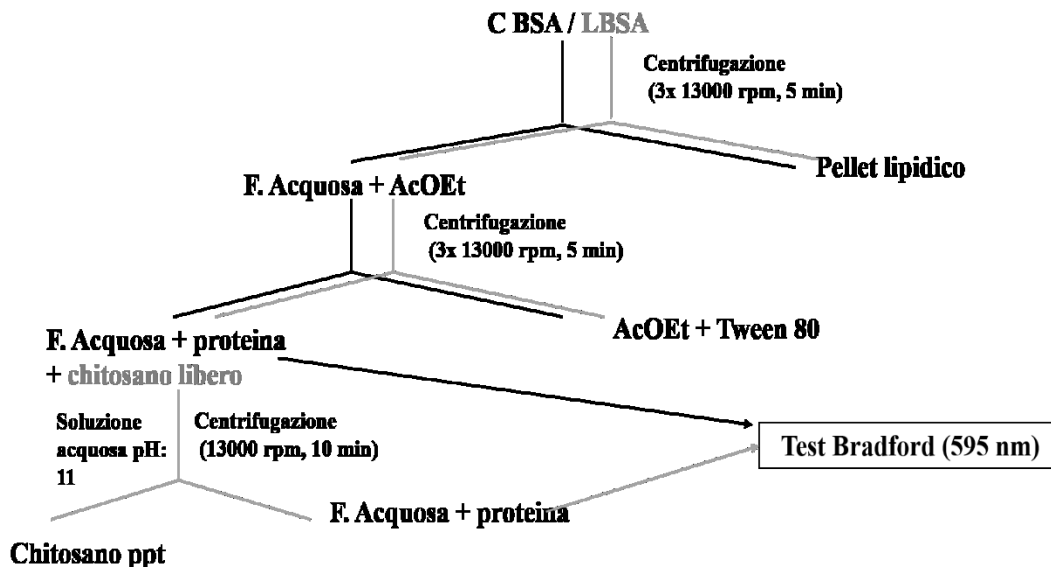


Figura 1. Schema estrazione interferenti per test Bradford e BCA. Linee nere. Procedura per la serie C BSA. Linee grigie: procedura per la serie L BSA. F.acquosa: fase acquosa; AcOEt: acetato di etile.

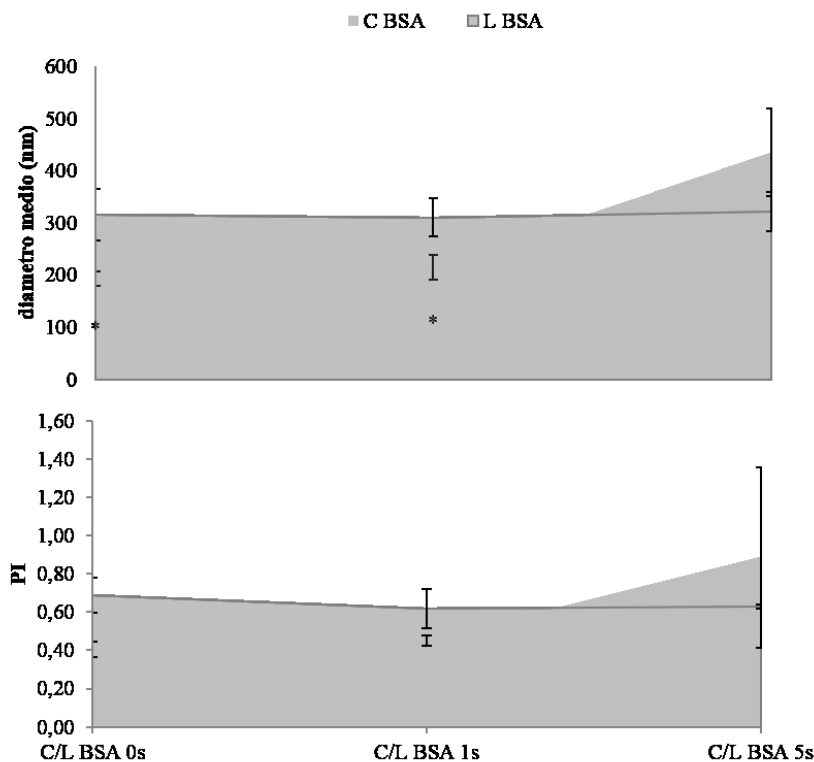


Figura 2. Diametro medio (dm) \pm DS (sopra) ed indice di polidispersione (PI) \pm DS (sotto) delle particelle in sospensione nei lotti C BSA_s e L BSA_s. (n=3, * p<0,05 vs C BSA 5s)

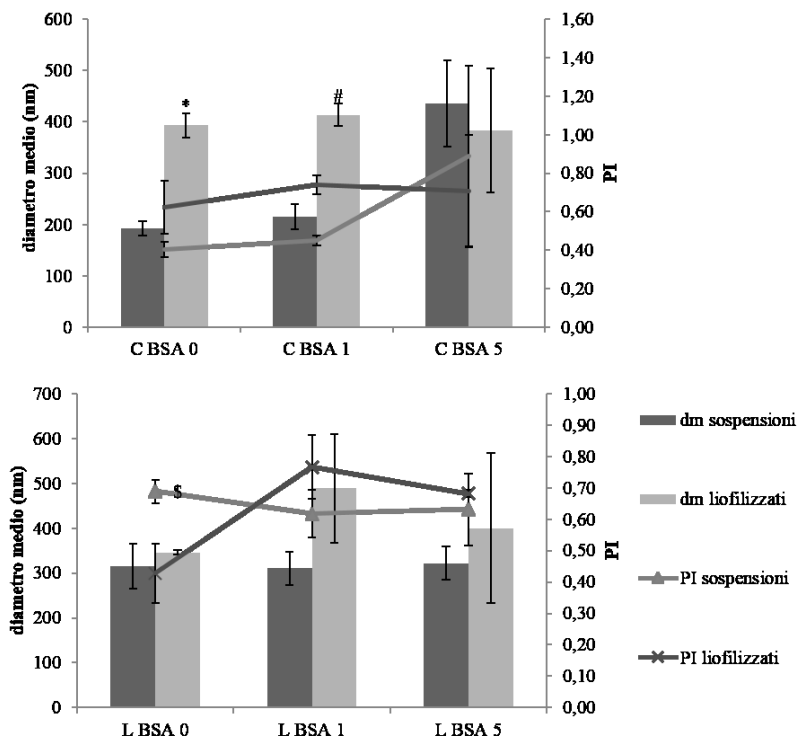


Figura 3. Confronto del diametro medio ($dm \pm DS$) (barre) e l'indice di polidispersione ($PI \pm DS$) (linee) tra le particelle in sospensione ed i corrispondenti liofilizzati. *In alto:* Formulazioni **C BSA**. (Per barre. $n=3$, * $p < 0,05$ vs C BSA 0_s; # $p < 0,05$ vs C BSA 1_s). *In basso:* Formulazioni **L BSA**. (Per linee. $n=3$, \$ $p < 0,05$ vs L BSA 0_s).

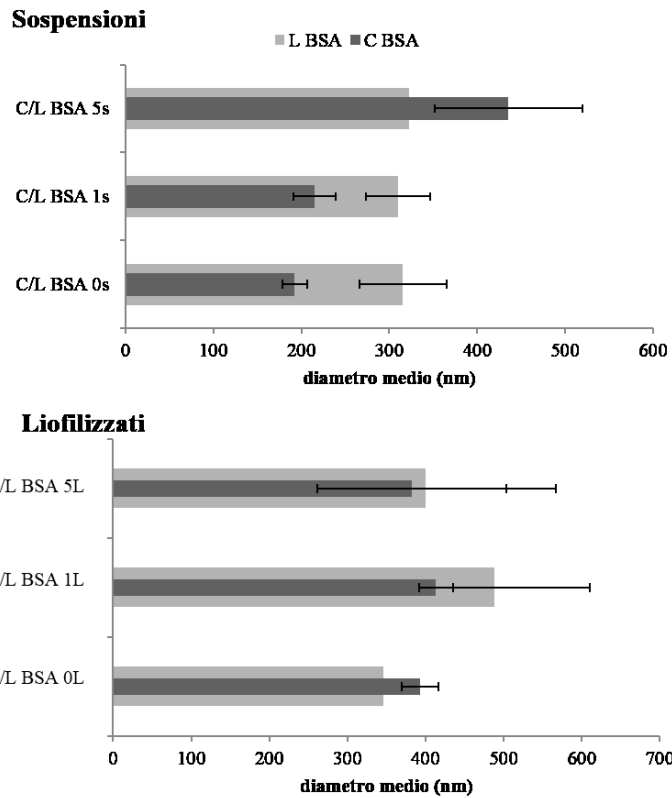


Figura 4. Confronto del diametro medio ($dm \pm DS$) tra la serie C BSA ed L BSA in sospensione o liofilizzate. *In alto.* Confronto tra le sospensioni. *In basso.* Confronto tra gli essiccati.

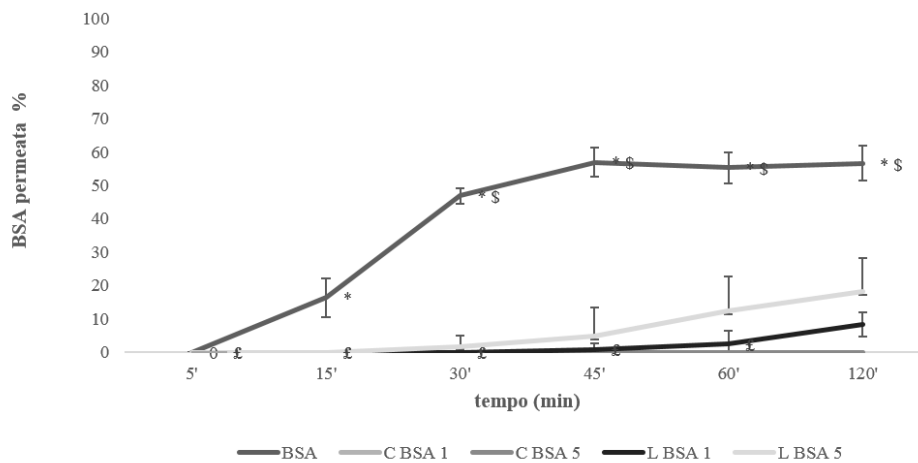


Figura 5. Studio di permeazione *in vitro* delle formulazioni e della proteina in fluido nasale simulato. ($n=3$, * $p < 0,05$ vs BSA (0_{min}); § $p < 0,05$ vs BSA (15_{min}); £ $p < 0,05$ vs L BSA 1 (120_{min})).

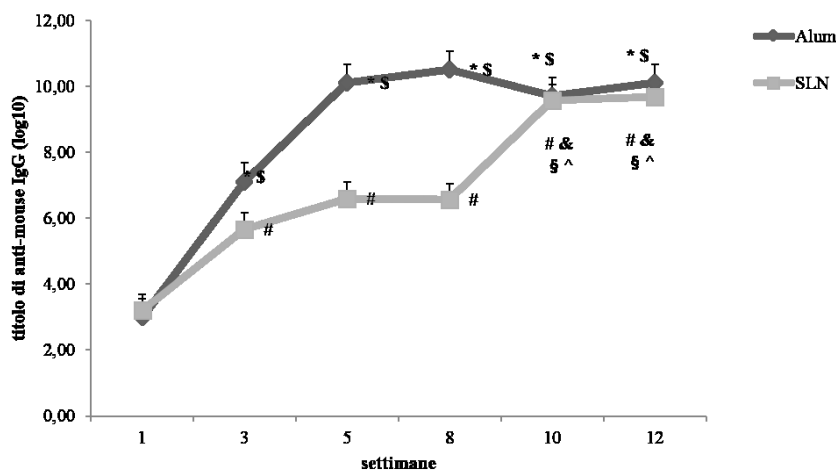


Figura 6. Titolo IgG anti-topo. Grado di risposta anticorpale prodotta dall’Alum e dalle SLN della formulazione **L BSA 1_L**, somministrata per via nasale. (n=10, * p<0,05 vs Alum (I sett)); \$ p<0,05 vs Alum (III sett); # p<0,05 vs SLN (I sett); & p<0,05 vs SLN (III sett); § p<0,05 vs Alum (V sett); ^ p<0,05 vs Alum (VIII sett).

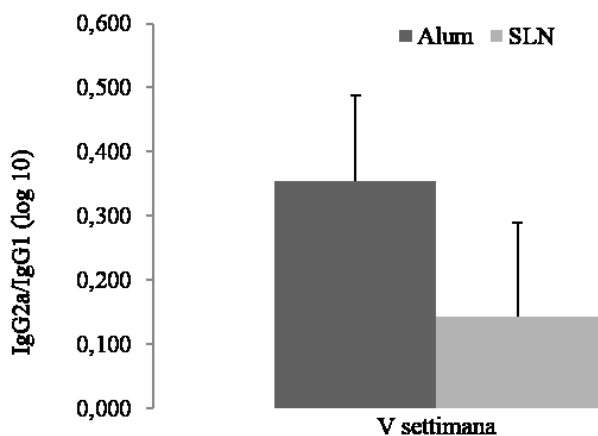


Figura 7. Rapporto IgG2a/IgG1 alla V settimana dalla somministrazione. Confronto tra le SLN **L BSA 1_L** rispetto al gruppo di controllo positivo (Alum + BSA).

Capitolo II

Somministrazione Nasale di Microsfere Veicolanti Idrossipropil- β -Ciclodestrina in Modelli Animali di Neurotossicità Indotta da β -Amiloide (1-42): Effetto Neuro-Protettivo

Questo è un lavoro svolto nell'ambito del progetto Ulisse promosso dall'Università di Sassari

Il lavoro sperimentale è stato eseguito presso il Dipartimento di Chimica e Farmacia dell'Università di Sassari ed il Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Ege University, Izmir, (Turchia) sotto la guida della Prof.ssa Aifer Yalçın

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Abstract

Sia studi *in vitro* che *in vivo* hanno confermato le ciclodestrine come agenti neuro-protettivi. L'indagine svolta ha avuto come scopo quello di testare l'effetto neuro-protettivo di microsfere di idrossipropil- β -ciclodestrina (HP- β -CD), rivestite con chitosano (HP- β -CD/chitosano) o alginato (HP- β -CD/alginato) sia su sinaptosomi cerebrali trattati con A β (1-42) che per somministrazione nasale in modelli animali di neurotossicit  indotta da A β (1-42). Negli esperimenti sinaptosomiali sono stati ricercati parametri quali cambiamenti nei livelli di perossidazione lipidica, produzione di specie radicaliche all'ossigeno (ROS) e funzione mitocondriale. Nei modelli animali, invece, sono stati studiati i cambiamenti nell'espressione del mRNA di Bcl-2 e Apex1 e sulla frammentazione del DNA a livello ippocampale. Negli studi *in vivo*, gli animali sono stati divisi nel gruppo di: controllo; A β (1-42); A β (1-42) + HP- β -CD/chitosano ed A β (1-42) + HP- β -CD/alginato. Per sette giorni, le microsfere (2 mg/giorno) sono state somministrate in una sola narice alternata nei giorni. Negli studi *in vitro*, i sinaptosomi cerebrali impiegati sono stati ottenuti dal gruppo animale di controllo (salina) e da quello trattato con solo A β (1-42). Questi ultimi sono stati incubati con un quantitativo di microsfere HP- β -CD/chitosano e HP- β -CD/alginato contenente 1 o 5 mg di HP- β -CD e con uguali quantit  di sola HP- β -CD.

In vitro, le microsfere e la HP- β -CD hanno ridotto i livelli di perossidazione lipidica, produzione di ROS e hanno assicurato l'integrit  mitocondriale dei sinaptosomi. *In vivo*, A β (1-42) ha indotto una significativa frammentazione del DNA e dei livelli di espressione del mRNA di Bax con un decremento in quelli di Apex1 e di Bcl-2, mentre le microsfere hanno ridotto significativamente la frammentazione del DNA ed aumentato il rapporto tra mRNA di Bcl-2/Bax.

In conclusione, entrambi i tipi di microsfere si sono mostrate protettive sia *in vitro* che *in vivo* grazie ad una riduzione dei parametri apoptotici e di stress ossidativo nell'ippocampo di ratto. Le microsfere di HP- β -CD/chitosano sono risultate essere pi  efficaci di quelle con alginato.

Introduzione

L'accumulo cerebrale delle placche di beta amiloide (A β) è uno degli eventi chiave nello sviluppo e progressione del morbo di Alzheimer (AD). Ad elevate concentrazioni e come risposta a vari stimoli, il peptide A β subisce complessi riarrangiamenti conformazionali per dar vita a intermedi con tendenza alla formazione di oligomeri e fibrille. L'incorporazione di A β nella membrana cellulare e la conseguente morte della cellula viene promossa da un elevato contenuto di colesterolo di membrana [Abramov *et al.*, 2011].

È stato suggerito che lo stress ossidativo, la neuro-infiammazione, la disfunzione mitocondriale e l'apoptosi siano coinvolti nella patogenesi dell'Alzheimer [Mattson 2000;2004;Block, 2005;Forlenza *et al.*, 2010]. In questa, lo stress ossidativo osservato è dovuto ad elevati livelli di proteine ossidate, avanzata glicazione e perossidazione lipidica di prodotti finali, formazione di specie tossiche e cambiamenti ossidativi nel DNA nucleare e mitocondriale [Gella and Durany, 2009].

Apex1 è un enzima essenziale nel processo di riparazione del DNA per escissione di basi, con un danno all'acido nucleico causato da meccanismi ossidativi o di alchilazione. È anche un agente riduttivo per il mantenimento dei fattori di trascrizione nel loro stato ridotto e stimola il legame di questi con il DNA [Fishel and Kelley, 2007].

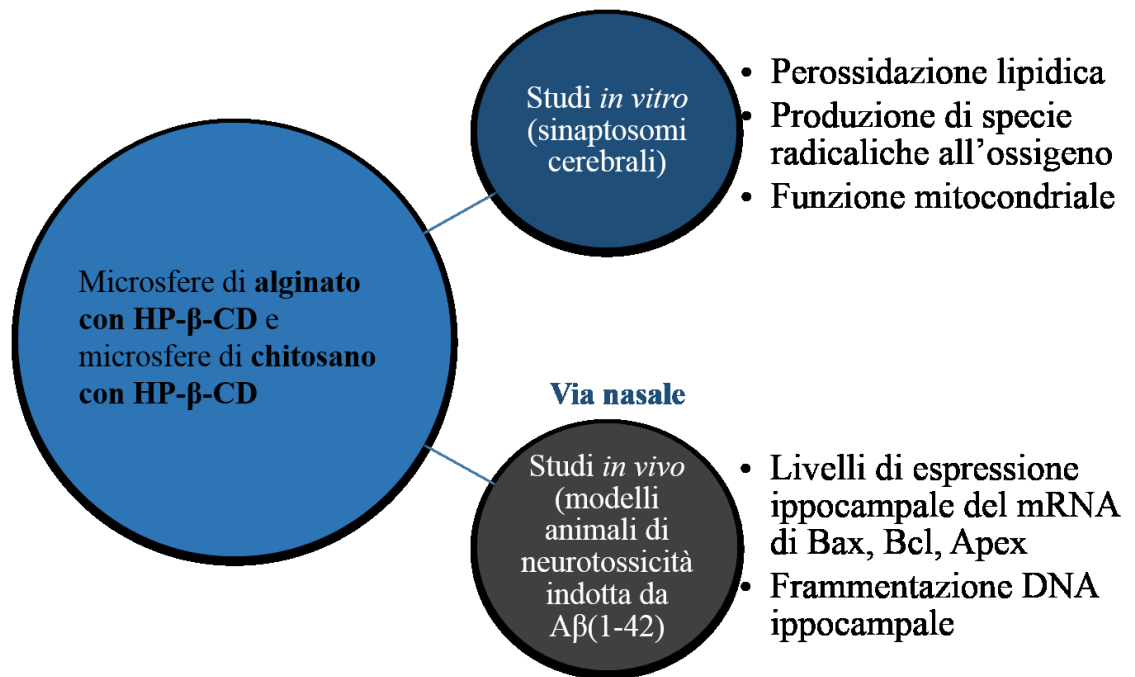
I mitocondri sono tra i principali protagonisti nella regolazione dei processi ossidativi ed apoptotici. Il rilascio di proteine intermembrana mitocondriali (citocromo *c*, fattore di induzione apoptotica) attiva la cascata apoptotica. Tra le proteine proapoptotiche vi è Bax e tra quelle antiapoptotiche Bcl-2, entrambe regolanti i segnali apoptotici provenienti dai mitocondri [Mattson, 2000;Vogelstein *et al.*, 2000;Donovan and Cotter, 2004].

In campo farmaceutico è stato indagato e dimostrato il ruolo delle ciclodestrine (CD) nella neuroprotezione. Queste hanno infatti la capacità di estrarre e rimuovere il colesterolo dalle membrane cellulari [Irie and Uekama, 1997;Zidovetzki and Levitan, 2007;Ziolkowski *et al.*, 2010;López *et al.*, 2011] la cui presenza è coinvolta nell'aggregazione del peptide A β nel cervello. È stata inoltre osservata l'azione neuro-protettiva di varie CD in seguito a condizioni anossiche [Rufini *et al.*, 2009] ed eccitotossiche indotte da NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e glutammato [Abulrob *et al.*, 2005]. In aggiunta, sono stati ben caratterizzati i potenziali effetti biologici dell'idrossipropil- β -ciclodestrina (HP- β -CD) [Gould and Scott, 2005]. Di recente, in modelli animali di ischemia ipossica è stata comprovata l'azione di neuroprotezione della HP- β -CD [Rivers *et al.*, 2012], mentre nel morbo di AD, è stata investigata l'abilità di differenti CD, somministrate per via parenterale, di formare complessi con il peptide A β [Camilleri *et al.*, 1994;Qin *et al.*, 2002].

La via nasale è una somministrazione alternativa per farmaci destinati al *targeting* cerebrale. Consente di evitare l'uso di aghi, di aggirare la barriera emato-encefalica (BEE) ed ottenere una riduzione dei livelli ematici di farmaco ed un suo accumulo nel cervello con minore probabilità di effetti collaterali periferici [Dalpiaz *et al.*, 2008; Alam *et al.*, 2010; Luppi *et al.*, 2010; Gavini *et al.*, 2011; 2013; Lochhead and Thorne, 2012].

Sulla base delle precedenti considerazioni sono state sviluppate microsfele per la somministrazione nasale di HP- β -CD come approccio neuro-protettivo in condizioni di neurotossicità/neurodegenerazione indotta da A β . Esperimenti precedentemente condotti nei nostri laboratori hanno mostrato come la HP- β -CD favorisca la sopravvivenza cellulare nei confronti di A β ; la co-incubazione di A β (25-35) con soluzioni di HP- β -CD ha ridotto la morte cellulare rispetto al trattamento con il solo peptide [Gavini *et al.*, 2009]. Per questa ragione HP- β -CD è stata incapsulata in microsfele di polimeri mucoadesivi come il chitosano e l'alginato. La caratterizzazione *in vitro* ha mostrato che alcune delle formulazioni prodotte presentavano proprietà idonee per una somministrazione nasale quali piccole dimensioni (2-4 μ m), buon *swelling* e mucoadesione. Nelle microsfele con alginato si è osservata la presenza di invaginazioni superficiali, mentre la morfologia di quelle con chitosano era più regolare. Le numerose invaginazioni conferiscono una maggiore area superficiale e migliori proprietà aerodinamiche rispetto a particelle sferiche [Gavini *et al.*, 2009]. Nel contesto della somministrazione nasale, i polimeri alginato e chitosano sono stati scelti per ridurre la *clearance* mucociliare delle formulazioni, aumentare il tempo di permanenza del farmaco nel sito [Gavini *et al.*, 2005] e favorirne così il trasporto al SNC. Inoltre, il chitosano è un *penetration enhancer*. La HP- β -CD è stata scelta per la sua bassa tossicità [Gould and Scott, 2005; Loftsson *et al.*, 2005; 2007; Valentino and Quanren, 2008] rispetto ad altre CD.

Da qui l'interesse del lavoro nel testare la probabile protezione promossa dalla somministrazione nasale di microsfele di HP- β -CD, in modelli animali con neurotossicità indotta da A β (1-42), attraverso l'analisi dei livelli di stress ossidativo e dei parametri apoptotici *in vivo*, misurando nell'ippocampo di ratto i livelli di perossidazione lipidica, produzione di ROS, funzione mitocondriale, frammentazione del DNA, espressione di mRNA del Bax, Bcl-2 e Apex1.



Schema illustrante le principali fasi del lavoro.

Metodi

Materiali

L'idrossipropil- β -ciclodestrina (HP- β -CD), Cavasol® W7 HP Pharma (PM: 1400 g mol⁻¹; sostituzione molecolare: 0,65), è stata acquistata da Wacker-Chemie GmbH (Germania). Il chitosano cloridrato (C), Protasan UP CL 113, (PM: 160000 g mol⁻¹; viscosità apparente: 16 mPas; deacetilazione: 86 %) ed il sodio alginato (A), Protanal LF 120 L, (PM: 250 000-300 000 g mol⁻¹; Viscosity: 150-300 mPas) sono stati acquistati da FMC BioPolymer AS (Norvegia).

Preparazione delle polveri nasali per *spray drying*

Le formulazioni utilizzate sono state preparate per *spray drying* utilizzando la metodica già descritta in precedenza [Gavini *et al.*, 2009]. In breve, il polimero (alginato o chitosano) è stato solubilizzato in acqua ultrapura; successivamente è stata addizionata e solubilizzata la HP- β -CD. Il rapporto in peso tra polimero e ciclodestrina è stato di 1:2. La soluzione di alimentazione (1 % p/v) è stata spruzzata nell'ugello (diametro 0,7 mm) dello *spray-dryer* (Büchi Mini Spray Dryer B-191, Büchi Labortechnik AG, Svizzera), quindi le particelle essiccate sono state raccolte in un ciclone ad elevate prestazioni.

Le microsfele ottenute caricate con HP- β -CD e rivestite da chitosano ed alginato sono state rispettivamente **HP- β -CD/chitosano** e **HP- β -CD/alginato**.

Animali e chirurgia

Ratti Sprague-Dawley (200-250 g), ottenuti dal *Experimental Research Center* dell'Università di Ege, sono stati mantenuti a cicli di luce/ombra di 12 h garantendo loro libero accesso a cibo ed acqua. Tutte le procedure sono state approvate dal *Utilization Committee* dell'Università di Ege e confermate dal *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Sono stati fatti tutti gli sforzi per ridurre al minimo il numero di animali da impiegare e la loro sofferenza (Progetto n°: 12/ECZ/037).

A β (1-42) (California Peptide, USA) è stato solubilizzato in acqua bidistillata (5 μ g/ μ L) e, previo utilizzo, mantenuto a 24°C per 3 giorni. I ratti sono stati anestetizzati mediante somministrazione intraperitoneale di ketamina idrocloruro (1,5 mg/kg; Alfamine, Alfasan International B.V., Olanda) e xylazina cloridrato (0,2 mL/kg; Alfazyne, Alfasan International B.V., Olanda), quindi trasferiti in un apparato stereotassico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Infine, agli animali è stato iniettato, bilateralmente in modo stereotassico, 1 μ L di A β (1-42) aggregata (5 μ g/ μ L) o 1 μ L di salina nella regione CA3 dell'ippocampo (5,6

mm caudalmente; 4,6 mm lateralmente e 6,4 mm in profondità rispetto al punto bregma) [Paxinos and Watson, 1998; Uyanikgil *et al.*, 2005].

Somministrazione delle microsfere di HP- β -CD

Per gli esperimenti *in vivo*, gli animali sono stati suddivisi in 5 gruppi (n=4): *i*) controllo, *ii*) con solo A β (1–42); *iii*) salina + HP- β -CD non formulata; *iv*) A β (1–42) + microsfere HP- β -CD/chitosano, *v*) A β (1–42) + microsfere HP- β -CD/alginato. Dopo chirurgia, le formulazioni sono state somministrate per 7 giorni in una sola narice (alternata nei giorni) in un quantitativo espresso in HP- β -CD pari a 2 mg/giorno/narice. Al termine, i ratti sono stati decapitati, i cervelli rimossi ed i campioni di ippocampo sezionati in ghiaccio. I livelli di espressione del mRNA di Bax, Bcl-2, Apex1 e GAPDH sono stati misurati nei tessuti ippocampali.

Isolamento RNA totale, PCR retro-trascrizionale e PCR *real-time*

L'RNA totale è stato estratto trattando l'ippocampo di ratto con il reagente Trizol (Invitrogen, USA), seguito da estrazione fenolo-cloroformio e precipitazione con isopropanolo [Chomczynski, 1993]. L'RNA totale (1 μ g) è stato usato come stampo dalla trascrittasi inversa moloney-murine leukemia virus (M-MuLV) (Fermentas, USA) per la sintesi del cDNA.

L'amplificazione con PCR *real-time* è stata condotta utilizzando Mx3000P Quantitative PCR System (Stratagene USA) ed il reagente SYBR Green I. Un μ L di miscela di trascrizione inversa (diluizione 1:5) è stato amplificato con 1 μ L di 15 pmol dei *primer forward* and *reverse*, 12,5 μ L Brilliant II SYBR Green QPCR master mix (Stratagene, USA) e 9,5 μ L di acqua bidistillata in un volume totale di 25 μ L. I *primers* specifici (Thermo Fisher Scientific, USA) sono stati per Bax (NM_017059) TGC AGA GGA TGA TTG CTG AC (*forward*) e GAT CAG CTC GGG CAC TTT AG (*reverse*); per Bcl-2 (L14680), TCT GTG GAT GAC TGA GTA CCT GAA C (*forward*) e AGA GAC AGC CAG GAG AAA TCA AAC (*reverse*); per Apex1 (NM_024148), TGG AAT GTG GAT GGG CTT CGA CC (*forward*) e ATG GAG CTG ACC AGT ACT GAT GG (*reverse*); e per GAPDH (AF106860), AAG GTC ATC CCA GAG CTG AA (*forward*) e ATG TAG GCC ATG AGG TCC AC (*reverse*).

Il protocollo impiegato per l'amplificazione è stato: fusione iniziale a 95°C/10 min; fusione a 95°C/45 sec/35 cicli; appaiamento a 55°C/30 sec ed estensione a 72°C/45 sec. In seguito all'amplificazione, è stata condotta l'analisi della curva di dissociazione per confermare la purezza dei prodotti PCR. I parametri impiegati per l'analisi delle curve di

fusione sono stati di 1 min a 95°C, abbassamento a 55°C, quindi innalzamento della temperatura da 55°C a 95°C con un tasso di decremento di 0,2°C/sec. Per la normalizzazione è stato preso il gene GAPDH come controllo endogeno.

L'espressione relativa dei geni target è stata quantificata basandosi su [Livak and Schmittgen \(2001\)](#) ed ABI Prism 7700 *Sequence Detection System User Bulletin No. 2* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Frammentazione DNA

Il DNA genomico è stato estratto dai campioni di ippocampo utilizzando il kit di purificazione GeneJET Genomic DNA (Thermo Fisher Scientific, USA). Cinque µg di DNA sono stati sottoposti ad elettroforesi a 75V per 90 min in gel di agarosio al 2% usando il tampone Tris-acetato-EDTA. Il gel è stato colorato con bromuro di etidio, irradiato all'UV in transilluminatore e fotografato. La frammentazione del DNA è stata quantificata per mezzo del Biocapt software (Vilber Lourmat, France) con metodo di analisi densiometrica. I dati sono stati espressi in percentuale rispetto al controllo [[Kim et al., 1998](#)].

Ottenimento sinaptosomi

I sinaptosomi sono stati preparati utilizzando la metodica di [Bonnet and Costentin \(1989\)](#) opportunamente modificata [[Morel et al., 1998](#)]. L'intero cervello è stato omogeneizzato in 10 vol (1:10 p/v) di saccarosio 0,32 M. Gli omogenati sono stati centrifugati a 1000 g per 10 min per ottenere un pellet contenente nuclei, corpi cellulari e frammenti assonici. Il surnattante è stato conservato a 4°C ed il pellet risospeso in 10 vol (1:10 p/v) di saccarosio 0,32 M e centrifugato alle stesse condizioni. I 2 differenti surnattanti sono stati uniti e centrifugati a 17500 g per 30 min a 4°C. Il surnattante ottenuto è stato scartato ed il pellet risospeso in tampone Krebs-Ringer (pH 7,6) raffreddato in ghiaccio. La concentrazione proteica è stata misurata mediante Lowry [[Lowry et al., 1951](#)] ed aggiustata a 1 mg/mL.

Incubazione sinaptosomi con HP-β-CD e microsfere HP-β-CD/chitosano HP-β-CD/alginate

I sinaptosomi sono stati ottenuti dagli animali trattati con salina e con solo Aβ(1-42). I sinaptosomi del Aβ(1-42) sono stati incubati (1,5 h, 37°C) con 1 e 5 mg di **HP-β-CD (CD1, CD5)** e con le formulazioni **HP-β-CD/chitosano (C1=1 mg in HP-β-CD) (C5=5 mg in HP-β-CD)** e **HP-β-CD/alginate (A1=1 mg in HP-β-CD) (A5=5mg in HP-β-CD)**. Al termine dell'incubazione sono stati misurati i livelli di perossidazione lipidica, produzione di ROS e funzione mitocondriale nel controllo (salina) ed in tutti i gruppi sperimentali Aβ(1-42),

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

A β (1–42) + **CD1**, A β (1–42) + **CD5**, A β (1–42) + **C1**, A β (1–42) + **C5**, A β (1–42) + **A1** ed A β (1–42) + **A5**. Con N=4 per ogni gruppo sperimentale.

Quantificazione perossidazione lipidica

I livelli di malondialdeide (MDA) sono stati determinati con il metodo del doppio riscaldamento [Draper and Hadley, 1990]. Un mL di acido tricloroacetico (TCA) al 10% è stato addizionato a 200 μ L del campione sinaptosomiale e trasferito in bagnomaria bollente per 15 min. Dopo raffreddamento con acqua corrente, la miscela è stata centrifugata a 1000 g per 10 min ed 1 mL del surnattante è stato addizionato a 2 mL di acido tiobarbiturico (TBA) 0,67% e posto in bagnomaria bollente per 15 min. Dopo raffreddamento della soluzione in acqua corrente, è stata misurata l'assorbanza a 532 nm (spettrofotometro Shimadzu UV-1601, Giappone). I livelli di MDA sono stati determinati usando come standard il 1,1,3,3-tetrametossipropano ed espressi in nmol/mg proteina.

DCF test

La formazione delle specie radicaliche all'ossigeno (ROS) è stata quantificata mediante analisi fluorometrica per mezzo del test della diclorofluoresceina (DCF) basato sull'uso della sonda fluorescente 2,7-diclorofluoresceina diacetato (DCF-DA).

Il test della DCF è stato condotto utilizzando la metodica descritta da Wang *et al.* (2012). La soluzione stock 10 nM della DCF-DA in etanolo è stata mantenuta a -70°C. I sinaptosomi sono stati incubati con una soluzione 10 μ M di DCF-DA, per 30 min a temperatura ambiente, centrifugati a 3000 g (5 min, 4°C) e risospesi in PBS. La fluorescenza del DCF è stata misurata a λ_{ex} =495 nm, λ_{em} =530 nm (SpectraMax M3 lettore micropiastre, Molecular Devices, USA). I dati sono stati espressi in percentuale rispetto al controllo.

MTT test

Il test di integrità mitocondriale è stato valutato mediante il saggio di proliferazione cellulare MTT per valutazione della conversione del MTT a formazan. A 200 μ L di sospensione sinaptosomiale sono stati aggiunti 20 μ L di MTT (5 mg/mL). I campioni sono stati incubati per 3 h al buio a 37°C. I cristalli viola di formazan sono stati raccolti mediante centrifugazione a 15000 g per 15 min ed il supernattante eliminato. Il pellet è stato solubilizzato in DMSO. La quantificazione del formazan è stata effettuata tramite analisi spettrofotometrica a 570 nm (VersaMax lettore micropiastre, Molecular Devices, USA). I dati sono stati espressi in percentuale rispetto al controllo [Keller *et al.*, 1997].

Analisi statistica

I dati sono stati elaborati mediante analisi della varianza (ANOVA, *post hoc* Tukey). I valori sono stati espressi come media \pm errore standard (SE). Livelli di $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

Effetti *in vitro* ed *in vivo* sui parametri apoptotici e ossidativi di A β (1-42), HP- β -CD, HP- β -CD/chitosano e HP- β -CD/alginato.

Dopo trattamento dei sinaptosomi con A β (1-42), è stato osservato un aumento della perossidazione lipidica, della produzione di ROS ed un decremento dei livelli di MTT rispetto al gruppo di controllo ($p < 0,05$). Al contrario, sia **HP- β -CD** che le microsfere **HP- β -CD/chitosano** e **HP- β -CD/alginato** hanno significativamente ridotto i livelli di perossidazione lipidica e produzione di ROS e migliorato la funzione mitocondriale rispetto al gruppo A β (1-42) ($p < 0,05$) ([Fig. 1,2,3](#)).

Le formulazioni più attive nei confronti dei livelli di perossidazione lipidica e formazione di ROS si sono dimostrate quelle con 1 mg di HP- β -CD (**CD1**), con l'equivalente contenuto nelle microsfere HP- β -CD/alginato (**A1**) e con le microsfere HP- β -CD/chitosano contenenti 5 mg di HP- β -CD (**C5**) ([Fig. 1,2](#)). Tutte le formulazioni testate hanno comunque protetto dalla funzione mitocondriale se paragonate al gruppo A β (1-42). Da notare è che l'impiego di 1 mg di HP- β -CD (**CD1**) è stato più efficace di 5 mg della stessa (**CD5**) ([Fig. 3](#)).

A β (1-42) ha incrementato i livelli di frammentazione del DNA nell'ippocampo, se confrontato al gruppo di controllo trattato con salina ($p < 0,05$), e l'impiego di tutte le formulazioni in microsfere (**C1**, **C5**, **A1**, **A5**) ha permesso una riduzione del danno al DNA indotto da A β (1-42), ($p < 0,05$) ([Fig. 4 a,b](#)).

In [Fig. 5](#) sono mostrati i livelli di espressione relativa del mRNA di Bax, Bcl-2 e Apex1 nell'ippocampo di ratto dopo somministrazione nasale delle microsfere in modelli di neurotossicità indotta da A β (1-42). I risultati hanno mostrato che: *I*) A β (1-42) ha indotto l'espressione del mRNA di Bax mentre ha ridotto quella del Bcl-2 ([Fig. 5 a,b](#)), portando ad un rapporto elevato tra Bax/Bcl-2 rispetto al controllo. L'espressione del mRNA di Apex1 è stata ridotta rispetto al controllo ($p < 0,05$). *II*) **HP- β -CD** + salina ha diminuito il rapporto tra Bax/Bcl2 sia rispetto al controllo che al gruppo trattato con solo A β (1-42) ($p < 0,05$) ([Fig. 5 d](#)). I livelli del mRNA di Apex1 hanno subito incremento rispetto al gruppo A β (1-42). *III*) **HP- β -CD/chitosano** e **HP- β -CD/alginato** hanno significativamente ridotto il rapporto Bax/Bcl2 con fenomeno più evidente per le **HP- β -CD/chitosano**. Inoltre sembra che le microsfere **HP- β -CD/chitosano** siano più efficaci delle **HP- β -CD/alginato** nel regolare il

rapporto di questi parametri apoptotici anche rispetto al gruppo **HP- β -CD** + salina ([Fig. 5 a,b,c](#)). Tuttavia, entrambe le formulazioni non hanno aumentato significativamente i livelli di espressione del mRNA di Apex1 se confrontate con quello del A β (1-42), anche se ancora una volta, le microsfeere **HP- β -CD/chitosano** sono state piÙ efficaci in questo ruolo rispetto a quelle impieganti alginato se confrontate con i controlli ([Fig. 5 c](#)).

La specificità di amplificazione dei prodotti della PCR *real-time* è stata confermata dall'analisi delle curve di fusione e dalle temperature di fusione per Bax, Bcl-2, Apex1 e GAPDH rispettivamente di 85°C, 82,1°C, 83,1°C e 85,4 °C ([Fig. 6 a,b,c,d](#)). La specificità dei prodotti di questi geni è stata confermata mediante elettroforesi su gel di agarosio ([Fig. 6 e](#)).

Discussione

Un segno distintivo di tutte le forme di AD è l'accumulo anormale di A β (1-42) in specifiche zone cerebrali. Elevati livelli di colesterolo aumentano l'accumulo di A β sia in sistemi cellulari [Schneider *et al.*, 2006] che vari modelli animali della patologia. L'utilizzo di molecole in grado di abbassare i livelli di colesterolo è stato considerato un possibile approccio terapeutico nel AD.

È risaputo che le CD sono capaci di rimuovere il colesterolo dalle membrane cellulari e modulare la risposta recettoriale. Di recente è stato mostrato [Krisanova *et al.*, 2012] che la metil- β -ciclodestrina è stata in grado di ridurre di un quarto il contenuto di colesterolo nei sinaptosomi con il concomitante decremento del rilascio, mediato da trasportatori, del glutammato a livello dei terminali nervosi. Come conseguenza, l'abbassamento del colesterolo potrebbe venir sfruttato per la neuroprotezione nell'ictus, nell'ischemia e nei traumi cerebrali in cui si riscontra anche un aumento del rilascio del glutammato. Diversi autori hanno indagato il ruolo delle CD nella patologia Niemann-Pick tipo C (NPC) caratterizzata da neurodegenerazione fatale dovuta ad accumulo intracellulare di colesterolo non esterificato e di gangliosfingolipidi (GSL) [Davidson *et al.*, 2009; Camargo *et al.*, 2001]. Nel novembre del 2012 è stato avviato un *trial* clinico su pazienti NPC1 riguardante la somministrazione intracerebroventricolare di HP- β -CD [www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01747135].

Tuttavia, la HP- β -CD mostra scarsa capacità di attraversamento della barriera emato-encefalica (BEE). Per questo motivo, in un lavoro precedente [Gavini *et al.*, 2009], sono state sviluppate microsferi incapsulanti la HP- β -CD, costituite dai polimeri alginato e chitosano destinate ad una somministrazione *nose-to-brain*. Le caratterizzazioni hanno evidenziato che tra le formulazioni testate alcune erano in grado di ridurre *in vitro* la morte cellulare indotta da A β e possedevano, in aggiunta, idonee proprietà per una somministrazione nasale (dimensioni, *swelling*, mucoadesione).

Sulla base di questi promettenti risultati, il lavoro ha avuto l'obiettivo di testare i potenziali effetti di protezione in modelli animali con neurotossicità indotta da A β (1-42).

La eccitossicità viene ampiamente considerata uno dei fattori contribuenti alla morte neuronale nelle patologie neurodegenerative acute o croniche [Turunc *et al.*, 2010] (ictus, epilessia, Parkinson, sclerosi laterale amiotrofica, Huntington e AD) in cui si manifesta un'alterata distribuzione regionale dei recettori NMDA ed una loro eccessiva attivazione che porta ad una vulnerabilità localizzata dei neuroni, così come osservato nel AD [Hynd *et al.*, 2004]. Un numero limitato di studi ha ricercato le azioni di neuro-protezione delle CD *in vivo* con scopo quello di chiarire il legame che intercorre tra la riduzione dei livelli di

colesterolo di membrana ed i cambiamenti nell'attivazione recettoriale, con particolare riguardo per quella del NMDA [Frank *et al.*, 2008].

Nel AD si osserva anche una compromessa funzione mitocondriale [Tillement *et al.*, 2011]. In tale contesto sembrano avere un ruolo le proteine Bcl-2 (anti-apoptotica) e Bax (pro-apoptotica) poiché coinvolte nella regolazione dei segnali apoptotici provenienti dai mitocondri. La proteina Bcl-2 partecipa all'equilibrio tra la morte e la sopravvivenza cellulare sia in condizioni normali che patologiche [Farlie *et al.*, 1995]. Yalcin *et al.* (2010) hanno riportato come l'espressione del mRNA di Bax e Bcl-2 venga alterata in modelli di eccitotossicità da acido kainico. La maggiore efficacia delle microsfele **HP- β -CD/chitosano** rispetto a quelle di **HP- β -CD/alginate** nel ridurre il rapporto tra Bax/Bcl-2 potrebbe trovare spiegazione nelle capacità mucoadesive e promuoventi l'assorbimento di farmaci in esse caricate e somministrati per via nasale. Numerosi studi hanno confermato come la somministrazione nasale di formulati particellari di chitosano aumenti le concentrazioni di farmaco a livello del fluido cerebrospinale. Dalpiaz *et al.* (2008), in studi *in vivo* condotti su ratti, hanno mostrato come la somministrazione nasale delle microparticelle di chitosano cloruro (lo stesso impiegato nel presente lavoro) caricate con il farmaco CPA siano state in grado di aumentare la concentrazione di CPA rinvenuta nel LCS e nel bulbo olfattivo.

I risultati ottenuti hanno fornito nuove informazioni circa le azioni di neuro-protezione associate all'uso di HP- β -CD nel cervello di ratto con neurotossicità indotta da A β (1-42).

La somministrazione nasale di microsfele di **HP- β -CD/chitosano** e **HP- β -CD/alginate** ha diminuito in modo significativo i parametri di stress ossidativo ed aumentato il rapporto del mRNA di Bcl-2/Bax suggerendo un effetto protettivo in ratti con neurotossicità indotta da A β (1-42). L'effetto di protezione trova giustificazione nell'aumentata espressione di Bcl-2, la quale è una proteina antiossidante [Hockenberry *et al.*, 1993] capace di bloccare i meccanismi apoptotici prevenendo il rilascio del citocromo *c* [Kluck *et al.*, 1990]. Inoltre, l'effetto protettivo delle formulazioni contenenti HP- β -CD nella neurotossicità da A β (1-42), potrebbe avere una componente aggiunta dovuta alla riduzione del colesterolo mitocondriale o dei livelli di glutatione mitocondriale (mGSH). Infatti, per le già menzionate capacità delle CD di rimuovere il colesterolo di membrana, si potrebbe ridurre l'accumulo di questo nei mitocondri il quale è un fattore implicato nella tossicità da A β che porta ad un peggioramento dell'infiammazione e della neurotossicità attraverso la regolazione del mGSH [Fernández *et al.*, 2009].

Nel AD si osserva anche un'aumentata ossidazione del DNA nucleare e mitocondriale in seguito ad un maggior attacco del ROS al DNA e ad un indebolimento dei meccanismi di riparazione del DNA [Santos *et al.*, 2012]. I risultati qui ottenuti indicano che con l'impiego

di microsfere di **HP- β -CD/alginato** e **HP- β -CD/chitosano** si riduce significativamente la frammentazione del DNA la quale rappresenta il culmine dei processi della cascata biochimica che caratterizzano la morte cellulare apoptotica [Kondratyev and Gale, 2001].

Le formulazioni microparticellari si possono quindi definire dei potenziali ed efficaci strumenti di neuroprotezione.

Conclusioni

I dati ottenuti suggeriscono che le formulazioni microparticellari testate, veicolanti la HP- β -CD, hanno un potenziale come sistemi neuro-protettivi in modelli animali di eccitotossicità indotta da A β (1-42). I risultati possono essere riassunti come segue: *I*) A β (1-42) ha causato stress ossidativo ed apoptosi dovuti a minore integrità mitocondriale, aumento dei livelli di perossidazione lipidica, produzione di ROS, danno al DNA e maggiore espressione del mRNA di Bax. *II*) La somministrazione nasale di microsfere di **HP- β -CD/chitosano** e **HP- β -CD/alginato** ha diminuito in modo significativo i parametri di stress ossidativo ed aumentato il rapporto del mRNA di Bcl-2/Bax suggerendo un effetto protettivo nell'ippocampo di ratto con neurotossicità indotta da A β (1-42). *III*) Nelle condizioni e nei parametri di cui al punto precedente, le microsfere **HP- β -CD/chitosano** si sono dimostrate più efficaci rispetto a quelle di alginato.

La somministrazione nasale delle formulazioni incapsulanti la HP- β -CD può quindi essere un utile approccio neuro-protettivo.

Ringraziamenti

Questo studio è stato condotto grazie al parziale support finanziario di *Ege University Research Foundation (Project no: 12/ECZ/037 to A.Y)*.

Bibliografia

Abramov AY, Ionov M, Pavlov E, Duchon MR. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Aging Cell*. 2011;10(4):595-603.

Abulrob A, Tauskela JS, Mealing G, Brunette E, Faid K, Stanimirovic D. Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J Neurochem*. 2005;92(6):1477-86.

Alam MI, Beg S, Samad A, Baboota S, Kohli K, Ali J, Ahuja A, Akbar M. Strategy for effective brain drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40(5):385-403.

Block ML, Hong JS. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*. 2005;76(2):77-98.

Bonnet JJ, Costentin J. Correlation between [3H] dopamine specific uptake and [3H] GBR 12783 specific binding during the maturation of rat striatum. *Life Sci*. 1989;44(23):1759-65.

Camargo F, Erickson RP, Garver WS, Hossain GS, Carbone PN, Heidenreich RA, Blanchard J. Cyclodextrins in the treatment of a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Life Sci*. 2001;70(2):131-42.

Camilleri P, Haskins NJ, Howlett DR. Beta-cyclodextrin interacts with the Alzheimer amyloid b-A4 peptide. *FEBS Lett*. 1994;341(2-3):256-8.

Chomczynski P. A Reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *Biotechniques*. 1993;15(3):532-7.

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01747135. Hydroxypropyl Beta Cyclodextrin for Niemann-Pick Type C1 Disease. Consultabile al: (www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01747135).

Dalpiaz A, Gavini E, Colombo G, Russo P, Bortolotti F, Ferraro L, Tanganelli S, Scatturin A, Menegatti E, Giunchedi P. Brain uptake of an antiischemic agent by nasal administration of microparticles. *J Pharm Sci*. 2008;97(11):4889-903.

Davidson CD, Ali NF, Micsenyi MC, Stephney G, Renault S, Dobrenis K, Ory DS, Vanier MT, Walkley SU. Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS One* 2009; 4(9): e6951. Consultabile al: (<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0006951>).

Donovan M, Cotter TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644(2-3):133-47.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1990;186:421-31.

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Farlie PG, Dringen R, Rees SM, Kannourakis G, Bernard O. Bcl-2 transgene expression can protect neurons against developmental and induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(10):4397-401.

Fernández A, Llacuna L, Fernández-Checa JC, Colell A. Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *J Neurosci*. 2009;29(20):6394-405.

Fishel ML, Kelley MR. The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. *Mol Aspects Med*. 2007;28:375-95.

Forlenza OV, Diniz BS and Wagner F Gattaz. Diagnosis and biomarkers of predementia in Alzheimer's disease. *BMC Med*. 2010;8:89.

Frank C, Rufini S, Tancredi V, Forcina R, Grossi D, D'Arcangelo G. Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Exp Neurol*. 2008;212(2):407-14.

Gavini E, Rassa G, Ferraro L, Beggiato S, Alhalaweh A, Velaga S, Marchetti N, Bandiera P, Giunchedi P, Dalpiaz A1. Influence of polymeric microcarriers on the in-vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;83(2):174-83.

Gavini E, Rassa G, Ferraro L, Generosi A, Rau JV, Brunetti A, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of chitosan glutamate on the in vivo intranasal absorption of rokitamycin from microspheres. *J Pharm Sci*. 2011;100(4):1488-502.

Gavini E, Rassa G, Haukvik T, Lanni C, Racchi M, Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of cyclodextrins. *J Drug Target*. 2009;17(2):168-79.

Gavini E, Rassa G, Sanna V, Cossu M, Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of an antiemetic drug, metoclopramide: in-vitro/ex-vivo studies. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(3):287-94.

Gella A, Durany N. Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adh Migr*. 2009;3(1):88-93.

Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): A toxicology review. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(10):1451-59.

Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 1993;75(2):241-51.

Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2004;45(5):583-95.

Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci*. 1997;86(2):147-62.

Keller JN, Pang Z, Geddes JW, Begley JG, Germeyer A, Waeg G, Mattson MP. Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *J Neurochem.* 1997;69(1):273-84.

Kim YM, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31437-41.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275(5303):1132-6.

Kondratyev A, Gale K. Temporal and spatial patterns of DNA fragmentation following focally or systemically-evoked status epilepticus in rats. *Neurosci Lett.* 2001;310(1):13-6.

Krisanova N, Sivko R, Kasatkina L, Borisova T. Neuroprotection by lowering cholesterol: A decrease in membrane cholesterol content reduces transporter-mediated glutamate release from brain nerve terminals. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(10):1553-61.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

Lochhead JJ, Thorne GR. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(7):614-628.

Loftsson T, Duchene D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharmaceutics.* 2007;329:1-11.

Loftsson T, Jarho P, Másson M, Järvinen T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005;2(2):335-51.

López CA, de Vries AH, Marrink SJ. Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. *PLoS Comput Biol.* 2011;7(3):e1002020. Consultabile al: (<http://www.ploscompbiol.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pcbi.1002020>).

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol Reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-375.

Luppi B, Bigucci F, Abruzzo A, Corace G, Cerchiara T, Zecchi V. Freeze-dried chitosan/pectin nasal inserts for antipsychotic drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010; 75(3):381-7.

Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(2):120-29.

Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004; 430(7000):631-39.

Morel P, Fauconneau B, Page G, Mirbeau T, Huguet F. Inhibitory effects of ascorbic acid on dopamine uptake by rat striatal synaptosomes: relationship to lipid peroxidation and oxidation of protein sulfhydryl groups. *Neurosci Res.* 1998;32(2):171-9.

Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, IV ed. New York: Academic Press, 1998.

Qin XR, Abe H, Nakanishi H. NMR and CD studies on the interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide (12–28) with beta-cyclodextrin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(4):1011-5.

Rivers JR, Maggo SD, Ashton JC. Neuroprotective effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin in hypoxia-ischemia. *Neuroreport.* 2012;23(3):134-8.

Rufini S, Grossi D, Luly P, Tancredi V, Frank C, D'Arcangelo G. Cholesterol depletion inhibits electrophysiological changes induced by anoxia in CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 2009;1298:178-85.

Santos RX, Correia SC, Zhu X, Lee HG, Petersen RB, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Moreira PI. Nuclear and mitochondrial DNA oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic Res.* 2012;46(4):565-76.

Schneider A, Schulz-Schaeffer W, Hartmann T, Schulz JB, Simons M. Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis.* 2006;23(3):573-577.

Tillement L, Lecanu L, Papadopoulos V. Further evidence on mitochondrial targeting of β -amyloid and specificity of β -amyloid-induced mitotoxicity in neurons. *Neurodegener Dis.* 2011;8(5):331-44.

Turunc E, Kanit L, Yalcin A. Effect of γ -glutamylcysteine ethylester on the levels of c-fos mRNA expression, glutathione and reactive oxygen species formation in kainic acid excitotoxicity. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62:1010-7.

Uyanikgil Y, Turgut M, Ateş U, Baka M, Yurtseven ME. Beneficial effects of melatonin on morphological changes in postnatal cerebellar tissue owing to epileptiform activity during pregnancy in rats: light and immunohistochemical study. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005;159(2):79-86.

Valentino JS, Quanren HE. Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology.* 2008;36:30-42.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408(6810):307-10.

Wang Y, Xia Z, Xu JR, Wang YX, Hou LN, Qiu Y, Chen HZ. A-mangostin, a polyphenolic xanthone derivative from mangosteen, attenuates β -amyloid oligomers-induced neurotoxicity by inhibiting amyloid aggregation. *Neuropharmacology.* 2012 62(2):871-81.

Yalcin A, Armagan G, Turunc E, Konyalioglu S, Kanit L. Potential neuroprotective effect of γ -Glutamylcysteine ethyl ester on rat brain against kainic acid-induced excitotoxicity. *Free Radic Res.* 2010;44(5):513-21.

Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1768(6):1311-24.

Ziolkowski W, Szkatula M, Nurczyk A, Wakabayashi T, Kaczor JJ, Olek RA, Knap N, Antosiewicz J, Wieckowski MR, Wozniak M. Methyl-beta-cyclodextrin induces mitochondrial cholesterol depletion and alters the mitochondrial structure and bioenergetics. *FEBS Lett.* 2010;584(22): 4606-10.

Figure

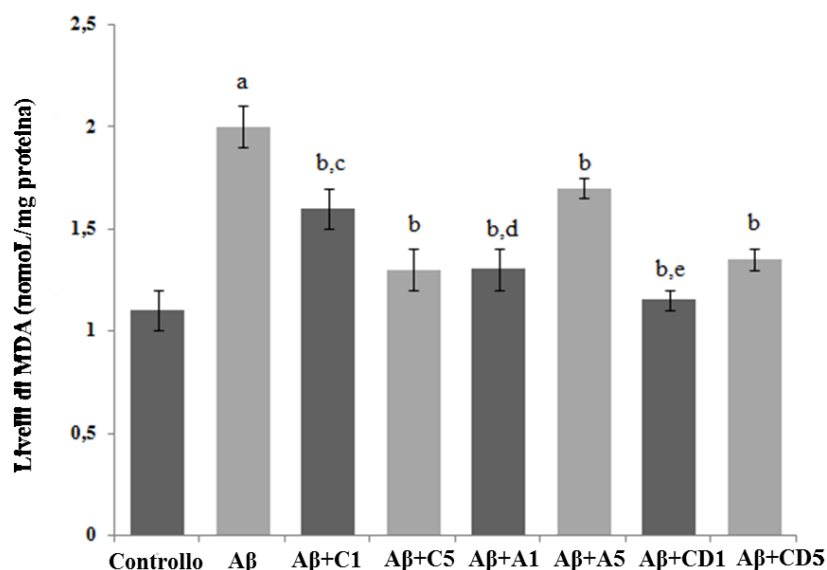


Figura 1. Livelli di perossidazione lipidica. Livelli di MDA da sinaptosomi di controllo ed A β incubati con microsferi di **HP- β -CD/chitosano** (A β +C1, A β +C5) e di **HP- β -CD/alginato** (A β +A1, A β +A5) e con **HP- β -CD** non formulata (A β +CD1, A β +CD5). I risultati sono stati espressi come media \pm SE di 4 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. (n=4, ^a p<0,05 vs tutti, ^b p<0,05 vs A β , ^c p<0,05 vs A β +C5, ^d p<0,05 vs A β +A5, ^e p<0,05 vs A β +CD5). Con A β = A β (1-42).

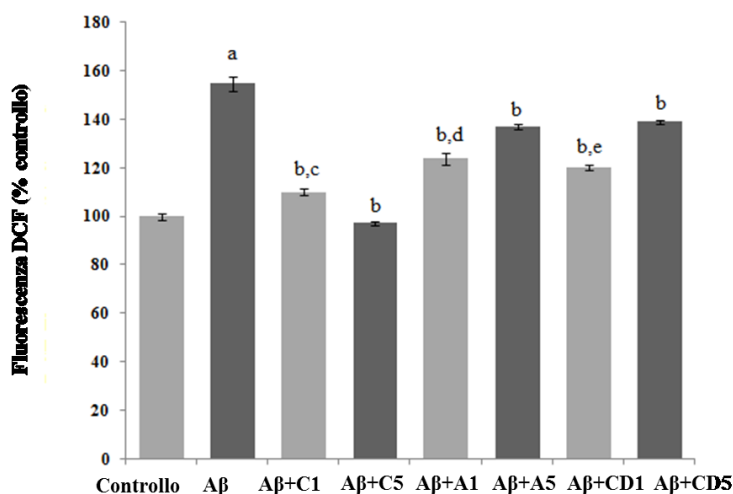


Figura 2. Livelli di produzione di ROS. Livelli di DCF (% controllo), nei sinaptosomi di controllo ed A β incubati con microsferi di **HP- β -CD/chitosano** (A β +C1, A β +C5) e di **HP- β -CD/alginato** (A β +A1, A β +A5) e con **HP- β -CD** non formulata (A β +CD1, A β +CD5). I risultati sono stati espressi come media \pm SE di 4 esperimenti indipendenti condotti in

triplicato. (n=4, ^a p<0,05 tutti, ^b p<0,05 vs A β , ^c p<0,05 vs A β +C5, ^d p<0,05 vs A β +A5, ^e p<0,05 vs A β +CD5). Con A β = A β (1-42).

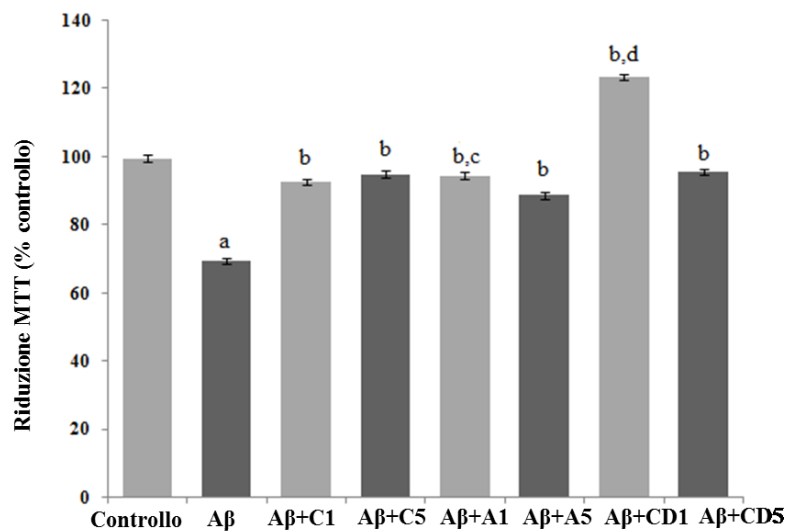


Figura 3. Attività mitocondriale. Riduzione MTT nei sinaptosomi di controllo ed A β incubati con microsfele di **HP- β -CD/chitosano** (A β +C1, A β +C5) e di **HP- β -CD/alginato** (A β +A1, A β +A5) e con **HP- β -CD** non formulata (A β +CD1, A β +CD5). I risultati sono stati espressi come media \pm SE di 4 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. (n=4, ^a p<0,05 vs tutti, ^b p<0,05 vs A β , ^c p<0,05 vs A β +A5, ^d p<0,05 vs A β +CD5). Con A β = A β (1-42).

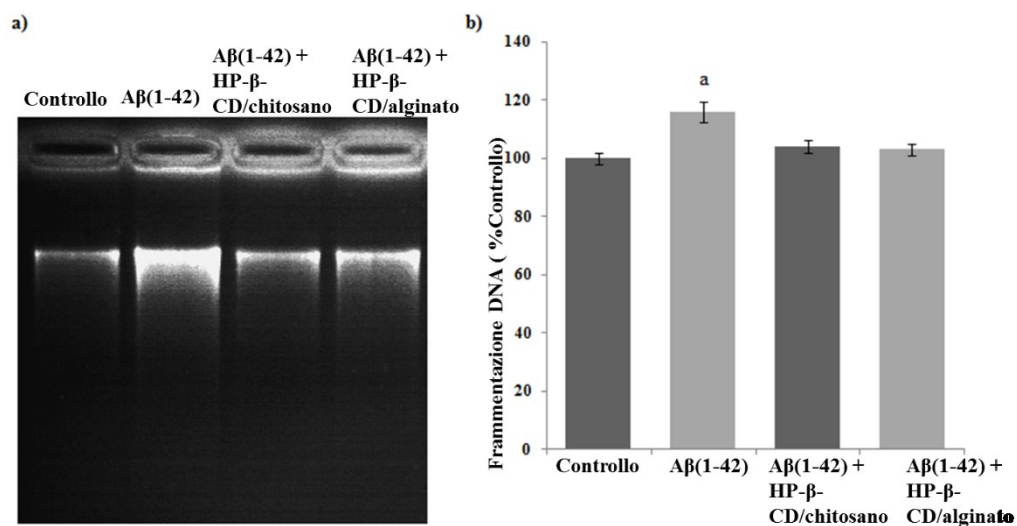


Figura 4. Frammentazione DNA. Analisi qualitativa (a) e quantitativa (b) della frammentazione al DNA da campioni provenienti dall'ippocampo di ratto del gruppo di controllo, A β (1-42), A β (1-42)+ **HP- β -CD/chitosano** e A β (1-42)+ **HP- β -CD/alginato**. I risultati sono stati espressi come media \pm SE di 4 esperimenti indipendenti condotti in triplicato (n=4, ^a p<0,05 vs tutti).

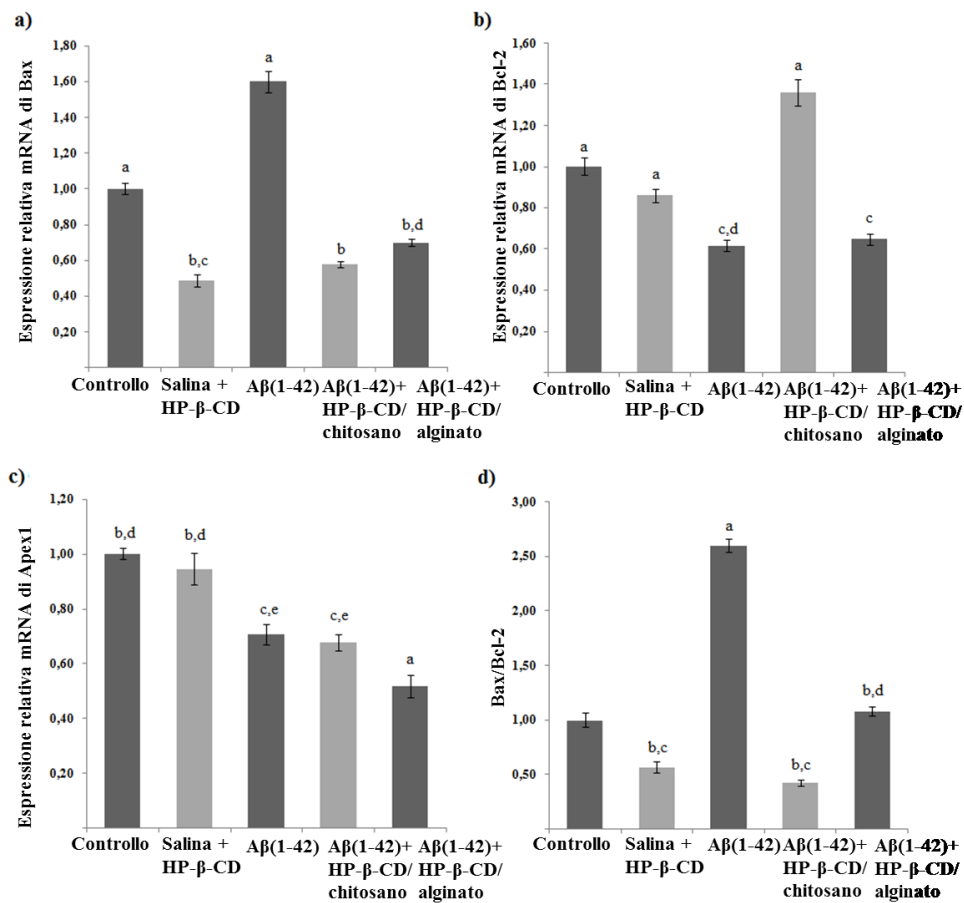


Figura 5. Livelli di espressione dei geni target e del rapporto Bax/Bcl-2. Espressione relativa del mRNA di (a) Bax, (b) Bcl-2, (c) Apex1 e (d) rapporto Bax/Bcl-2 in tutti i gruppi trattati. I risultati sono stati espressi come media \pm SE. (n=4, ^a p<0,05 vs tutti, ^b p<0,05 vs Aβ(1-42), ^c p<0,05 vs controllo, ^d p<0,05 vs Aβ(1-42) + HP-β-CD/chitosano, ^e p<0,05 vs Aβ(1-42) + HP-β-CD/alginato).

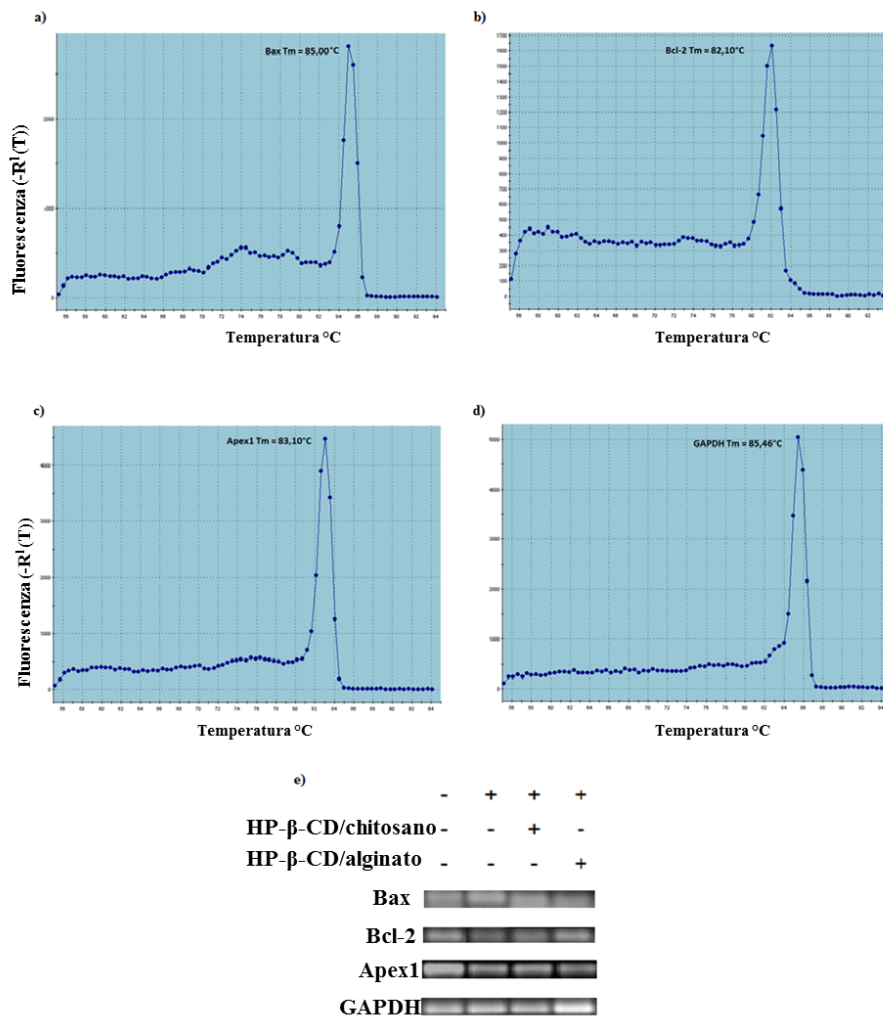


Figura 6. Conferma dei prodotti PCR *real-time*. Curve di fusione ed elettroforesi in gel di agarosio dei geni (a) Bax, (b) Bcl-2, (c) Apex1 e (d) GAPDH.

Capitolo III

Microparticelle Solide di Chitosano o Metil- β -ciclodestrina per il trasporto *nose-to-brain* della deferoxamina mesilato: il primo approccio formulativo

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Abstract

La deferoxamina mesilato (DFO), un agente chelante del ferro, ha mostrato di essere un valido principio attivo destinato al trattamento di molteplici patologie a carico del sistema nervoso centrale (SNC) nelle quali si osserva un accumulo del metallo. A causa della sua scarsa biodisponibilità orale e per la sua breve emivita plasmatica, la DFO viene impiegata solo per via parenterale. Tuttavia, non è stata ancora dimostrata con certezza la capacità del farmaco di passare la barriera emato-encefalica e raggiungere il SNC passando per il sangue. La somministrazione nasale è stata impiegata con successo per il rapido e diretto trasporto di agenti terapeutici verso le sedi centrali, tramite la strategia conosciuta come *nose-to-brain*. L'obiettivo del lavoro è stato quello di formulare sistemi di veicolazione microparticellari a base di metil- β -ciclodestrina e chitosano con lo scopo di aumentare il trasporto *nose-to-brain* della DFO. Nel processo formulativo sono state impiegate due differenti tecniche di essiccamento (*spray drying* o liofilizzazione). Dei preparati ottenuti sono stati valutati i parametri aerodinamici particellari (dimensioni, morfologia, densità) nonché l'influenza dei due differenti polimeri (metil- β -ciclodestrina e chitosano) sulla permeazione del farmaco *in vitro* in modelli di membrane idrofiliche e lipofile, *ex vivo* in mucosa nasale suina e quindi in modelli cellulari epiteliali e neuronali. Infine è stata studiata la capacità dei sistemi microparticellari di veicolare la DFO nel SNC dopo somministrazione nasale in ratti.

I risultati hanno mostrato come il metodo dello *spray drying* ha portato a minori rese di produzione dei formulati rispetto alla liofilizzazione, ma ha consentito di ottenere microparticelle caratterizzate da buoni parametri aerodinamici sia nel caso dei formulati a base di chitosano che di metil- β -ciclodestrina. Le microsfele a base di metil- β -ciclodestrina hanno permesso un maggiore passaggio della DFO in modelli di membrane lipofile, nella mucosa nasale suina e nei modelli cellulari neuronali, rispetto alle corrispondenti formulazioni con chitosano. Entrambi i formulati hanno mostrato di favorire il passaggio *nose-to-brain* della DFO in seguito alla loro somministrazione nasale *in vivo*. Le microparticelle di metil- β -ciclodestrina hanno consentito comunque un maggiore grado di permeazione della DFO, per la quale il passaggio nel liquido cerebrospinale è stato di circa cinque volte superiore rispetto ai corrispondenti formulati a base di chitosano.

Introduzione

La deferoxamina (DFO) è un agente chelante esadentato capace di complessare il ferro (preferenzialmente Fe^{3+}) ad un rapporto molare di 1:1. Il complesso della DFO con il ferro (ferriossamina) è molto stabile e quindi in grado di prevenire reazioni di catalisi redox promosse dagli ioni ferro, responsabili della formazione di radicali liberi [Cullen *et al.*, 2009;Poggiali *et al.*, 2012]. La DFO, in forma di sale mesilato, rappresenta la terapia di scelta nell'intossicazione acuta da ferro o in quella cronica dovuta a sovraccarico del metallo, come accade in un regime trasfusionale eritrocitario prolungato adottato nei casi di anemie croniche trasfusione-dipendenti [Hua *et al.*, 2008;Poggiali *et al.*, 2012]. La DFO, poiché possiede un relativamente alto peso molecolare ed un'elevata idrofilia, non è in grado di penetrare all'interno della maggior parte delle cellule ad eccezione degli epatociti, dove sembra essere presente un meccanismo di trasporto facilitato [Porter *et al.*, 2005]. A causa della sua scarsa biodisponibilità orale e per la sua breve emivita plasmatica, la DFO viene impiegata solo per via parenterale. Il regime terapeutico principalmente adottato consiste in un'infusione lenta (8/12 h) subcutanea di 40 mg/kg/giorno per 5-7 giorni/settimana, con una scarsa tendenza del paziente ad aderire alla terapia. Le infusioni di DFO sono fastidiose, lunghe e dolorose e provocano spesso un peggioramento della qualità di vita dei soggetti trattati [Meyler's Side Effects of Drugs, 2006;Poggiali *et al.*, 2012]. La rapida iniezione endovenosa, d'altronde, può essere causa di eventi avversi quali vampate di calore, ponfi, tachicardia, ipotensione, sofferenza respiratoria acuta nell'aduto, insufficienza renale, *shock* e convulsioni [Meyler's Side Effects of Drugs, 2006].

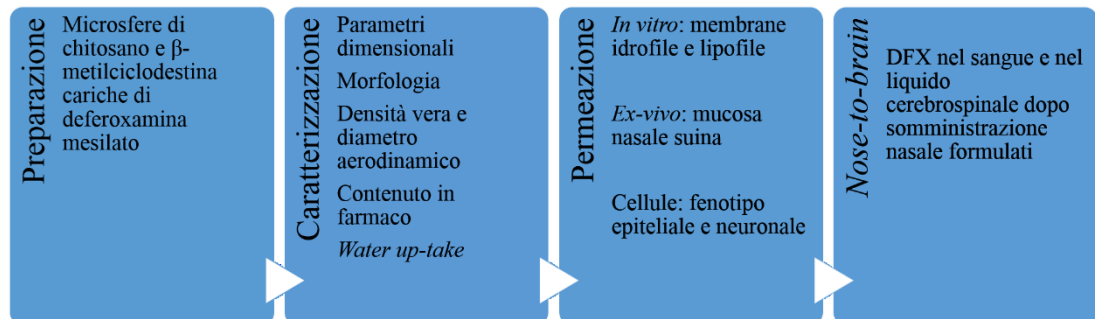
Sono in continuo aumento i dati a supporto dell'utilizzo della DFO in altre patologie dovute ad un sovraccarico di ferro. Nello specifico, il *targeting* diretto della DFO al cervello potrebbe essere vantaggioso nella terapia di alcune disfunzioni del sistema nervoso centrale (SNC) in cui si osserva uno squilibrio del metallo. I dati ottenuti da studi effettuati su animali e sull'uomo hanno mostrato come la DFO sia capace di molteplici azioni neuro-protettive e come possa essere di aiuto nella terapia del morbo di Huntington [Dexter *et al.*, 1991;Rosas *et al.*, 2012;Chen *et al.*, 2013], di Alzheimer [Rival *et al.*, 2009;Fine *et al.*, 2012;Guo *et al.*, 2013a,b], di Parkinson [Kaur *et al.*, 2003;Mastroberardino *et al.*, 2009;Febbraro *et al.*, 2013;Fine *et al.*, 2014], di Lou Gehrig [Jeong *et al.*, 2009], nelle malattie da prioni [Singh *et al.*, 2009], nella neuroferritinopatia [Curtis *et al.*, 2001], nella aceruloplasminemia [Miyajima, 2001], nell'emorragia intracerebrale [Hua *et al.*, 2008;Selim *et al.*, 2011], nell'ictus ischemico [Selim and Ratan, 2004;Hanson *et al.*, 2009], nell'idrocefalo cronico post-emorragico [Meng *et al.*, 2014] nella sclerosi multipla [Weigel *et al.*, 2014] e nelle lesioni al midollo spinale [Dinc *et al.*, 2013].

Queste ricerche hanno, di fatto, dimostrato il potenziale della DFO per il trattamento di patologie a carico del SNC, tuttavia la maggior parte è ricorsa ad una somministrazione sistemica od intracraniale del farmaco nei modelli animali adoperati, somministrazioni che, nel caso specifico, non sono invece adatte in campo umano [Fine *et al.*, 2014]. Per di più, i dati raccolti a riguardo della capacità della DFO di superare la barriera emato-encefalica (BEE) sono stati contrastanti. Alcune indagini hanno documentato un rapido passaggio della DFO attraverso la BEE ed un suo accumulo in concentrazioni significative nel tessuto cerebrale, previa somministrazione sistemica [Palmer *et al.*, 1994; Hua *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013]. Al contrario, altri autori hanno affermato come la BEE sia stata relativamente impermeabile alla DFO [Shachar *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2013; Weigel *et al.*, 2014].

Molti agenti terapeutici, la DFO inclusa, hanno mostrato un rapido trasporto verso il SNC dopo somministrazione nasale, con un mantenimento delle loro azioni farmacologiche sia a livello animale che umano [Fine *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2013; Hanson *et al.*, 2009, 2012; Reger *et al.*, 2008]. I vantaggi di una somministrazione nasale della DFO includono il *targeting* cerebrale, la non-invasività del metodo combinata a rapidità e capacità di eludere la BEE e la riduzione dell'esposizione sistemica del farmaco con gli effetti indesiderati legati. Rispetto alla somministrazione endovenosa, quella nasale si è dimostrata capace di un *targeting* mirato di 271 volte maggiore verso la corteccia frontale [Hanson *et al.*, 2009]. In questo studio, la DFO mesilato è stata somministrata per via nasale in forma di soluzione salina o in soluzione con tampone fosfato. Tale approccio, però, non prende in considerazione vari fattori limitanti l'assorbimento nasale del farmaco, come: *i*) bassa permeabilità di membrana, specialmente per grosse molecole e farmaci polari; *ii*) rapida rimozione dalla cavità nasale della formulazione contenente il farmaco, in seguito ai meccanismi di *clearance* mucociliare [Illum, 2002]. È possibile ottenere un buon incremento dell'assorbimento nasale di farmaci polari mediante loro somministrazione in idonei sistemi di veicolazione ed in particolare in formulazioni solide. Le medicazioni in polvere hanno il privilegio, rispetto a quelle liquide, di possedere migliore stabilità e non richiedere l'aggiunta di conservanti. Le polveri hanno tendenza ad aderire alla superficie umida della mucosa nasale prima di venire disciolte e rimosse dal sito [Vidgren and Kublik, 1998].

Considerando gli aspetti di cui sopra menzionati, l'obiettivo del lavoro è stato quello di formulare sistemi di veicolazione capaci di aumentare il trasporto cerebrale della deferoxamina mesilato mediante somministrazione nasale. È stato preso in esame l'effetto di due differenti promotori dell'assorbimento (*penetration enhancer*), la metil- β -ciclodestrina ed il chitosano. Numerosi studi hanno dimostrato e validato l'efficienza delle ciclodestrine (CD) come *penetration enhancer* quando impiegati nei sistemi per la veicolazione nasale di

farmaci [Merkus *et al.*, 1999; Van den Berg *et al.*, 2004]. Nel caso dei farmaci idrosolubili, le CD aumentano l'assorbimento e/o la biodisponibilità di un farmaco grazie alla capacità di formare complessi di inclusione con specifici lipidi di membrana, come il colesterolo, la fosfatidilcolina e la sfingomieline, che sono causa di perturbazioni del doppio stato lipidico e dell'aumento della fluidità di membrana [Challa *et al.*, 2005]. Il chitosano ha l'effetto aggiuntivo di aprire reversibilmente le giunzioni serrate delle cellule portando ad una maggiore probabilità di trasporto extracellulare verso il SNC passando lungo il nervo olfattivo ed il trigemino [Dhuria *et al.*, 2010]. Il chitosano, inoltre, forma delle interazioni elettrostatiche con le superfici cariche negativamente delle cellule epiteliali che riducono l'allontanamento dall'epitelio nasale. Questo polimero biodegradabile assorbe acqua dallo strato mucoso della cavità nasale, rigonfia e forma un film sottile simile ad un gel che prolunga il tempo di residenza di un farmaco al sito di assorbimento e ne migliora così la sua biodisponibilità [Sinha *et al.*, 2004].



Schema illustrante le principali fasi del lavoro.

Metodi

Materiali

La deferoxamina mesilato (DFO) (aprox. 95% TLC) ed il 2-propanolo sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Il chitosano cloridrato (CH), Protasan UP CL 113 (PM: 160000 g/mol; grado di deacetilazione: 86%) è stato acquistato da NovaMatrix/FMC Biopolymer (Sandvika, Norvegia). La metil- β -ciclodestrina (MCD), Cavasol[®] W7 M Pharma (PM: 1300 g/mol; sostituzione molecolare: 1,7) è stata acquistata da Wacker-Chemie GmbH, (München, Germania). Il feniltrimeticone, Dow Corning 556 cosmetic grade fluid, è stato ottenuto da Dow Corning (Brussels, Belgio). L'acqua ultrapura è stata ottenuta da un sistema di filtrazione Millipore (Billerica, MA, USA). Tutti i solventi impiegati sono stati di grado analitico. I ratti maschio Sprague–Dawley sono stati acquistati da Harlan Italy S.r.l., Udine, Italia.

Preparazione delle microsfere

Sono state preparate due differenti formulazioni: una contenente CH (**DCH**) ed un'altra con MC (**MCD**). Lo strumento usato è stato il Buchi Mini Spray Dryer B-191. Una quantità esattamente pesata di CH o di MC è stata solubilizzata in acqua MilliQ; la DFO è stata addizionata dopo completa solubilizzazione del polimero. Nella soluzione da nebulizzare così ottenuta la quantità di solido totale (DFO e polimero) in soluzione è stata pari a 1% (p/v) con un rapporto farmaco/polimero di 1:2 (p/p). La soluzione è stata aspirata da una pompa peristaltica, impostata a 8%, ed atomizzata all'interno della camera di nebulizzazione mediante un ugello di 0,7 mm. All'interno della camera, un flusso d'aria calda (100°C) ha portato ad una rapida evaporazione del solvente e, di conseguenza, alla formazione di microparticelle solide all'interno di un ciclone ad elevate prestazioni. Al termine del processo, le particelle solide sono state raccolte e poste in un essiccatore sino al momento del loro utilizzo. È stata calcolata la resa di produzione.

In modo da verificare le diverse proprietà e comportamento tra le microsfere e le semplici miscele dei componenti, le soluzioni di nebulizzazione sono state soggette anche ad essiccamento per liofilizzazione per circa 8 h tramite l'apparecchio Lio 5P Cinquepascale (Trezzano sul Naviglio, Italia). Queste formulazioni sono state denominate **DCHL** e **MCDL**. È stata liofilizzata anche la DFO e denominata **DFOL**.

Per avere un confronto, sono state preparate anche le formulazioni prive di farmaco e denominate **CH** e **MC**.

Valutazione del contenuto in farmaco e dell'efficienza di incapsulazione

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

Il contenuto in farmaco, che corrisponde alla reale quantità di farmaco caricato nelle microsfe, è stato determinato solubilizzando 10 mg di ciascuna formulazione in 10 mL di acqua MilliQ e quindi addizionando tampone fosfato a pH 6,5 sino al volume finale di 100 mL. Di questa soluzione è stata prelevata un'aliquota (1 mL) ed analizzata mediante HPLC, con il metodo riportato di seguito. Il risultato ottenuto è stato dato dalla media di tre diverse determinazioni ($n=3 \pm$ deviazione standard, DS).

Analisi HPLC della deferoxamina mesilato

Per la quantificazione della DFO nei campioni di tampone, è stato impiegato il sistema HPLC Varian ProStar 210 con autocampionatore Varian 410 ed equipaggiato di detector a fotodiodi DAD Varian 330 (Varian Inc Scientific Instruments, Walnut Creek, CA USA). La separazione cromatografica è stata condotta impiegando una colonna C18 con *endcapping* polare (Phenomenex Synergi Hydro-RP 80A, $150 \times 4,6$ mm I.D. e $4\mu\text{m}$ di dimensione particellare). Le analisi HPLC sono state eseguite a temperatura ambiente con velocità di 1,2 mL/min, UV a 210 nm. La fase mobile binaria si è composta da acetonitrile (pH 4,6 con 0,5 M H_3PO_4) e 0,1 M KH_2PO_4 (3,4 g/250 mL), 120 mg/L (30 mg/250 mL) soluzione di 1-eptano con solfato di sodio 17:83 (v/v) aggiustata ad un pH di 4,60 con acido fosforico 0,5 M. Tutti i dati sono stati acquisiti in triplicato e processati mediante Varian Star Chromatography Workstation, system control, version 6.20 (Varian, Inc. Cary, NC, USA). Le concentrazioni dell'analita sono state calcolate tramite interpolazione dalle curve di calibrazione.

Analisi dimensionale delle particelle

La determinazione dimensionale di ciascuna formulazione preparata è stata condotta mediante diffrazione laser (Coulter LS 100Q Laser sizer, Beckman Coulter, Miami, USA). Il mezzo fluido di dispersione della formulazione **DCH** è stato il 2-propanolo ed il Dow Corning per le formulazioni **MCD** e **MCDL**. Le microsfe (2 mg) sono state disperse nel mezzo, sonicate per 30 s ed analizzate sotto costante agitazione magnetica. Sono state allestite tre dispersioni per ciascun formulato ed i valori indicati sono stati ottenuti dalla media delle tre determinazioni di ciascuna dispersione. Il diametro medio particellare delle microsfe è stato riferito al diametro medio volume-superficie, d_{vs} (μm) e la distribuzione dimensionale particellare è stata rappresentata graficamente mediante curve di distribuzione riportanti la percentuale in volume delle particelle *versus* le dimensioni (μm), espresse in scala logaritmica. È stato inoltre calcolato il coefficiente di uniformità (CU) applicando la seguente formula: $\text{CU} = d_{10}/d_{90}$. Il valore di d_{10} e d_{90} indica rispettivamente che il 10% ed

il 90% delle particelle del campione hanno un diametro inferiore al numero indicato. Più il CU è vicino ad 1, più stretta è la curva e più è uniforme il campione.

Analisi morfologiche

La morfologia delle particelle è stata studiata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). Una piccola quantità della polvere è stata distribuita su uno *stub* di alluminio, rivestita con oro e collocata nella camera del SEM (Zeiss EVO LS10, Zeiss, Germania). Sono state acquisite le fotografie.

Water up-take

Utilizzando un apparato di Elsin modificato, è stata misurata la capacità delle formulazioni di assorbire acqua in seguito al contatto con un fluido acquoso. Un campione di ciascuna formulazione (2 mg) è stato uniformemente disperso in un disco di carta da filtro ($d = 1\text{ cm}$, $A = 0,78\text{ cm}^2$), saturato con tampone fosfato a pH 6,5 e quindi sistemato in un setto poroso. È stato misurato il volume di tampone assorbito dalla formulazione sotto esame nell'arco di tempo di 60 min. Il risultato ottenuto è stato la media di tre diverse determinazioni ($n=3$; $\pm\text{DS}$).

Densità vera e diametro aerodinamico

La densità vera delle microsfele caricate è stata misurata a 21°C con un picnometro ad elio (Micromeritics Accupyc II 1340 Analysis system, Peschiera Borromeo, Italia). Una nota massa di particelle è stata trasferita nella cella dello strumento ($1,03\text{ cm}^3$ volume). La densità (ρ) della polvere è stata accertata in triplicato per ciascun campione e calcolata come: $\rho = M/V$, in cui M è la massa di ciascun campione di microsfele e V è il volume medio occupato dalla polvere, calcolato da 5 cicli di svuotamento e riempimento con elio.

È stato determinato inoltre il diametro aerodinamico. Ammettendo una forma sferica delle particelle, la relazione tra aerodinamico mediano di massa (d_{ae}), ed il diametro geometrico, (d_g), è dato da $d_{ae} = d_g \sqrt{\rho}$, con ρ esprime la densità reale delle particelle.

Caratterizzazione dello stato solido

Il farmaco, il polimero e le formulazioni sono state caratterizzate mediante diffrazione a raggi X (XRD). Le analisi XRD sono state condotte con un diffrattometro Siemens D5000 equipaggiato con un tubo al rame e monocromatore in grafite su fascio diffratto. I parametri di acquisizione sono stati 40 kV, 30 mA, 2θ range $2-50^\circ$, step size 0.020° (2θ), time per step 2 s; tutti i campioni sono stati analizzati a temperatura ambiente.

Test di permeazione *in vitro*

I test sono stati condotti utilizzando celle di Franz modificate [Gavini *et al.*, 2011]. Per riprodurre uno strato idrofilo, sono state impiegate delle membrane di cellulosa acetato con pori di 0,45 μm , mentre per riprodurre uno strato lipofilo, sono state impiegate delle membrane di cellulosa rigenerata con pori di 0,45 μm , saturate con ottanolo. Al di sopra di ciascuna membrana, è stata distribuita uniformemente una quantità di microsferine equivalente a circa 2,5 mg di DFO. In seguito, 1 mL di fluido accettore è stato prelevato ad intervalli di tempo prestabiliti (0-120 min) ed analizzato mediante HPLC. Il volume rimosso è stato ripristinato con tampone fresco termostato a $37\pm 0,5^\circ\text{C}$. I risultati sono stati ottenuti da 3 determinazioni ed espressi come quantità cumulativa di DFO permeata nell'unità di tempo ($n=3 \pm \text{DS}$).

Il coefficiente di permeazione effettiva, P_{eff} , attraverso le membrane sintetiche in condizioni di stato stazionario è stato espresso matematicamente come: $P_{\text{eff}} = (dc/dt)_{\text{ss}} V / (ACD)$, dove $(dc/dt)_{\text{ss}}$ è il cambiamento tempo-dipendente dello stato stazionario. A è l'area di permeazione, V il volume del compartimento accettore e CD è la concentrazione iniziale di DFO nel compartimento donatore [Gavini *et al.*, 2008].

Il *Transport Enhancement Ratio* (TER) della formulazione rispetto al farmaco, è stato calcolato dai valori di P_{eff} : $\text{TER} = P_{\text{eff}}(\text{formulazione}) / P_{\text{eff}}(\text{farmaco})$.

Studi di permeazione *ex-vivo*

In questo test è stata adottata la stessa procedura impiegata nella permeazione *in vitro* sostituendo le membrane di cellulosa con frammenti di mucosa nasale di maiale. Questa è stata procurata da mattatoi locali [Gavini *et al.*, 2013]. Come mezzo accettore è stato adoperato tampone fosfato a pH 6,5. Ad intervalli di tempo prefissati, sono stati prelevati i campioni (1 mL) dal liquido accettore ed il volume rimosso è stato rimpiazzato con tampone fresco termostato alla temperatura di $37\pm 5^\circ\text{C}$. Prima dell'analisi all'HPLC, i campioni sono stati filtrati su filtri di cellulosa acetato con porosità di 0,45 μm . I risultati sono stati ottenuti da 3 determinazioni ed espressi come quantità cumulativa di DFO permeata nell'unità di tempo ($n=3 \pm \text{DS}$).

Il coefficiente di permeazione effettiva, nelle condizioni di stato stazionario attraverso la mucosa nasale, ed il TEM sono stati calcolati come descritto in precedenza.

Studi di *up-take* cellulare

Lo studio è stato volto alla determinazione dell'*up-take* cellulare della DFO rilasciata dalle microsfere da parte delle cellule Caco-2 e delle PC-12, scelte come modelli *in vitro* rispettivamente di un fenotipo simil epiteliale e neuronale.

Le cellule Caco-2 (adenocarcinoma coloretale umano) sono state coltivate in fiasche utilizzando del Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) addizionato di 1% (v/v) MEM amminoacidi non essenziali (Invitrogen), 10% (v/v) di siero fetale bovino (not of USA origin, Sigma-Aldrich), 1% (v/v) di una soluzione penicillina-streptomicina (Lonza) e lasciate crescere in atmosfera umidificata contenente 5% CO₂ a 37°C. Le cellule sono state divise al raggiungimento dell'80% di confluenza. Le cellule PC-12 (feocromocitoma di ratto, ECACC) sono state coltivate in fiasche in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) supplementato con 10% (v/v) di siero di cavallo, 5% (v/v) di siero fetale bovino (not of USA origin, Sigma-Aldrich) e L-glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich) e lasciate crescere in atmosfera umidificata contenente 5% CO₂ a 37°C. Per la differenziazione neuronale di questa linea cellulare, le cellule sono state sospese nel mezzo di differenziazione consistente di RPMI 1640 supplementato con 1% di siero di cavallo e 100 ng/mL di fattore di crescita nervoso (NGF) (Sigma-Aldrich). Il mezzo è stato rinnovato ogni 2-3 giorni. Come modello neuronale per gli studi di permeazione *in vitro*, sono state adoperate le cellule PC-12 dopo un periodo di differenziazione di 6 giorni.

Per gli studi di permeazione, le cellule Caco-2 sono state rimosse dalle fiasche con tripsina-EDTA (BiocromAG) e coltivate in inserti Transwell di PET (12 pozzetti, 0,4 µm diametro pori, Corning, USA) alla concentrazione di 1×10^5 cellule/membrana (passaggio: N° 50). Le cellule PC-12, precedentemente cresciute in sospensione, sono state coltivate in inserti Transwell-COL di PTFE (12 pozzetti, 0,4 µm diametro pori, rivestite di collagene, Corning, USA) alla concentrazione di 3×10^4 cellule/membrana (passaggio: N° 5). Gli inserti rivestiti con collagene hanno permesso una crescita delle cellule in adesione. Al compartimento basolaterale ed a quello apicale sono stati addizionati rispettivamente 1,5 mL e 0,5 mL di mezzo di coltura. Entrambe le linee cellulari sono state fatte crescere sino alla formazione di un monostrato cellulare e quindi utilizzate negli esperimenti di permeazione del farmaco. A tal fine, i monostrati sono stati dapprima lavati (2 volte) con PBS (37°C) ed addizionati al compartimento basolaterale ed apicale rispettivamente di 1,5 mL e 0,35 mL di DMEM (Caco-2) o RPMI-1640 (PC-12).

Le microsfere contenenti 2,6 mg di deferoxamina mesilato e la medesima quantità di farmaco non formulato, sono state sospese uniformemente (campioni) o solubilizzate (farmaco) in 0,15 mL di mezzo e quindi addizionate al compartimento apicale. Le cellule sono state incubate in atmosfera umidificata contenente il 5% CO₂ a 37°C. Ad intervalli di

tempo predeterminati (7,5; 15; 30; 45; 60 min), è stata prelevata un'aliquota (20 µL) dal compartimento basolaterale ed un egual volume di mezzo fresco termostato a 37°C è stato addizionato al lato basolaterale in modo da mantenere i volumi invariati. Per verificare l'integrità del monostrato cellulare, prima e durante gli esperimenti, è stata misurata la resistenza elettrica transepiteliale (TEER). Tutti i test sono stati condotti in duplicato. È stata inoltre valutata la concentrazione apicale di farmaco nei 7,5 min e nei 60 min. I campioni contenenti deferoxamina mesilato sono stati quantificati mediante HPLC.

Analisi per cromatografia liquida con spettrometro di massa (LC-MS)

Le analisi LC-MS sono state utilizzate negli studi di farmacocinetica *in vivo* e sono state effettuate per mezzo di un sistema HPLC micro modello Surveyor (Thermo Scientific) interfacciato con uno spettrometro di massa LTQ XL Linear Ion trap MS (Thermo Scientific). Le condizioni cromatografiche sono state applicate ad una colonna Luna HST C18 100 x 2,1 mm (Phenomenex) impaccata con particelle di 2,5 µm. Le fasi mobili adoperate sono state miscele di acido formico 0,1% (v/v) in acqua (solvente A) ed acido formico 0,1% (v/v) in metanolo (solvente B): il profilo del gradiente è stato da 50/50 acqua/metanolo a 10/90 in 5 min, con successivo andamento isocratico per 3 min. Il flusso impiegato è stato di 150 µL/min e la colonna è stata termostata a 25°C.

Le seguenti condizioni MS sono state applicate ad una sorgente ionica electrospray (ESI): temperatura capillare 275°C; voltaggio di spray 4 kV; voltaggio capillare 50 V; voltaggio lenti tubo 100 V. Gli ioni molecolari della deferoxamina, aluminossiamina e ferriossiamina sono stati rinvenuti rispettivamente a 561,4; 585,3 e 614,3 m/z. Lo standard interno CPA è stato rinvenuto a 336 m/z. Tutti gli ioni si presentavano nella forma $[M+H]^+$.

Gli analiti target del campione sono stati la deferoxamina (DFO), l'alluminossamina (AO) e la ferrossamina (FO) e la somma di queste tre forme è stata considerata come la quantità totale. La determinazione quantitativa è stata condotta usando lo standard interno N⁶-ciclopentiladenosina (CPA) per la calibrazione. La DFO, la AO e la FO sono state co-eluite dalla colonna cromatografica con un tempo di ritenzione di 4,5 min, mentre per il CPA il tempo di ritenzione è stato di 6 min. L'intervallo di calibrazione è stato di 0,05-50 µM sia per le determinazioni in plasma che per i campioni di fluido cerebrospinale (LCS). Per la simulazione di LCS, sono state impiegate aliquote standard di una soluzione bilanciata (PBS Dulbecco privo di calcio e magnesio) in presenza di 0,45 mg/mL di BSA [Felgenhauer, 1974; Madu *et al.*, 1994]. In entrambi i casi, i dati di calibrazione sono stati riportati su una retta con R² di 0,9910 e 0,9929 rispettivamente per il plasma e per il liquor (P<0,001). Il limite di detenzione (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati stimati con un livello di

confidenza del 95% mediante il metodo Huabaux e Vos. La calibrazione nella matrice plasmatica è stata caratterizzata da LOD = 0,15 μM (0,08 $\mu\text{g/mL}$) e LOQ = 0,5 μM (0,28 $\mu\text{g/mL}$), mentre nel liquor da LOD = 0,24 μM (0,13 $\mu\text{g/mL}$) e LOQ = 0,8 μM (0,45 $\mu\text{g/mL}$). In seguito alla procedura di estrazione si è avuto un recupero medio della deferoxamina totale del 85%. Il recupero del CPA era stato già testato in precedenza [Dalpiaz *et al.*, 2012].

Somministrazione *in vivo* della deferoxamina e quantificazione

Ratti maschio Wistar (200-250 g), anestetizzati durante la procedura sperimentale, hanno ricevuto un'infusione endovenosa di 0,2 mg/mL di deferoxamina solubilizzata in un mezzo costituito da 20% (v/v) di DMSO e 80% (v/v) di soluzione fisiologica, ad una velocità di 0,2 mL/min per 5 min. Al termine dell'infusione e ad intervalli di tempo definiti, sono stati prelevati campioni di sangue (300 μL) e di LCS (50 μL) mediante metodo di puntura cisternale descritto da Van den Berg *et al.* (2002) sfruttando un apparato stereotassico.

La procedura ha portato alla raccolta di una serie (40-50 μL) di campioni di LCS virtualmente privi di sangue. Un volume totale di 150 μL di LCS è stato raccolto durante la procedura sperimentale. Considerando che il volume totale di LCS in un ratto adulto va dai 300 μL ai 400 μL [Meek and Neff, 1973; Davson *et al.*, 1987], 50 μL di LCS dovrebbero rappresentare il 12% del volume totale originale. Sono stati impiegati 4 ratti nelle infusioni endovenose femorali. I campioni di LCS (10 μL) sono stati subito iniettati nel sistema di HPLC per l'analisi LC-MS.

I campioni di sangue sono stati emolizzati immediatamente dopo la loro raccolta con 500 μL di acqua ghiacciata, quindi addizionati di 50 μL di acido sulfosalicilico 10% e 100 μL dello standard interno (30 μM 7n-PX). I campioni sono stati estratti due volte con 1 mL di acqua satura di acetato di etile e, dopo centrifugazione, la fase organica è stata ridotta alla secchezza sotto flusso di azoto. Sono stati addizionati 200 μL di una miscela acqua-metanolo (70:30 v/v) e, dopo centrifugazione, 10 μL sono stati iniettati nel sistema HPLC per l'analisi LC-MS.

I campioni di sangue sono stati centrifugati a 4000 x g per 15 min, quindi 100 μL di plasma sono stati immediatamente raffreddati in 300 μL di etanolo (4°C); sono stati quindi addizionati 100 μL dello standard interno (1 μM CPA). Dopo centrifugazione a 13000 x g per 10 min, le aliquote di 300 μL sono state ridotte a secchezza sotto flusso di azoto, ridissolte in 200 μL di fase mobile e, dopo filtrazione, 10 μL sono stati iniettati nel sistema HPLC per l'analisi LC-MS.

In vivo, l'emivita plasmatica della deferoxamina è stata calcolata mediante regressione non lineare (decadimento esponenziale) dei valori di concentrazione ottenuti nelle 2 h dopo

l'infusione e confermati da una regressione lineare dei valori di concentrazione logaritmica in funzione del tempo.

La somministrazione nasale della deferoxamina è stata condotta in ratti anestetizzati appoggiati sulla schiena, seguendo due procedure. La prima è consistita nell'introdurre 40 μL di una soluzione acquosa di deferoxamina (5 mg/mL) in una narice dei ratti mediante una pipetta semiautomatica attaccata ad un corto tubo di polietilene. Questo è stato inserito nella narice per circa 0,6-0,7 cm. Dopo la somministrazione, a definiti intervalli di tempo, sono stati prelevati 300 μL di sangue e 50 μL di LCS e quindi analizzati con la procedura descritta in precedenza. Sono stati adoperati 4 ratti per la somministrazione nasale della soluzione di deferoxamina.

La seconda procedura ha visto l'insufflazione delle microparticelle caricate con DFO (**DCH** e **MCD**) in una narice dei ratti anestetizzati impiegando insufflatori monodose Monopowder P[®] (Valois Dispray SA, Mezzovico, Svizzera). I dispositivi consistevano di una pompa, di un adattatore nasale e di un reservoir per la formulazione solida. Gli insufflatori sono stati caricati con 0,7 mg delle microparticelle contenenti DFO (corrispondente a 200 μg di DFO), ed i ratti hanno ricevuto questa quantità in una narice. La quantità di polvere emessa durante la somministrazione è stata calcolata dal peso dell'insufflatore prima e dopo l'insufflazione. Dopo la somministrazione, a definiti intervalli di tempo, sono stati prelevati campioni di sangue (300 μL) e di LCS (50 μL) e quindi analizzati con la procedura descritta in precedenza. Sono stati adoperati 4 ratti per la somministrazione nasale di ciascun tipo delle polveri microparticellari.

Tutti gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti in accordo con le linee guida dettate dal Ministero Italiano della Salute (D.L. 116/92 e D.L. 111/94-B), la Dichiarazione di Helsinki e le linee Guida per la Cura ed Uso degli Animali da Laboratorio adottate e promulgate dall'Istituto Nazionale di Salute (Bethesda, Maryland). Il protocollo per tutti gli esperimenti *in vivo* è stato approvato dal Comitato Etico Locale (Università di Ferrara, Italia). Sono stati fatti tutti gli sforzi per ridurre al minimo il numero di animali da impiegare e la loro sofferenza.

L'area sotto la curva di concentrazione della DFO nel sangue e nel LCS (AUC, $\mu\text{g mL}^{-1}$ min) è stata calcolata con metodo integrazione trapezoidale. Tutti i calcoli sono stati effettuati mediante il programma Graph Pad Prism (GraphPad Software Incorporated, La Jolla, CA, USA).

Analisi statistica

Tesi di Dottorato di Elena Soddu
“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”
Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Sassari

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata mediante il test nonparametrico Kruskal–Wallis e le differenze individuali valutate mediante il post hoc Dunn's multiple comparison test (GraphPad Prism, version 6.02; GraphPad Software Incorporated). Quando opportuno, le analisi della varianza (ANOVA) sono state condotte con il test Tukey.

Risultati

Valutazione della resa di produzione, del contenuto in farmaco e dell'efficienza di incapsulazione

Le microsfele sono state preparate mediante *spray drying* con una resa di produzione superiore al 50%. Come invece atteso, la resa di produzione mediante liofilizzazione è stata significativamente più elevata ([Tab. 1](#)). Il contenuto reale in farmaco si è avvicinato ai valori teorici e l'efficienza di incapsulazione è stata tra il 93 ed il 98% rispetto alla quantità in peso della DFO impiegata nella preparazione delle formulazioni ([Tab. 1](#)). Questi parametri non sono stati influenzati dal tipo di eccipiente adoperato e dal metodo preparativo ($p > 0,05$).

Analisi dimensionale

Le microparticelle di ciclodestrina si sono caratterizzate da un maggiore diametro volume-superficie (d_{vs}) rispetto alle corrispondenti particelle con chitosano ($p < 0,01$). Al contrario, non sono state osservate differenze significative tra le microparticelle con o prive di farmaco ($p > 0,05$) ([Tab. 2](#)). Le curve di distribuzione delle microsfele caricate con il farmaco sono state quasi sovrapponibili a quelle date dalle formulazioni prive di farmaco ([Fig. 1](#)). Tutte le formulazioni hanno mostrato ampia distribuzione dimensionale, come indicato dal coefficiente di uniformità (CU), con un andamento decrescente nell'ordine **DCH > CH > MCD > MC** ($p < 0,05$).

Analisi morfologica

Le microsfele di chitosano e ciclodestrina hanno presentato una differente morfologia: le **DCH** una superficie liscia ed una forma sferica ([Fig. 2a](#)) mentre le particelle **MCD** una superficie ricca di invaginazioni ([Fig. 2b](#)). Non sono state osservate variazioni morfologiche tra le microsfele con o prive di farmaco.

Le immagini al SEM hanno svelato una morfologia nettamente diversa per le formulazioni liofilizzate rispetto alle corrispondenti microsfele. In **DCHL** la superficie è apparsa come sgretolata/sbriciolata simile a foglie secche ([Fig. 2c](#)). In **MCDL** si è notata minore omogeneità, con particelle di varia dimensione, superfici incurvate e lisce, spesso emisferiche ([Fig. 2d](#)). Anche per il farmaco libero è stata osservata una differente morfologia

dopo liofilizzazione; la DFO nella forma in cui è stata acquistata, ha mostrato presenza di aggregati con superficie irregolare, eterogenei in forma e dimensione (Fig. 2e), mentre il farmaco liofilizzato forma drappi con superfici più lisce, con filamenti sui bordi (Fig. 2f).

Water up-take

Il test è stato condotto considerando i μL di acqua assorbita per mg di formulazione in funzione del tempo (Fig. 3). Le formulazioni contenenti ciclodestrina hanno assorbito una quantità ridotta di acqua e si sono rapidamente solubilizzate. Le formulazioni con chitosano, invece, hanno assorbito elevate quantità di acqua ($p < 0,01$), indipendentemente dal metodo preparativo (Fig. 3).

Densità vera e diametro aerodinamico

Tutte le microsfele hanno dato valori simili di densità assoluta ($1,414 \pm 0,003$, **DCH**; $1,414 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$, **MCD**) ($p > 0,05$), che non differiscono rispetto a quelli del farmaco nella forma in cui è stato acquistato ($1,371 \pm 0,001 \text{ g/cm}^3$) ($p > 0,05$). Il processo di liofilizzazione ha condotto ad un significativo incremento della densità di **DFOL** ($2,196 \pm 0,058 \text{ g/cm}^3$) e di **DCHL** ($1,663 \pm 0,045 \text{ g/cm}^3$) e ad una riduzione nel caso di **MCDL** ($1,355 \pm 0,005 \text{ g/cm}^3$) in confronto ai valori dati dalle formulazioni *spray dried* ($p < 0,05$).

Dai valori di densità e di d_g delle microsfele è stato calcolato il diametro aerodinamico (d_{ae}). Poiché i valori di ρ e di d_g sono stati simili, il d_{ae} delle microsfele caricate con il farmaco non ha mostrato un significativo cambiamento, con valori di $1,10 \mu\text{m}$ (**MCD**) e $1,16 \mu\text{m}$ (**DCH**) ($p > 0,05$).

Caratterizzazione dello stato solido

L'analisi XRD ha indicato una struttura cristallina del farmaco impiegato nell'esperimento (Fig. 4). Nello specifico, i picchi acuti (elevato rapporto segnale/rumore) hanno segnalato un elevato grado di cristallinità. D'altro canto, l'analisi dei campioni **MC** e **CH** ha indicato che questi polimeri si trovano essenzialmente in uno stato amorfo (Fig. 4). **MC** ha mostrato due principali ampie riflessioni di circa 11 e 18° di 2θ , mentre **CH** si è caratterizzato da due lievi gobbe di circa 12 e 24° di 2θ . **MCD**, la formulazione preparata con **MC** e **DFO**, ha presentato una struttura amorfa. I picchi della **DFO** sono stati assenti, per cui il suo pattern è stato sovrapponibile a quello di **MC** con eccezione riguardo all'intensità più debole della prima ampia riflessione (Fig. 4). Anche la formulazione **DCH** si è dimostrata essere amorfa. In questo caso, il suo pattern XRD è stato perfettamente sovrapponibile a quello di **CH**.

Il processo di liofilizzazione ha portato all'amorizzazione del farmaco puro (**DFOL**, [Fig. 4](#)) e non ha invece portato a significative variazioni del pattern XRD dei polimeri puri e delle formulazioni **MCDL** e **DCHL** confrontate con i loro corrispondenti formulati *spray dried* (pattern XRD non riportati).

Test di permeazione *in vitro*

La **DFO** nella forma in cui è stata acquistata ha mostrato di permeare più rapidamente nelle membrane idrofile rispetto a quelle saturate con ottanolo ($p < 0,01$) in un arco di tempo tra 15 e 20 min. Dopo liofilizzazione, non è stata osservata invece nessuna differenza di comportamento ($p > 0,05$) ([Fig. 5](#)).

L'incapsulazione nelle microsfeere ha influito sulla modalità di permeazione della **DFO**. Entrambi i materiali hanno significativamente ridotto la quantità cumulativa del farmaco passato attraverso le membrane idrofile ($p < 0,01$). Il chitosano ha controllato la permeazione del farmaco attraverso il supporto lipofilo, mentre la metil- β -ciclodestrina ne ha aumentato il grado ($p < 0,05$). Ciò è reso evidente dai P_{eff} in condizioni di stato stazionario ([Fig. 6](#)). Con **MCD** si è avuto un maggiore flusso attraverso le membrane lipofile, rispetto a quello dato da **DCH**, come spiegato dai valori di TER che sono stati rispettivamente di 1,63 e 0,12.

Le formulazioni liofilizzate non hanno mostrato differenti profili di permeazione in confronto a quelli dei loro corrispondenti preparati *spray dried* ($p > 0,05$), ma i profili di TER si sono spostati a 0,22 per **DCHL** e 1,27 per **MCDL** ($p < 0,05$), indicando che la CD si è rivelata la più adatta nel facilitare la permeazione della **DFO** attraverso le 2 membrane.

Il comportamento *in vitro* della **DFO** presente nelle microsfeere ha mostrato di dipendere dalla natura del *carrier*: il chitosano è stato in grado di controllare il grado di permeazione attraverso entrambe le membrane in un intervallo di tempo compreso nei 45 min, indipendentemente dal metodo preparativo e dal modello di membrana.

Le formulazioni basate sull'uso di ciclodestrina hanno mostrato dei profili di permeazione simili a quelli della **DFO**, indipendentemente dal metodo di preparazione e considerando l'impiego della membrana idrofila; comunque, la ciclodestrina ha aumentato la permeazione del farmaco attraverso la membrana lipofila, facendo ipotizzare che l'aumento della permeazione esercitato da questo materiale, potrebbe avvenire a livello dei neuroni della mucosa olfattiva, così come confermato dagli studi cellulari.

Permeazione del farmaco *ex-vivo*

La permeazione del farmaco ha avuto inizio dai 15 per **DFO**, dai 30 min per **MCD** e dai 60 min per **DCH**, il che è coerente con il comportamento in acqua dei *carrier* e con gli studi di

permeazione *in vitro* (Fig. 7). Successivamente, **MCD** e **DFO** hanno avuto lo stesso grado di permeazione ($p > 0,05$), più elevato rispetto a quello di **DCH**. Al termine del test, circa il 50% della quantità della **DFO**, nella forma in cui è stata acquistata e caricata nelle **MCD**, è stata ritrovata nel mezzo accettore, mentre è stato osservato il 30% con **DCH**, confermando quindi un effetto maggiore della ciclodestrina come *penetration enhancer*.

I P_{eff} nelle condizioni di stato stazionario sono stati di $3,28 \pm 0,20$ (**MCD**) e $1,67 \pm 0,16$ $\text{mg}/\text{cm}^2 \text{ min}$ (**DCH**) ($p < 0,01$).

Studi di *up-take* cellulare

Tutte le formulazioni hanno mostrato lo stesso profilo di permeazione attraverso le cellule epiteliali, sovrapponibile a quello del farmaco ($p > 0,05$) (Fig. 8). Al contrario, le **MCD** hanno permesso di attraversare le PC-12 a dispetto delle formulazioni **DCH** ($p < 0,05$), nell'arco di tempo tra 5 e 15 min. Il grado di permeazione è stato lo stesso sia per **MCD** o **DFO**, indipendentemente dal fenotipo cellulare ($p > 0,05$). In aggiunta, dopo 7,5 e 60 min è stata determinata la quantità di farmaco nel compartimento donatore (Fig. 9) e dalla differenza tra la quantità di **DFO** permeata e quella ritrovata a livello apicale, è stata calcolata la quantità di farmaco all'interno delle cellule. Le microsfele con chitosano hanno rapidamente rilasciato il 44% di farmaco, il quale è rimasto all'interno delle cellule e da qui ha poi diffuso lentamente; la quantità residua rimane nelle microsfele sino ai 60 min, indipendentemente dal modello cellulare. Al contrario, il farmaco rilasciato da **MCD** è rimasto per un tempo prolungato nel compartimento donatore e, dopo 7,5 min solo il 15% (**Caco-2**) ed il 30% (**PC-12**) si ritrova nelle cellule, mentre lo 0% dopo 60 min. La **DFO** nella forma in cui è stata acquistata ha mostrato lo stesso comportamento di **MCD**.

Somministrazione *in vivo* della deferoxamina

Le microparticelle di **DCH** e **MCD** sono state testate per somministrazione nasale in modo da verificare la capacità della **DFO** di raggiungere il SNC. La somministrazione nasale della deferoxamina è stata ugualmente eseguita, nella forma di soluzione acquosa, ed è stata presa come controllo. Dopo somministrazione, sono stati prelevati i campioni di sangue e del LCS in modo da analizzarne, mediante metodo HPLC-LC-MS, il quantitativo in **DFO** in funzione del tempo. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli dati dalla infusione endovenosa di **DFO** nei ratti.

Somministrazione endovenosa della deferoxamina

Le analisi ottenute dai campioni di sangue, previa infusione endovenosa della deferoxamina (0,2 mg), hanno indicato concentrazioni di farmaco ematiche pari a $6,40 \pm 0,38$ $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 10), con una diminuzione del tempo che ha seguito un'apparente cinetica di primo ordine confermata dalla linearità del tracciato semilogartmico riportato nel riquadro della Fig. 10 ($n = 6$, $r = 0,980$, $p < 0,01$), e con una emivita di $15,4 \pm 1,8$ min.

Non è stata ritrovata deferoxamina nel LCS dopo 120 min dalla somministrazione endovenosa del farmaco.

Somministrazione nasale della deferoxamina

La somministrazione nasale della deferoxamina pura nella forma di polvere non è stata condotta a causa della ridotta dose richiesta (circa 200 μg per ratto). Il controllo è stato quindi ottenuto mediante somministrazione di una soluzione acquosa del farmaco. Non sono state ritrovate quantità significative di deferoxamina nel sangue o nel LCS dopo 120 min dalla somministrazione (dati non riportati). Al contrario, la somministrazione nasale delle polveri (0,7 mg, con 200 μg circa di deferoxamina) rappresentate dalle microsfele **DCH** ed **MCD** ha portato a quantità rilevabili sia nel sangue che nel LCS dei ratti. In particolar modo, la Fig. 10 riporta le concentrazioni ritrovate nel sangue dei ratti in confronto a quelle ottenute dalla somministrazione endovenosa della stessa dose. In seguito alla somministrazione nasale, il picco di concentrazione plasmatica della deferoxamina è stato ritrovato ai 30 min, con valori appena al di sopra la LOD del metodo analitico ($0,19 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$ da **DCH** polvere; $0,36 \pm 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ da **MCD** polvere), indicando lo scarso passaggio del farmaco dal naso al torrente ematico. Nello specifico, il confronto tra i valori di AUC ottenuti dalla somministrazione endovenosa ($145,1 \pm 3,6$ $\mu\text{g mL}^{-1}$ min) e della somministrazione nasale ($8,92 \pm 1,11$ $\mu\text{g/ml}^{-1}$ min per **DCH** polvere; $14,89 \pm 2,05$ $\mu\text{g/ml}^{-1}$ min per **MCD** polvere) ha permesso di ottenere una biodisponibilità assoluta di 6,15% (polveri microparticelle chitosano) e 10,26% (polveri microparticelle con ciclodestrine).

Per contro sono state ritrovate importanti quantità di deferoxamina nel LCS dei ratti dopo somministrazione nasale delle microparticelle (Fig. 11). In particolare, i picchi di concentrazione del farmaco nel LCS ritrovati dopo 30 min sono stati di $3,83 \pm 0,68$ $\mu\text{g/mL}$ dalle polveri **DCH** e $14,37 \pm 1,69$ $\mu\text{g/mL}$ da quelle **MCD**. Le concentrazioni di farmaco sono lentamente diminuite dopo 60 min dalla somministrazione ($2,77 \pm 0,50$ $\mu\text{g/mL}$ per le polveri **DCH** e $11,68 \pm 11,43$ $\mu\text{g/mL}$ per le polveri **MCD**), quindi una drastica diminuzione dopo 90 min (Fig. 11).

Discussione

Il metodo di essiccamento di maggiore impiego da parte dell'industria farmaceutica è quello della liofilizzazione, tuttavia la tecnica dello *spray drying* potrebbe rappresentare un'alternativa tecnologica più avanzata a questa. Il processo dello *spray drying* offre l'opportunità di controllare le proprietà di una particella come cristallinità, dimensioni, contenuto in acqua residua, densità e morfologia [Walters *et al.*, 2014]. Nel presente lavoro sono state confrontate le proprietà particellari di formulati essiccati mediante liofilizzazione e *spray drying*, con lo scopo di evidenziare la migliore idoneità di quest'ultima tecnica nel caso dello sviluppo di formulati nasali. Di fatto, la liofilizzazione ha dimostrato di non essere idonea per tutte le combinazioni farmaco/polimero. In **DCHL** si è ottenuto un materiale con superfici accartocciate ed aventi morfologia simile a foglie secche, mentre **MCDL** si è caratterizzato da basse rese di produzione rispetto a **DCHL**, probabilmente a causa dell'aspirazione delle particelle solide più piccole da parte del sistema di vuoto del liofilizzatore. Con il metodo dello *spray drying* si sono ottenute particelle più piccole ed omogenee. Dimensioni, densità e morfologia sono tra i parametri influenzanti il comportamento aerodinamico delle particelle e quindi il loro depositarsi nei siti target [Inthavong *et al.*, 2009]. Le microsfele **MCD** e **DCH** hanno rivelato densità e dimensioni simili e quindi simili proprietà aerodinamiche, nonostante la differente morfologia. Inthavong *et al.* (2009) hanno dimostrato come particelle sferoidali con superfici rugose abbiano una minore capacità di deposito rispetto a particelle sferiche spiegando un possibile minor impatto delle particelle nella parte anteriore della cavità nasale (regione respiratoria). Sulla base di queste considerazioni e per i bassi valori di d_{ae} , le particelle prodotte hanno una maggiore possibilità di raggiungere la regione olfattiva localizzata nel tetto della cavità nasale. Dopo l'impatto inerziale, che è il meccanismo dominante per il depositarsi di particelle micrometriche [Inthavong *et al.*, 2009], in seguito al rapido assorbimento di acqua, le microsfele possono aderire o disciogliersi nel sito di deposito. Il meccanismo di deposito *in vivo*, viene ovviamente influenzato anche dal tipo di dispenser utilizzato nella somministrazione e dalle proprietà mucoadesive delle microparticelle. Entrambe le tecniche di essiccamento hanno condotto ad un'amorfizzazione della deferoxamina mesilato così come mostrato nei pattern XRD; a discapito della letteratura presente [Craig *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 2003], la maggiore mobilità molecolare di questa forma non ha comunque portato ad un aumento del grado di permeazione. Infatti, tra la DFO acquistata (cristallina) e quella liofilizzata (amorfa) non vi è stata differenza di comportamento nella permeazione *in vitro*. Questo è probabilmente riconducibile all'elevata solubilità del farmaco. Al contrario, la permeazione della DFO *in vitro* ed *in vivo* è influenzata dai

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

materiali utilizzati come *carrier* per i sistemi di veicolazione microparticellari. L'affinità delle microsfele di ciclodestrina **MCD** per un substrato lipofilo è stata inizialmente osservata negli studi di permeazione *in vitro* nei quali a differenza del chitosano, la ciclodestrina ha incrementato il flusso di farmaco attraverso le membrane stabilizzate con ottanolo. Questo è stato successivamente confermato dagli studi sulle colture cellulari in cui, dopo 60 min, dalle microsfele di chitosano è permeata circa il 20% di DFO e da quelle di ciclodestrina circa il 43%, considerando entrambi i modelli cellulari. Tuttavia i profili di permeazione sono stati diversi per le due tipologie di microsfele nei due tipi di colture cellulari: infatti **DCH** ha esibito un profilo di permeazione lento e controllato nel tempo sia nelle Caco-2 che nelle PC-12, mentre **MCD** ha condotto ad una rapida permeazione del farmaco nei modelli neuronali di PC-12 ed al contrario ad un lento e controllato passaggio nei modelli epiteliali di Caco-2.

Per lo studio della farmacocinetica della DFO, in questo lavoro è stato sviluppato un metodo di estrazione del farmaco dal plasma, adatto per le analisi LC-MS. Il farmaco somministrato in ratti per via endovenosa (200 µg) ha mostrato un'emivita plasmatica di $15,4 \pm 1,8$ min, valore simile a quello trovato in cani [Tesoro *et al.*, 1989], il che conferma una rapida eliminazione della DFO dal torrente circolatorio previa somministrazione endovenosa [Dragsten *et al.*, 2000; Hanson *et al.*, 2009], mentre non ne è stata rinvenuta traccia nel LCS nell'arco di tempo indagato. I risultati sembrano essere in accordo con la scarsa tendenza del farmaco a raggiungere il SNC passando per il sangue [Hanson *et al.*, 2009]. È stato invece riportato che la somministrazione nasale di soluzioni di DFO rappresenta un'alternativa non invasiva alle iniezioni sistemiche nel trattamento o prevenzione dell'ictus. Nello specifico, la somministrazione nasale di 6 mg di DFO a ratti, rispetto ad una somministrazione endovenosa in pari dose, ha dimostrato di portare ad un aumento significativo delle concentrazioni di farmaco nel cervello (di circa 2 ordini di grandezza) con una concomitante riduzione significativa dell'esposizione sistemica [Hanson *et al.*, 2009]. In studi precedenti è stato dimostrato che formulazioni solide microparticellari a base di sali di chitosano (glutammato o cloridrato) sono state capaci di aumentare sensibilmente il *targeting* cerebrale di farmaci neuro-attivi somministrati per via nasale, in confronto a loro soluzioni o sospensioni [Dalpiaz *et al.*, 2008; Gavini *et al.*, 2011; 2013]. Questi risultati sono stati attribuiti alla capacità dei formulati microparticellari solidi di garantire il diposarsi del farmaco nella regione olfattiva, di prolungarne il tempo di residenza, di aumentarne le concentrazioni locali ed incrementare temporaneamente la permeabilità della mucosa olfattiva grazie all'apertura delle giunzioni serrate da parte del chitosano [Lim *et al.*, 2002; Illum *et al.*, 2003]. Considerando questi aspetti, sono state preparate le formulazioni **DCH** per una somministrazione nasale della DFO. Di recente, le β -

ciclodestrine sono state identificate come *penetration enhancer* per il trasporto di farmaci per via transmurale [Bashara *et al.*, 2014;Gavini *et al.*, 2011] e la forma metilata si è mostrata un più efficace agente chelante del colesterolo rispetto alle β -ciclodestrine non metilate [Ziolkowski *et al.*, 2010]; perciò, sono state preparate le formulazioni **MCD** per la somministrazione nasale di DFO. La somministrazione nasale di soluzioni acquose di DFO (200 μ g) non ha consentito al farmaco di arrivare al sangue o al LCS dei ratti, come già in precedenza dimostrato impiegando sospensioni acquose di dosi simili di farmaci con bassa permeabilità [Dalpiaz *et al.*, 2008;Gavini *et al.*, 2011]. Le formulazioni liquide, infatti, possono venire rimosse velocemente dalla cavità nasale per mezzo della *clearance* mucociliare, il principale sistema di protezione del naso. Il movimento delle ciglia muove le sostanze assorbite o disciolte nel muco verso la nasofaringe per l'eliminazione nel tratto gastro-intestinale [Gizurarson *et al.*, 1993;Ugwoke *et al.*, 2001]. È di fatto risaputo che una formulazione liquida non adesiva somministrata per via nasale viene rimossa dalla *clearance* dopo circa 15-20 min, un tempo di permanenza ridotto che impedisce l'assorbimento di elevate quantità di farmaco sia nel sangue che nel SNC [Illum, 2000;2004].

La somministrazione nasale di 200 μ g di DFO contenuta nelle formulazioni **DCH** e **MCD** ha permesso di rinvenire quantità significative di farmaco sia nel torrente circolatorio che nel LCS dei ratti (biodisponibilità sistemica assoluta DFO circa 8%). Questi dati indicano la capacità delle formulazioni solide di indurre la permeazione della DFO attraverso la mucosa respiratoria, dove avviene l'assorbimento sistemico. Nel caso del formulato **DCH**, l'azione potrebbe essere ricondotta alle proprietà mucoadesive e di apertura temporanea delle giunzioni serrate a livello della mucosa respiratoria da parte del chitosano [Dalpiaz *et al.*, 2008;Gavini *et al.*, 2011]. Invece, nel caso dei formulati **MCD** le azioni sembrano trovare conferma nell'abilità delle β -ciclodestrine di agire come *penetration enhancer* per il trasporto transmurale di farmaci [Bshara *et al.*, 2014;Gavini *et al.*, 2011].

Le concentrazioni di DFO rilevate nel LCS di ratti dopo somministrazione nasale di **DCH** e **MCD** hanno indicato la capacità dei formulati di indurre un trasporto diretto naso-cervello della DFO. Difatti, la comparsa del farmaco nel LCS dopo insufflazione delle polveri microparticellari, non può essere attribuita all'assorbimento sistemico ed al conseguente passaggio attraverso la BEE, in quanto il principio attivo non è stato rinvenuto nel LCS dopo somministrazione endovenosa della stessa dose (200 μ g). La preparazione **DCH** ha confermato la capacità delle microparticelle di chitosano di promuovere, per mezzo del naso, l'*up-take* nel SNC del farmaco incapsulato, come in precedenza dimostrato per altri neurofarmaci [Dalpiaz *et al.*, 2008;Gavini *et al.*, 2011;2013], grazie all'azione di apertura delle giunzioni serrate da parte del chitosano [Lim *et al.*, 2002;Illum, 2009]. L'ipotesi sembra

venire supportata dalla comparsa relativamente veloce (30 min) della DFO (3 $\mu\text{g/mL}$, circa 5 μM) nel LCS dopo somministrazione nasale del preparato **DCH**. Sembra quindi da escludersi un meccanismo di trasporto intracellulare assonale, il quale richiede tempi lunghi (24 h) rispetto ai meccanismi para o transcellulari, capaci di trasportare in pochi minuti una molecola nel SNC [Illum, 2004]. La preparazione **MCD** sembra essere molto più efficace rispetto alla **CDH** nell'indurre un *up-take* della DFO nel SNC per via nasale: dopo 30 min dall'insufflazione è stata rinvenuta una concentrazione di DFO nel LCS di circa 15 $\mu\text{g/mL}$ (circa 25 μM). La biodisponibilità nel LCS della DFO da parte delle microparticelle **MCD** è stata quindi di circa 5 volte maggiore rispetto a quella data dalle microparticelle **DCH**. Da notare è che altri autori hanno somministrato per via nasale una soluzione di 6 mg di DFO su ratti; dopo 30 min dalla somministrazione hanno quantificato la DFO nel cervello dei ratti fino a circa 15 μM [Hanson *et al.*, 2009]. Considerando che nel presente lavoro la somministrazione nasale dei preparati **MCD** contenenti 200 μg di DFO ha permesso di rinvenire il farmaco a concentrazioni fino a 25 μM nel LCS, si può concludere che le microparticelle di β -metilciclodestrina permettono un elevato *up-take* della DFO nel SNC. Il fenomeno sembra da attribuirsi alla capacità di questo tipo di microparticelle di interagire diversamente con l'epitelio respiratorio ed olfattivo, a causa della diversa composizione cellulare [Mistry *et al.*, 2009]. Come è stato evidenziato dagli studi di permeazione condotti sul monostrato ottenuto dalle cellule PC-12 e come confermato dagli studi *in vivo*, la metil- β -ciclodestrina ha aumentato la permeazione della DFO attraverso la componente neuronale della mucosa olfattiva. Considerando la relativamente veloce comparsa della DFO nel LCS dei ratti, sembra da escludersi un meccanismo di passaggio per via intracellulare assonale attraverso le cellule neuronali olfattive. Per questo tipo di comportamento, è stata suggerita una via di trasporto extracellulare lungo i neuroni che permette al farmaco di arrivare al SNC [Illum, 2000].

Conclusioni

La via nasale si è dimostrata ancora una volta capace di favorire il trasporto di un farmaco verso le sedi centrali. Le microsfele sviluppate mediante la metodica dello *spray drying* ed impieganti polimeri biocompatibili, degradabili ed atossici hanno permesso un rapido passaggio del farmaco nel liquido cerebrospinale. L'assenza, in questa sede, del principio attivo, in seguito o ad una sua somministrazione endovenosa o a quella nasale sottoforma di soluzione acquosa, ha confermato la validità delle microparticelle sviluppate di fungere da efficienti *carrier* per il trasporto *nose-to-brain* del farmaco. In tale contesto, si è evidenziato come i *carrier* microparticellari costituiti da polimeri mucoadesivi e promotori

Tesi di Dottorato di Elena Soddu

“Progettazione e sviluppo di sistemi di veicolazione non invasivi per neuro-farmaci”

Dottorato in Scienze e Tecnologie Chimiche, indirizzo Scienze Farmaceutiche

Università degli Studi di Sassari

dell'assorbimento siano di fondamentale importanza per la permeazione del farmaco, così come fondamentale è la scelta del polimero stesso. Di fatto, le microparticelle di metil- β -ciclodestrina hanno consentito un maggiore grado di permeazione della DFO, con un passaggio nel liquido cerebrospinale di circa cinque volte superiore ai formulati a base di chitosano.

Bibliografia

Bshara H, Osman R, Mansour S, El-Shamy Ael-H. Chitosan and cyclodextrin in intranasal microemulsion for improved brain bupirone hydrochloride pharmacokinetics in rats. *Carbohydr Polym.* 2014;99:297-305.

Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review. *AAPS PharmSciTech.* 2005;6(2):E329-57. Consultabile al: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2750546/>

Craig DQ, Royall PG, Kett VL, Hopton ML. The relevance of the amorphous state to pharmaceutical dosage forms: glassy drugs and freeze dried systems. *Int J Pharm.* 1999;179(2):179-207.

Cullen V, Lindfors M, Ng J, Paetau A, Swinton E, Kolodziej P, Boston H, Saftig P, Woulfe J, Feany MB, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Tyynela J. Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo *Mol Brain.* 2009;2:5.

Curtis AR, Fey C, Morris CM, Bindoff LA, Ince PG et al. (2001) Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat Genet* 28: 350-354

Dalpiazz A, Gavini E, Colombo G, Russo P, Bortolotti F, Ferraro L, Tanganelli S, Scatturin A, Menegatti E, Giunchedi P. Brain Uptake of an Antiischemic Agent by Nasal Administration of Microparticles. *J Pharm Sci.* 2008;97(11):4889-903.

Dalpiazz A, Marchetti N, Cavazzini A, Pasti L, Velaga S, Gavini E, Beggiano S, Ferraro L. Quantitative determination of zolmitriptan in rat blood and cerebrospinal fluid by reversed phase HPLC-ESI-MS/MS analysis: application to in vivo preclinical pharmacokinetic study. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012;901:72-78.

Davson H, Welch K, Segal MB. The Secretion of the Cerebrospinal Fluid. In Anonymous *Physiology and Pathophysiology of the Cerebrospinal Fluid.* Davson H, Welch K, Segal MB, Eds; Churchill Livingstone: London, England, 1987; pp. 189-246.

Dexter DT, Carayon A, Javoy-Agid F, Agid Y, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, Marsden CD. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain.* 1991;114(4):1953-75. doi:10.1093/brain/114.4.1953. PubMed: 1832073.

Dhuria SV, Hanson LR, Frey II WH. Intranasal Delivery to the Central Nervous System: Mechanisms and Experimental Considerations. *J Pharm Sci.* 2010;99:1654-73.

Dinc C, Iplikcioglu AC, Atabey C, Eroglu A, Topuz K, Ipcioglu O, Demirel D. Comparison of Deferoxamine and Methylprednisolone Protective Effect of Pharmacological

Agents on Lipid Peroxidation in Spinal Cord Injury in Rats. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38(26):E1649-55.

Dragsten PR, Hallaway PE, Hanson GJ, Berger AE, Bernard B, Hedlund BE. First human studies with a high-molecular-weight iron chelator. *J Lab Clin Med*. 2000;135(1):57-65.

Febbraro F, Andersen KJ, Sanchez-Guajardo V, Tentillier N, Romero-Ramos M. Chronic intranasal deferoxamine ameliorates motor defects and pathology in the α -synuclein rAAV Parkinson's model. *Exp Neurol*. 2013;247:45-58.

Felgenhauer K. Protein Size and CSF Composition. *Klin Wochenschr*. 1974;52:1158-64.

Fine JM, Baillargeon AM, Renner DB, Hoerster NS, Tokarev J, Colton S, Pelleg A, Andrews A, Sparley KA, Krogh KM, Frey WH, Hanson LR. Intranasal deferoxamine improves performance in radial arm water maze, stabilizes HIF-1 α , and phosphorylates GSK3 β in P301L tau transgenic mice. *Exp Brain Res*. 2012;219(3):381-90.

Fine JM, Forsberg AC, Renner DB, Falteseck KA, Mohan KG, Wong JC, Arneson LC, Crow JM, Frey WH 2nd, Hanson LR. Intranasally-administered deferoxamine mitigates toxicity of 6-OHDA in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 2014;1574:96-104.

Gavini E, Rassu G, Ferraro L, Beggiato S, Alhalaweh A, Velaga S, Marchetti N, Bandiera P, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of polymeric microcarriers on the in-vivo intranasal uptake of an anti-migraine drug for brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013;83(2):174-83.

Gavini E, Rassu G, Ferraro L, Generosi A, Rau JV, Brunetti A, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of chitosan glutamate on the in vivo intranasal absorption of rokitamycin from microspheres. *J Pharm Sci*. 2000;100(4):1488-502.

Gavini E, Rassu G, Muzzarelli C, Cossu M, Giunchedi P. Spray-dried microspheres based on methylpyrrolidinone chitosan as new carrier for nasal administration of metoclopramide. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68:245-52.

Gavini E, Spada G, Rassu G, Cerri G, Brundu A, Cossu M, Sorrenti M, Giunchedi P. Development of solid nanoparticles based on hydroxypropyl- β -cyclodextrin aimed for the colonic transmucosal delivery of diclofenac sodium. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(4):472-82.

Gizurarson S. The relevance of nasal physiology to the design of drug absorption studies. *Adv Drug Del Rev*. 1993;11:329-47.

Guo C, Wang P, Zhong ML, Wang T, Huang XS, Li JY, Wang ZY. Deferoxamine inhibits iron induced hippocampal tau phosphorylation in the Alzheimer transgenic mouse brain. *Neurochem Int*. 2013;62(2):165-72.

Guo C, Wang T, Zheng W, Shan ZY, Teng WP, Wang ZY. Intranasal deferoxamine reverses iron-induced memory deficits and inhibits amyloidogenic APP processing in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34(2):562-75.

Hanson LR, Fine JM, Hoekman JD, Nguyen TM, Burns RB, Martinez PM, Pohl J, Frey WH 2nd. Intranasal delivery of growth differentiation factor 5 to the central nervous system. *Drug Deliv*. 2012;19(3):149-54.

Hanson LR, Roeytenberg A, Martinez PM, Coppes VG, Sweet DC, Rao RJ, Marti DL, Hoekman JD, Matthews RB, Frey WH 2nd, Panter SS. Intranasal Deferoxamine Provides Increased Brain Exposure and Significant Protection in Rat Ischemic Stroke. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;330(3):679-86.

Hua Y, Keep RF, Hoff JT, Xi G. Deferoxamine therapy for intracerebral haemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2008;105:3-6.

Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol*. 2004;56:3-17.

Illum L. Nasal drug delivery: new developments and strategies. *Drug Discov Today*. 2002 Dec 1;7(23):1184-9.

Illum L. Nasal drug delivery—Possibilities, problems and solutions. *J Control Release*. 2003;87:187-98.

Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci*. 2000;11:1-18.

Inthavong K, Jiyuan T, Goodarz A. Computational Modelling of Gas-Particle Flows with Different Particle Morphology in the Human Nasal Cavity, *J. Comput. Multiphase Flows*. 2009;1:57-82.

Jeong SY, Rathore KI, Schulz K, Ponka P, Arosio P, David S. Dysregulation of iron homeostasis in the CNS contributes to disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci*. 2009;29: 610-9.

Jianfang C, Marks E, Lai B, Zhang Z, Duce JA, Lam LQ, Volitakis I, Bush AI, Hersch S, Fox JH. Iron Accumulates in Huntington's Disease Neurons: Protection by Deferoxamine. *PLoS One*. 2013;8(10):e77023. Consultabile al: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0077023>

Kaur D, Yantiri F, Rajagopalan S, Kumar J, Mo JQ, Boonplueang R, Viswanath V, Jacobs R, Yang L, Beal MF, DiMonte D, Volitaskis I, Ellerby L, Cherny RA, Bush AI, Andersen JK. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron*. 2003;37:899-909.

Lim ST, Forbes B, Berry DJ, Martin GP, Brown MB. In vivo evaluation of novel hyaluronan/chitosan microparticulate delivery systems for the nasal delivery of gentamicin in rabbits. *Int J Pharm.* 2002;231:73-82.

Madu A, Cioffe C, Mian U, Burroughs M, Tuomanen E, Mayers M, Schwartz E, Miller M. Pharmacokinetics of Fluconazole in Cerebrospinal Fluid and Serum of Rabbits: Validation of an Animal Model used to Measure Drug Concentrations in Cerebrospinal Fluid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38:2111-15.

Mastroberardino PG, Hoffman EK, Horowitz MP, Betarbet R, Taylor G, Cheng D, Na HM, Gutekunst CA, Gearing M, Trojanowski JQ, Anderson M, Chu CT, Peng J, Greenamyre JT. A novel transferrin/TfR2-mediated mitochondrial iron transport system is disrupted in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009;34:417-31.

Meek JL, Neff NH. Is Cerebrospinal Fluid the Major Avenue for the Removal of 5-Hydroxyindoleacetic Acid From the Brain? *Neuropharmacol.* 1973;12:497-9.

Meng H, Li F, Hu R, Yuan Y, Gong G, Hu S, Feng H. Deferoxamine alleviates chronic hydrocephalus after intraventricular hemorrhage through iron chelation and Wnt1/Wnt3a inhibition. *Brain Res.* 2014 Aug 22. pii: S0006-8993(14)01114-7.

Merkus FW, Verhoef JC, Marttin E, Romeijn SG, van der Kuy PH, Hermens WA, Schipper NG. Cyclodextrins in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1999;36(1):41-57.

Meyler's Side Effects of Drugs, 2006; Meyler's Side Effects of Drugs-The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions, 2006, Pages 1058-1071

Mistry A, Stolnik S, Illum L. Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs. *Int J Pharm.* 2009;379(1):146-57.

Miyajima H. Aceruloplasminemia, an iron metabolic disorder. *Neuropathology.* 2003;23:345-50.

Palmer C, Roberts RL, Bero C. DFX posttreatment reduces ischemic brain injury in neonatal rats. *Stroke.* 1994;25:1039-45.

Poggiali E, Cassinerio E, Zanaboni L, Cappellini MD. An update on iron chelation therapy. *Blood Transfus.* 2012; 10: 411-22.

Porter JB, Rafique R, Srichairatanakool S, Davis BA, Shah FT, Hair T, Evans P. Recent insights into interactions of deferoxamine with cellular and plasma iron pools: implications for clinical use. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054:155-68.

Reger MA, Watson GS, Green PS, Baker LD, Cholerton B, Fishel MA, Plymate SR, Cherrier MM, Schellenberg GD, Frey 2nd, WH, Craft S. Intranasal insulin administration dose-dependently modulates verbal memory and plasma amyloid-beta in memory-impaired older adults. *J. Alzheimers Dis.* 2008;13:323-31.

Rival T, Page RM, Chandraratna DS, Sendall TJ, Ryder E, Liu B, Lewis H, Rosahl T, Hider R, Camargo LM, Shearman MS, Crowther DC, Lomas DA. Fenton chemistry and oxidative stress mediate the toxicity of the betaamyloid peptide in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci.* 2009;29:1335-1347.

Rosas HD, Chen YI, Doros G, Salat DH, Chen NK, Kwong KK, Bush A, Fox J, Hersch SM. Alterations in Brain Transition Metals in Huntington Disease: An Evolving and Intricate Story. *Arch Neurol.* 2012;69(7):887-93.

Sacchetti C, Artusi M, Santi P, Colombo P. Caffeine microparticles for nasal administration obtained by spray drying. *Int J Pharm.* 2002;242:335-9.

Selim M, Yeatts S, Goldstein JN, Gomes J, Greenberg S, Morgenstern LB, Schlaug G, Torbey M, Waldman B, Xi G, Palesch Y. Deferoxamine Mesylate in Intracerebral Hemorrhage Investigators. Safety and tolerability of deferoxamine mesylate in patients with acute intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2011;42(11):3067-74.

Selim MH, Ratan RR. The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing Res Rev.* 2004;3(3):345-53.

Shachar DB, Kahana N, Kampel V, Warshawsky A, Youdim MBH. Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Neuropharmacology.* 2004;46(2):254-63.

Singh A, Isaac AO, Luo X, Mohan ML, Cohen ML, Chen F, Kong Q, Bartz J, Singh N. Abnormal brain iron homeostasis in human and animal prion disorders. *Plos Pathog.* 2009;5:e1000336. Consultabile al:
(<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000336>).

Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm.* 2004;274:1-33.

Tesoro A, Leeder JS, Bentur Y, Klein J, Freedman M, Koren G. A high-performance liquid chromatographic method for the measurement of deferoxamine in body fluids. *Ther Drug Monit.* 1989;11(4):463-70.

Türker S, Onur E, Ozer Y. Nasal route and drug delivery systems. *Pharm World Sci.* 2004;26:137-42.

Ugwoke MJ, Verbeke N, Kinget R. The biopharmaceutical aspects of nasal mucoadhesive drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53:3-21.

Van den Berg MP, Romeijn SG, Verhoef JC, Merkus FW. Serial Cerebrospinal Fluid Sampling in a Rat Model to Study Drug Uptake from the Nasal cavity. *J Neurosci Methods.* 2002;116:99-107.

Vidgren MT, Kublik H. Nasal delivery systems and their effect on deposition and absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;29:157-77.

Walters RH, Bhatnagar B, Tchessalov S, Izutsu K-I, Tsumoto K, Ohtake S. Next Generation Drying Technologies for Pharmaceutical Applications. *J Pharm Sci.* 2014;103(9):2673-95.

Weigel KJ, Lynch SG, LeVine SM. Iron chelation and multiple sclerosis. *ASN Neuro.* 2014;6(1):e00136. Consultabile al: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3906635/>

Yamashita K, Nakate T, Okimoto K, Ohike A, Tokunaga Y, Ibuki R, Higaki K, Kimura T. Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. *Int J Pharm.* 2003;267(1-2):79-91.

Zhang L, Hu R, Li M, Li F, Meng H, Zhu G, Lin J, Feng H. Deferoxamine attenuates iron-induced long-term neurotoxicity in rats with traumatic brain injury. *Neurol Sci.* 2013;34:639-45.

Ziolkowski W, Szkatula M, Nurczyk A, Wakabayashi T, Kaczor JJ, Olek RA, Knap N, Antosiewicz J, Wieckowski MR, Wozniak M. Methyl-beta-cyclodextrin induces mitochondrial cholesterol depletion and alters the mitochondrial structure and bioenergetics. *FEBS Lett.* 2010;584(22):4606-10.

Tabelle

Tabella 1. Resa di produzione, contenuto in farmaco (DC) ed efficienza di incapsulazione (EE) delle formulazioni *spray dried* (**DCH, MCD**) e liofilizzate (**DCHL, MCDL**). I risultati sono stati espressi come media \pm DS.

Formulazione	Resa (%)	DC (%)	EE (%)
DCH	63,18 \pm 6,76	30,77 \pm 0,25	92,72 \pm 1,24
MCD	55,62 \pm 3,45	31,71 \pm 3,39	95,07 \pm 10,04
DCHL	95,90 \pm 5,80	32,92 \pm 0,82	98,02 \pm 2,80
MCDL	72,47 \pm 8,20	32,45 \pm 1,05	97,54 \pm 3,49

Tabella 2. Diametro volume superficie (d_{vs}) e coefficiente di uniformità (CU) delle formulazioni con o prive di farmaco. I risultati sono stati espressi come media \pm DS.

Formulazione	DCH	MCD	CH	MC
d_{vs} (μm)	1,77 \pm 0,06	3,47 \pm 0,05	1,92 \pm 0,01	3,81 \pm 0,09
CU	0,26 \pm 0,01	0,17 \pm 0,00	0,20 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01

Figure

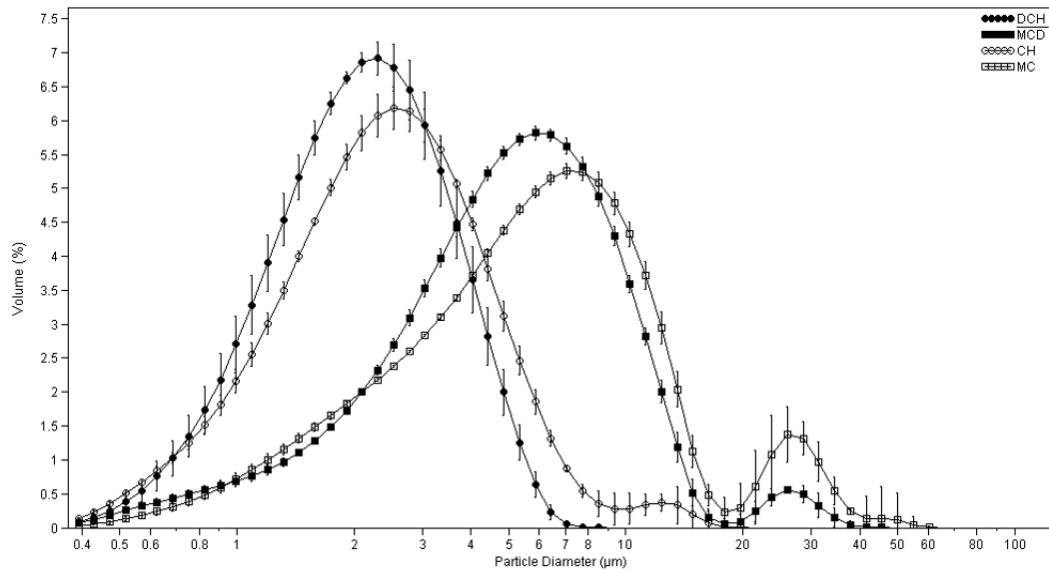
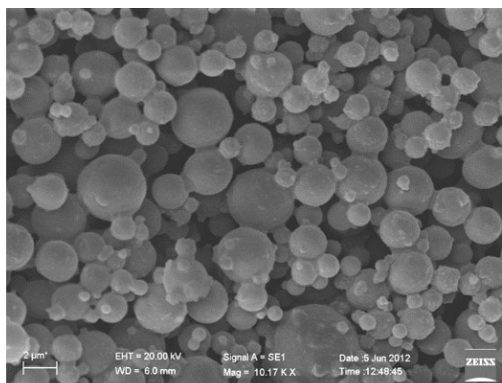
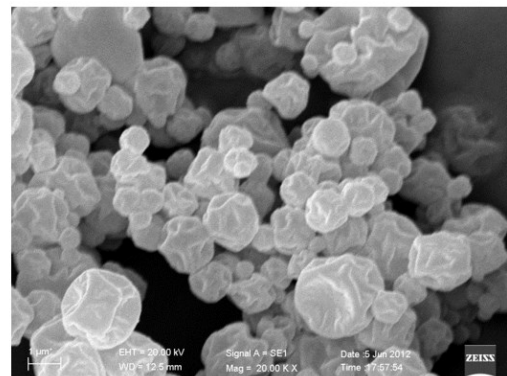


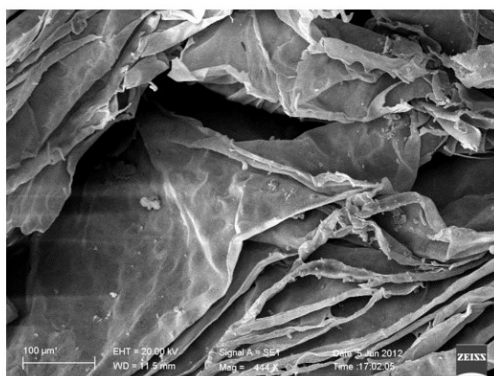
Figura 1. Curve di distribuzione dimensionale delle microsfele cariche o prive di farmaco: DCH (●) e MCD (■), CH (○) e MC (□).



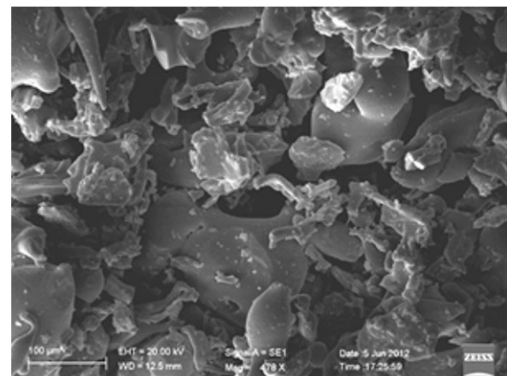
a



b



c



d

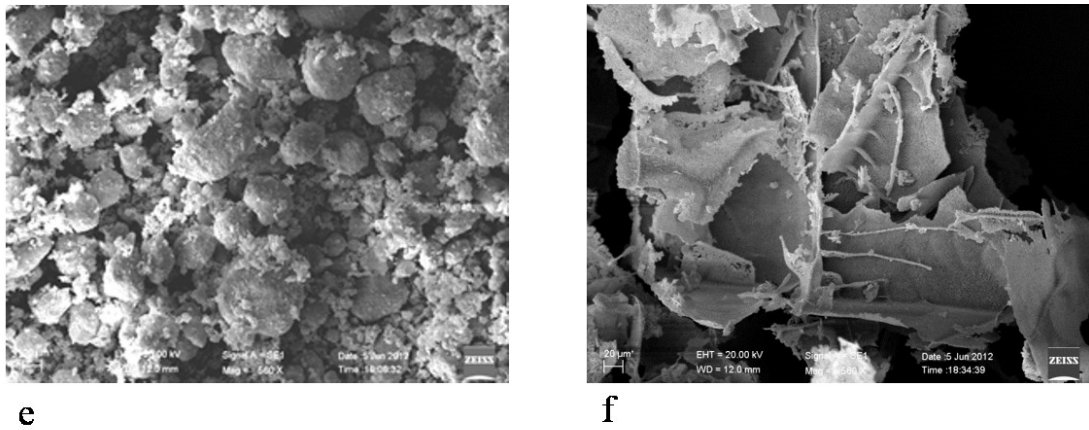


Figura 2. Immagini al SEM di a) **DCH** (10,17 KX); b) **MCD** (20,00 KX); c) **DCHL** (444 X); d) **MCDL** (478 X); e) **DFO** (560 X); f) **DFOL** (580 KX).

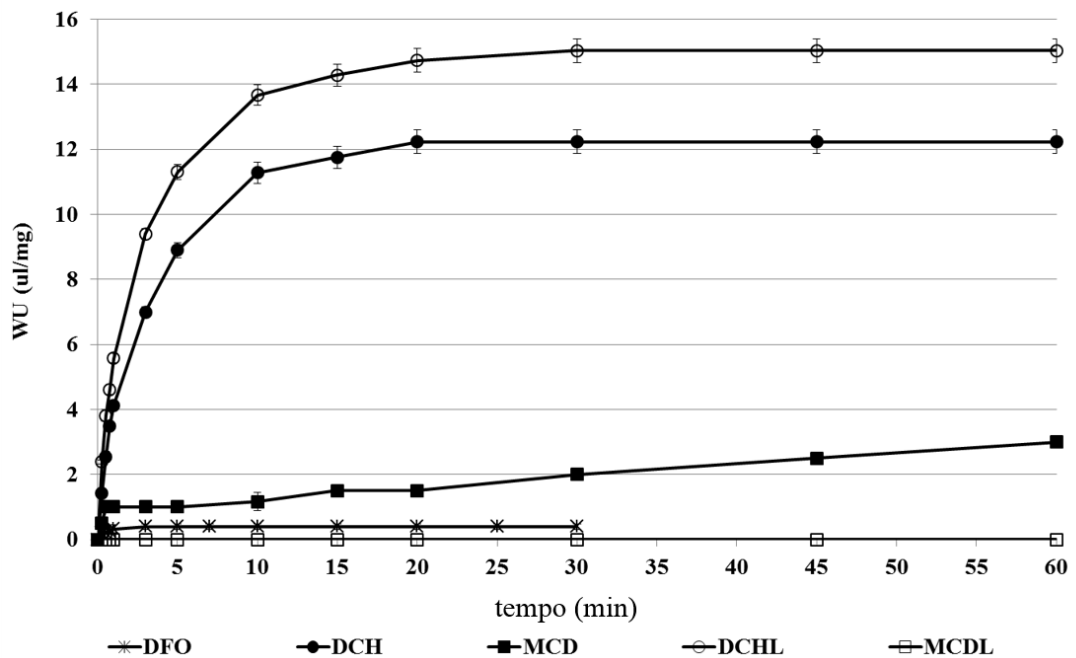
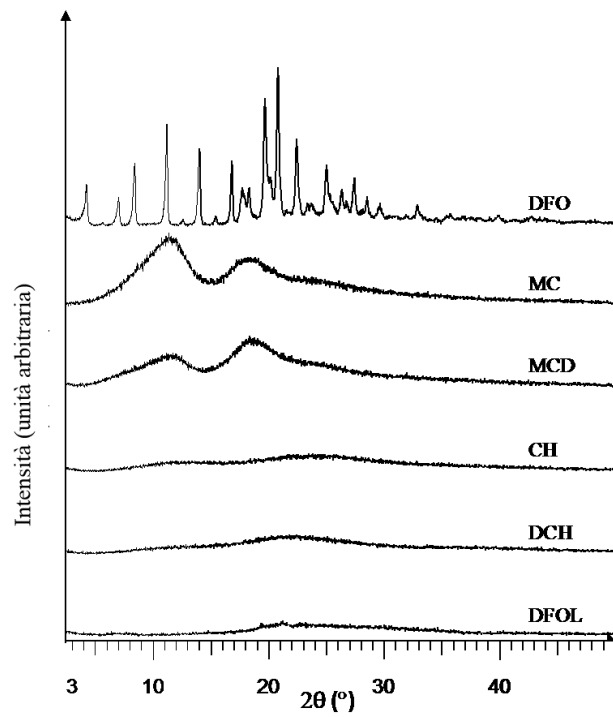


Figura 3. Capacità di *water up-take* ($\mu\text{L}/\text{mg}$) delle microsfeere e delle formulazioni liofilizzate, rispetto a quella del farmaco nella forma in cui è stato acquistato. I dati sono stati riportati come valore medio \pm DS ($n=3$).



[Figura 4.](#) Pattern XRD di: DFO, MC, MCD, CH, DCH e DFOL.

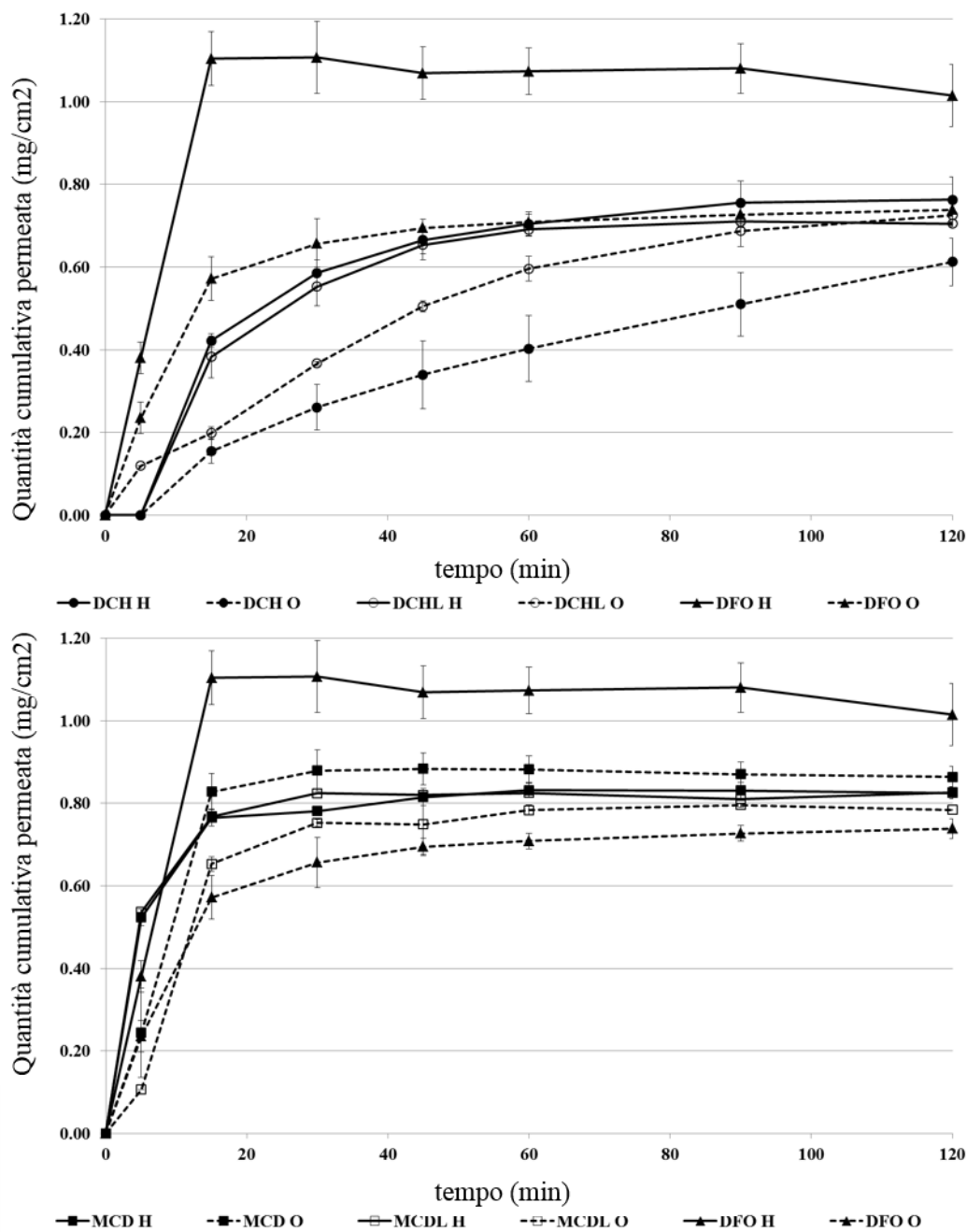


Figura 5. Profili di permeazione della DFO attraverso la membrana idrofilica (linea continua) e lipofila (linea tratteggiata) delle formulazioni *spray dried* (simboli pieni) e liofilizzate (simboli vuoti). I profili vengono confrontati con quelli del farmaco nella forma in cui è stato acquistato e dopo liofilizzazione. La lettera H è simbolo di dati provenienti dalla permeazione attraverso membrane idrofile mentre la lettera O sta ad indicare dati ottenuti da permeazioni attraverso membrane lipofile.

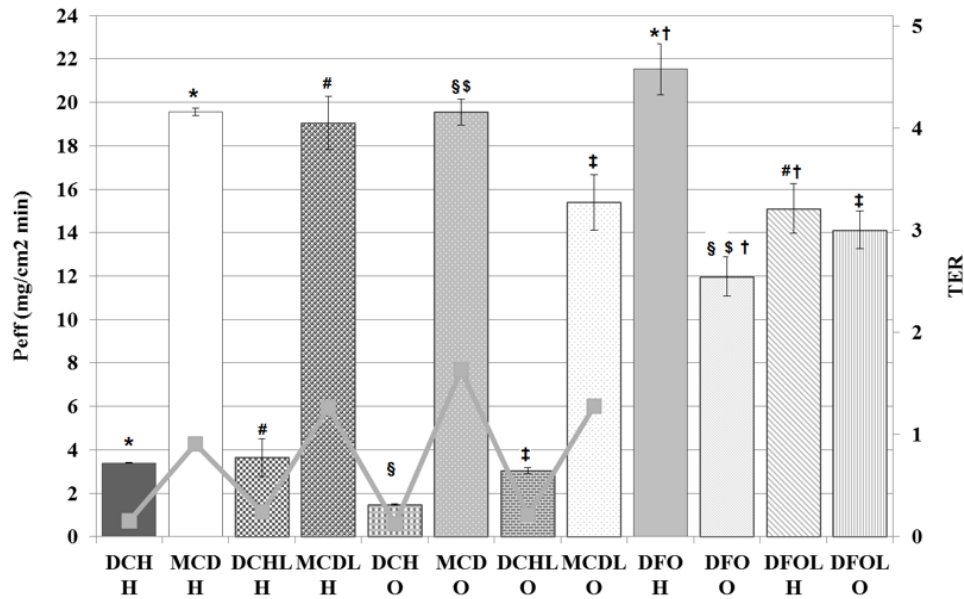


Figura 6. Valori di P_{eff} (barre) e TER (linee) delle formulazioni rispetto al farmaco. $p < 0,05$:
 * DCH H vs MCD H, DCH H vs DFO H; # DCHL H vs MCDL H, DCHL H vs DFOL H; \$ DCH O vs MCD O, DCH O vs DFO O; § MCD O vs DFO O; ‡ DCHL O vs MCDL O, DCHL O vs DFOL O; † DFO H vs DFO O, DFO H vs DFOL H. La lettera H è simbolo di dati provenienti dalla permeazione attraverso membrane idrofile mentre la lettera O sta ad indicare dati ottenuti da permeazioni attraverso membrane lipofile.

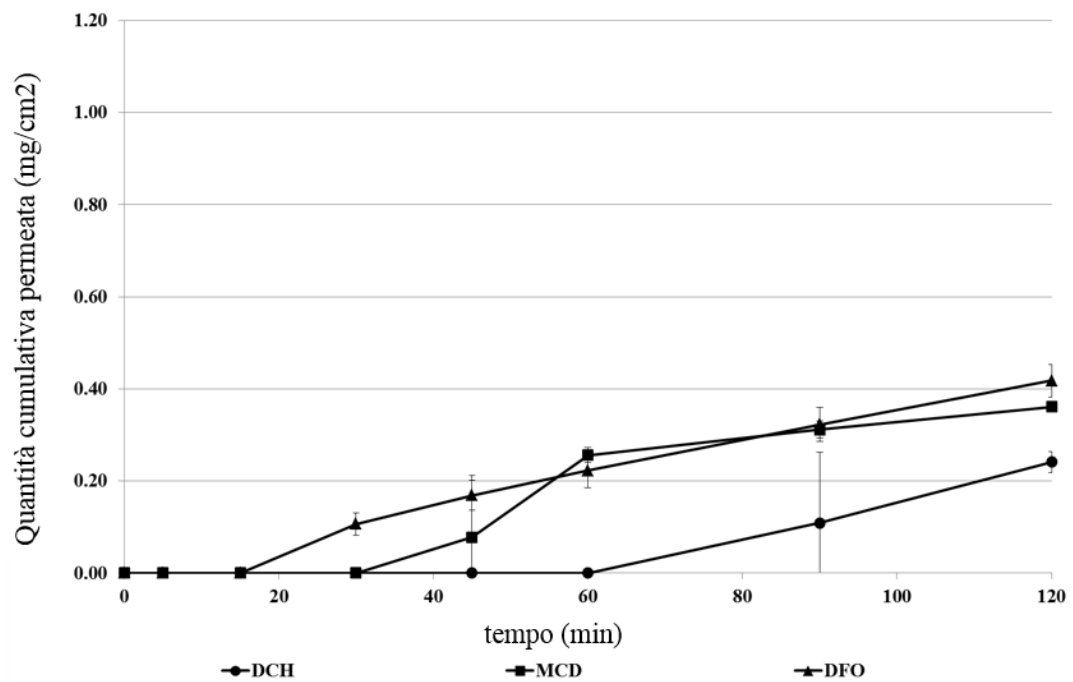


Figura 7. Profili di permeazione *ex vivo* della DFO dalle microsfe. I profili sono stati confrontati con quello della DFO nella forma in cui è stata acquistata.

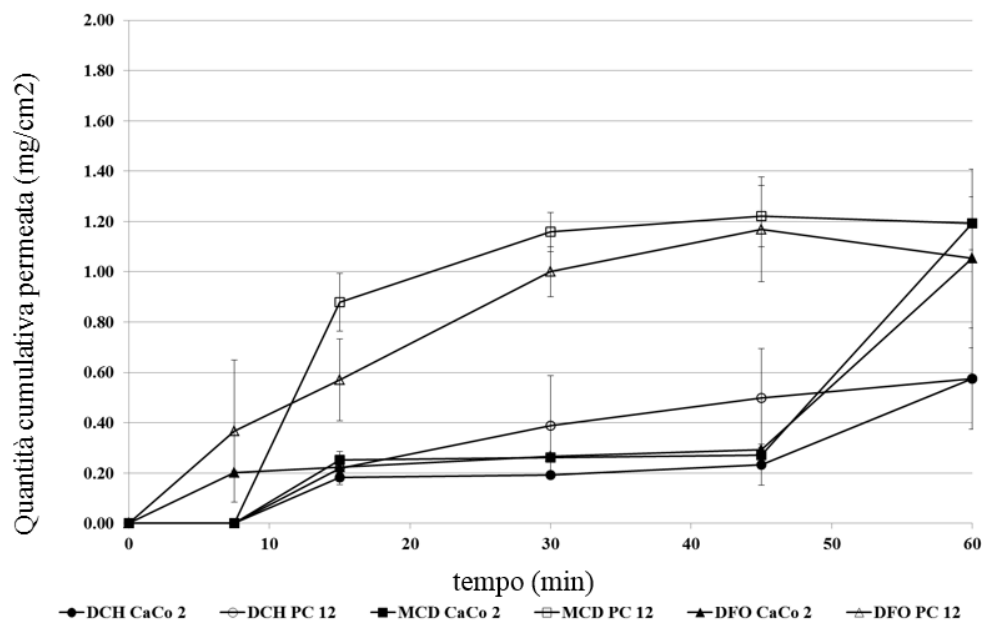


Figura 8. Profili di permeazione delle microsfe attraverso le cellule Caco-2 e le PC-12. I profili sono stati confrontati con quello della DFO nella forma in cui è stata acquistata.

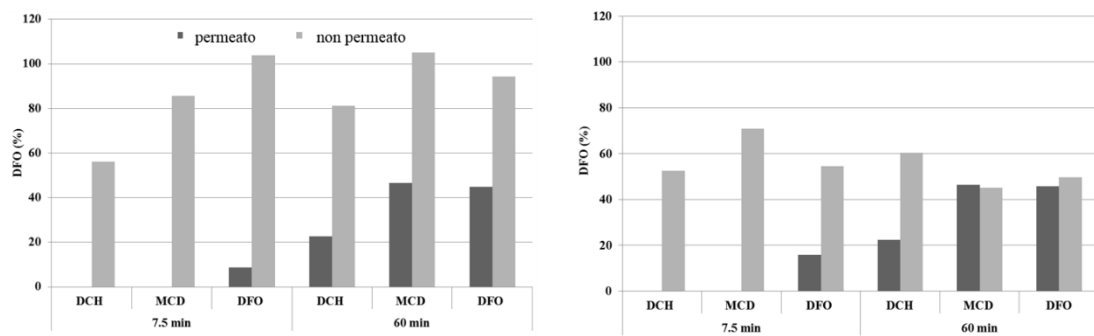


Figura 9. Quantità in percentuale di farmaco ritrovata nel mezzo accettore (permeata) ed in quello donatore (non permeata) dopo 7,5 min e 60 min attraverso le cellule CaCo-2 (sinistra) e PC-12 (destra).

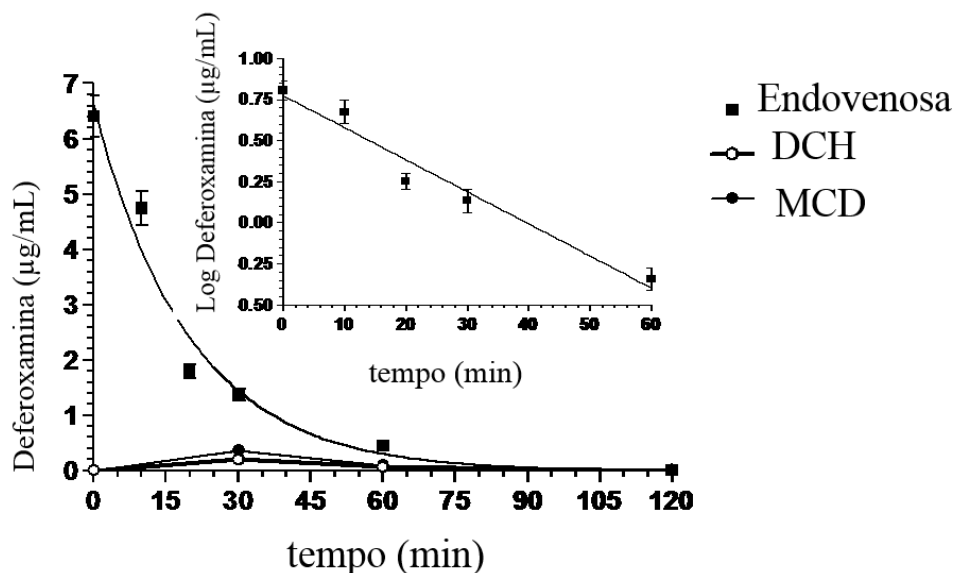
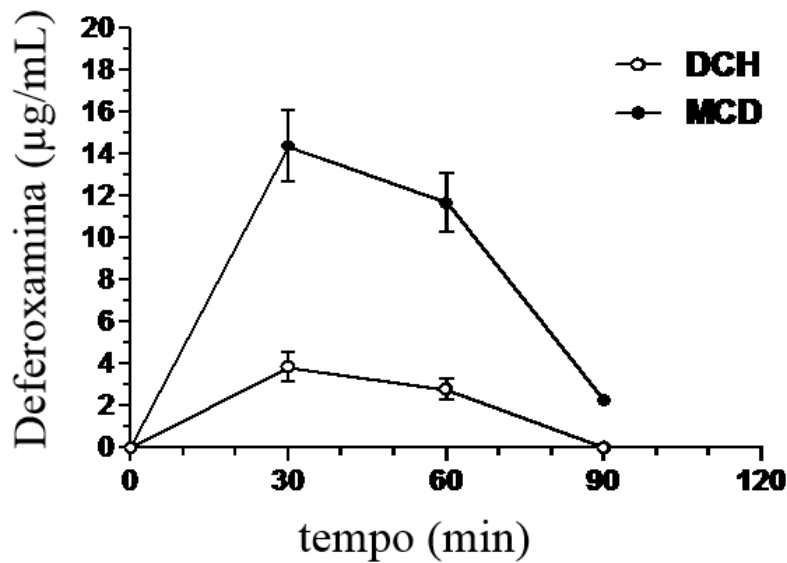


Figura 10. Profilo di eliminazione della deferoxamina dopo 0,200 mg dall'infusione in ratti. I dati sono stati espressi con media \pm DS di 4 esperimenti indipendenti. L'eliminazione ha seguito un'apparente cinetica di primo ordine, confermata dal tracciato semilogaritmico riportato nel riquadro in alto ($n=6$, $r=0,980$, $p<0,01$). L'emivita della deferoxamina è stata stimata essere $15,4 \pm 1,8$ min. La figura riporta anche il profilo di concentrazione plasmatica della deferoxamina in seguito a somministrazione nasale della stessa dose di farmaco incapsulato nelle microparticelle **DCH** e **MCD**.



[Figura 11.](#) Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$) di deferoxamina ritrovata nel fluido cerebrospinale dopo somministrazione nasale delle microparticelle **DCH** e **MCD**. In ciascuna dose erano presenti 200 μg di farmaco. I dati sono stati espressi come media \pm DS di esperimenti indipendenti.